

Inventaris Wob-verzoek W23-03		wordt verstrekt				weigeringsgronden				
nr.	document NTS 202216092	reeds openbaar	niet	geheel	deels	5.1, lid 1c	5.1, lid 2e	5.1, lid 2f	5.1, lid 2h	5.2, lid 1
1	Aanvraag projectvergunning (natte handtekening) d.d. 30-06-2022				x		x		x	
2	Projectvoorstel bij aanvraag				x				x	
3	Bijlage dierproeven 1 bij aanvraag				x				x	
4	Bijlage dierproeven 2 bij aanvraag				x				x	
5	NTS bij aanvraag			x						
6	E-mail aan DEC om advies aanvraag projectvergunning, d.d. 02-06-2022				x				x	
7	DEC-advies, d.d. 27-10-2022				x		x		x	
8	Projectvoorstel na DEC advies				x				x	
9	Bijlage dierproeven 1_na DEC advies				x				x	
10	Bijlage dierproeven 2_na DEC advies				x				x	
11	NTS na DEC advies			x						
12	AdviesNotaCCD, d.d. 15-11-2022				x		x		x	x
13	AdviesNotaCCD, d.d. 18-11-2022				x		x		x	x
14	E-mail vragen CCD aan vergunninghouder over aanvraag projectvergunning, d.d. 25-11-2022				x		x		x	
15	Antwoorden na CCD vragen				x		x		x	
16	NTS na CCD vragen			x						
17	Aanvullende AdviesNotaCCD_met opmerkingen, d.d. 06-01-2022				x				x	
18	Aanvullende AdviesNotaCCD, d.d. 06-01-2022				x				x	
19	AdviesNotaCCD, d.d. 09-01-2022				x		x		x	x
20	NTS definitief			x						
21	Beschikking definitief, d.d. 09-01-2022				x		x		x	
22	E-mail CCD aan DEC, terugkoppeling over projectaanvraag, d.d. 10-05-2023				x		x		x	

**Aanvraag****Projectvergunning Dierproeven***Administratieve gegevens*

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

1**Gegevens aanvrager**

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in	5.1 lid2f
		<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Wat voor aanvraag doet u?	<input checked="" type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 1.3	
		<input type="checkbox"/> Wijziging > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.1	
		<input type="checkbox"/> Melding > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.2	
1.3	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	5.1 lid2h
		Titel, voorletters en achternaam van de portefeuillehouder	Titel 5.1 lid2e Voorletters Achternaam <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw
		E-mailadres contactpersoon	5.1 lid2e
		Titel, voorletters en achternaam van de diens gemachtigde (indien van toepassing)	Titel 5.1 lid2e Voorletters Achternaam <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw
		E-mailadres gemachtigde	5.1 lid2e
	Vul de gegevens van het postadres in.	Straat en huisnummer	5.1 lid2h
		Postcode en plaats	
		Postbus, postcode en plaats	
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	5.1 lid2e <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
		Functie	5.1 lid2e
		Afdeling	5.1 lid2h

	Telefoonnummer	5.1 lid2e
	E-mailadres	5.1 lid2e
1.5	(Indien van toepassing) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters 5.1 lid2e xDhr. <input type="checkbox"/> Mw.
	Functie	5.1 lid2e
	Afdeling	5.1 lid2h
	Telefoonnummer	
	E-mailadres	5.1 lid2e
1.6	(Indien van toepassing) Vul hier de gegevens in van de persoon aan wie de portefeuillehouder de verantwoordelijkheid inzake de algemene uitvoering van het project en de overeenstemming daarvan met de projectvergunning heeft gedelegeerd.	(Titel) Naam en voorletters <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
	Functie	
	Afdeling	
	Telefoonnummer	
	E-mailadres	5.1 lid2h
1.7	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de Instantie voor Dierenwelzijn	Telefoonnummer 5.1 lid2h
	E-mailadres	5.1 lid2h
1.8	Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?	<input type="checkbox"/> Ja > Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag <input checked="" type="checkbox"/> Nee

2 Over uw aanvraag

2.1	Gaat uw aanvraag over een <i>wijziging</i> op een vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?	<input checked="" type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3 <input type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder kort de wijziging en de onderbouwing daarvan weer. Geef in de originele formulieren (niet-technische samenvatting, projectvoorstel en bijlage dierproeven) duidelijk aan (bij voorbeeld in een andere kleur) waar de projectaanvraag wijzigt. Ga daarna verder met vraag 6.
2.2	Gaat uw aanvraag over een <i>melding</i> op een vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?	<input type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3 <input type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder weer wat deze melding inhoudt en ga verder met vraag 6

3 Over uw project

3.1	Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	01/09/2022 01/09/2027
3.2	Wat is de titel van het project?	Role of the (Pro) renin receptor (PRR) in skin development and homeostasis. Towards deciphering inflammation induced by proteotoxic-stress.
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	De rol van de (pro)renine receptor (PRR) in de ontwikkeling en homeostase van de huid. Op weg naar de ontrafeling van ontstekingen veroorzaakt door proteotoxische stress.
3.4	Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) van voorkeur?	Naam DEC 5.1 lid2h Postadres

E-mailadres

5.1 lid2h

4 Factuurgegevens

4.1 (indien factuuradres afwijkt van de gegevens uit vraag 1.3) Vul de gegevens van het factuuradres in.	Naam:		Afdeling:		
	Straat:			Huisnummer:	
	Postcode:		Plaats:		
	Postbus:		Postcode:		Plaats:
	E-mail:				
4.2 (optioneel) Vul hier het ordernummer van de instelling in.	Ordernummer:				

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?	Verplicht	
	<input checked="" type="checkbox"/> Projectvoorstel	Aantal bijlage(n) dierproeven 2
	<input checked="" type="checkbox"/> Niet-technische samenvatting	
	Overige bijlagen, indien van toepassing	
	<input type="checkbox"/> Melding Machtiging	
	<input type="checkbox"/>	

6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD en per post naar de Centrale Commissie Dierproeven (voor adresgegevens zie website)
- Ondertekening door de portefeuillehouder namens de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.8). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
 - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
 - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel C van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
 - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
 - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam	5.1 lid2e
Functie	Gemandateerd vergunninghouder
Plaats	5.1 lid2h
Datum	30 - 06 - 2022
Handtekening	



Form

Project proposal

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

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 5.1 lid2h
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. 5.1 lid2h
- 1.3 Provide the title of the project. Role of the (Pro) renin receptor (PRR) in skin development and homeostasis. Towards deciphering inflammation induced by proteotoxic-stress.

2 Categories

- 2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.
- Basic research
- Translational or applied research
- Regulatory use or routine production
- Research into environmental protection in the interest of human or animal
- 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

This project licence application is the continuation of project AVD 5.1 lid2h .

State of the art

The (pro)renin receptor (**PRR**; encoded by the *atp6ap2* gene) has initially been discovered as a component of the renin-angiotensin system, that controls blood pressure (**1**). However, findings in *Xenopus* and *Drosophila*

demonstrate that PRR is an accessory receptor for Wnt (Wingless-type) pathways, where it acts independently of renin (2-4).

In mammals, PRR is broadly expressed in early development and progressively becomes restricted to the central nervous system and to epithelial tissues including the epidermis of the skin at E11.5 onwards (5). In the last years, mouse models have been developed to study PRR function in the context of hypertension, kidney and brain development (6). In human, missense mutations of *atp6ap2* have been recently associated with defects in glycosylation and autophagy leading to liver disease (7).

Findings obtained during the licence application AVD5.1 lid2h:

To understand the role of PRR in the skin, we have generated an *atp6ap2^{fl/fl}* mouse model to delete PRR encoding gene selectively in the epidermis. Our project aimed at studying:

- (1) PRR-dependent mechanisms that control epidermis **development** and cellularity of the dermis.
- (2) PRR-dependent mechanisms regulating inflammation in **post-natal skin**, and define if this mouse model is relevant to study human psoriasis

Our **results** revealed

(1) that the loss of PRR from the epidermis causes changes in the cellularity of the dermis including lymphatic hyperplasia and blood-lymphatic shunts, leading to embryonic lethality at around E15.5. The work performed (AVD5.1 lid2h) has allowed a more robust phenotypic analysis of the defects associated with the loss of PRR as well as a better understanding of the molecular mechanisms. Our bulk RNA sequencing analyses revealed that PRR mutant mice show proteotoxic stress associated with immune reaction as early as at E15.5.

Interestingly, our latest findings suggest that epidermis-specific-deletion of PRR in adult is associated with TH2 type of immune response, hallmarks that resemble **human atopic dermatitis** rather than psoriasis (associated with TH1 type of immune response), as initially thought.

(2) that chronic inflammation in adult mice is due to continuous **proteotoxic stress** rather than to autophagy defect, as suggested by the literature. We did test our initial hypothesis of DETCs (Dendritic Epidermal T Cells) being the cellular relay between the epidermis (where PRR is deleted) and the dermis (where the inflammation is observed). However, our genetic approach showed that the loss of function of DETCs does not impede chronic inflammation indicating that other cellular relays are involved. We also identified IL33 as a molecular mediator between the epidermis and the dermis. However, the use of IL33 blocking antibodies to normalize IL33 levels was not sufficient to impede chronic inflammation in adult mice.

In short, our results suggest that PRR deletion in post-natal epidermis could be a **relevant model of atopic dermatitis**, which is the major chronic inflammatory immune-related skin disease worldwide (8). In addition, our findings in mouse models are important in the perspective of PRR inhibitors that are being developed by companies to treat patients with hypertension. Our study suggests that such developments will have major **side effects**, at the level of the skin, in hypertensive patients.

Follow-up of licence application AVD5.1 lid2h:

The **present project licence application** aims to finalize this study, to confirm the results, to better characterize the response to **proteotoxic stress** and to define the early mediators between the stress and the immune response. We aim to confirm that our mouse model is relevant to study human **atopic dermatitis**. Our current **hypothesis** is that proteotoxic stress plays a major role in various skin disorders associated with chronic inflammation, which often result from multiple factors of unknown origin. We hope to deeply define the proteotoxic stress response in mouse skin to find markers that will be used in human skin samples to access the generality of this process in chronic inflammatory immune-related skin diseases. This study should help defining **risk factors** and **causative factors** at the global level in chronic inflammation potentially involving the whole skin.

References

- (1) Nguyen G (2011) *Clin Sci* **120**, 169-78
- (2) Buechling T et al (2010) *Curr Biol* **20**, 1263-68
- (3) Hermle T et al (2010) *Curr Biol* **20**, 1269-76
- (4) Cruciat CM et al (2010) *Science* **327**,459-63
- (5) 5.1 lid2h, 5.1 lid2e
- (6) Hoffmann and Peters (2021) *Pharmacol Res.* **173**, 105922
- (7) Rujano et al (2017) *J Exp Med* **214**, 3707-3729.

(8) Pezzolo and Naldi (2020) *Exp Rev Clin Immunol* **16**, 155-166.

3.2 Purpose

3.2.1 Describe the project's immediate and ultimate goals. Describe to which extent achieving the project's immediate goal will contribute to achieving the ultimate goal.

- If applicable, describe all subobjectives

In this context, the project's **immediate goal** is to decipher the molecular and cellular mechanisms leading to proteotoxic stress associated disorders. We have developed unique mouse models that represent early and late stages of the immune reaction due to intracellular stress and they will be used to:

- **Goal 1:** define the molecular and cellular mechanisms leading to the proteotoxic stress and the early immune response associated (**mouse model 1, PRR deletion during embryogenesis, see 3.4.1**). Single cell (Sc) RNAseq analysis of the skin of the PRR mutant and control mice will be compared at different stages of disease development and dysregulated pathways will be confirmed at the protein level (**Goal 1.1**). When possible, functional restoration approaches will be used to validate major findings by an independent approach (**Goal 1.2**).
- **Goal 2:** define how this continuous proteotoxic stress leads to chronic inflammation and what are the mediators of the immune response (**mouse model 2, post-natal deletion of PRR, see 3.4.1**). Sc RNAseq analysis will be performed upon cell isolation at early and later time points and dysregulated pathways will be confirmed at the protein level (**Goal 1.1**). When possible, functional restoration approaches will be used to validate the findings by an independent approach and to evaluate potential compounds that can reduce inflammation. We will define if this mouse model is relevant to study atopic dermatitis, a human skin disorder associated with TH2 type of immune response (**Goal 2.2**).

The **ultimate goal** of this project is to get knowledge on the chronic inflammation in response to intracellular stress, which is a prerequisite for clinical management. We hope to develop a preclinical model of human atopic dermatitis. In addition, this project should give insight on how different immune cells are recruited to the skin during embryonic development, which show quite discrepancies in literature.

3.2.2 Provide a justification for the project's feasibility.

We have developed unique mouse models that allow studying the function of epidermal PRR during skin development and maintenance. The phenotypic analysis of these models reveals previously unknown function of PRR in the skin, although molecular and cellular downstream events need to be further investigated. Main researchers share expertise [5.1 lid2h](#)

3.2.3 Are, for conducting this project, other laws and regulations applicable that may affect the welfare of the animals and/or the feasibility of the project?

No

Yes > Describe which laws and regulations apply en describe the effects on the welfare of the animals and the feasibility of the project.

3.3 Relevance

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

The scientific relevance of the project is to provide:

- (1) knowledge on PRR function during skin morphogenesis: first demonstration that PRR controls the epidermal progenitor fate, and that the epidermis controls dermal lymphatic remodelling during development. This communication between epidermis and dermal lymphatic vessels represents a novel area of research, that seems to be associated to an immune reaction as early as at E15.5.
- (2) knowledge on PRR function in post-natal skin: in particular, on skin inflammation, which is a feature of most of skin conditions. These models will allow deciphering how chronic inflammation is induced and maintained in response to intracellular stress. We hope to develop a good model of atopic dermatitis that integrates the different aspects of the pathology (crosstalk of epidermis and dermis involving immune cells).

The social relevance of these findings is to assess the contribution of proteotoxic stress to various skin disorders associated with chronic inflammation. Disorders such as atopic dermatitis, psoriasis, although associated with TH2 and TH1 type of immune response respectively, are both associated with chronic inflammation, which is due to multiple factors of unknown origin. We believe that proteotoxic stress contributes to this inflammation and we hope to characterize the early stages of the response in mice to find markers to access these questions within samples of human origin. If our hypothesis is true, the development of inhibitors of such stress (to be applied topically) could be beneficial for patients with such chronic disorders.

3.3.2 Who are the project's stakeholders? Describe their specific interests.

...Project's stakeholders and their specific interest are the following:

- (1) The animals as they are bred, used in procedures, and killed for this project. Their interest is that the discomfort and the animal numbers are reduced to a minimum.
- (2) The scientists as they will test the validity of the hypothesis of the proteotoxic stress being one of the factors involved in skin chronic inflammation, by using this integrated model, with all different cell types leading to inflammation. Their interest is to produce robust results by using the least number of mice and with minimal discomfort.
- (3) The patient with chronic skin inflammation as in a long term they may benefit from the scientific findings (development of inhibitors of proteotoxic stress).

3.4 Strategy

3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy). If applicable, describe the different phases in the project, the coherence, the milestones, selection points and decision criteria.

To investigate the role of PRR in skin development and homeostasis, we have generated two mouse models based on the Cre/loxP system:

mouse model (1) to investigate the role of PRR **during skin development**, the *atp6ap2^{fl/fl}* mice are crossed with mice expressing the Cre under the control of Keratin 5 promoter (**K5-Cre**) (**embryonic deletion of *atp6ap2*, constitutive expression**). Based on our previous experience, embryonic lethality is as followed: about 10% of mutant embryos die at E14.5, 30% at E15.5 and 90% at E18.5.

mouse model (2) to study the role of PRR in skin homeostasis, the *atp6ap2^{fl/fl}* mice are crossed with **K14-Cre ESR1** mice where the Cre enzyme is fused with estrogen receptor allowing its functionality only when tamoxifen is added (**post-natal deletion of *atp6ap2*, inducible promotor**). Different time points have been selected based on our previous experiments. Mice will be harvested between day 5-7 post first-injection of tamoxifen (before first macroscopic signs of skin defects are observed), or at day 15 post first-injection of tamoxifen (when first macroscopic signs of skin defects are visible), or 3 months post-injection (to prove long term amelioration in functional restoration assays).

By using the mouse Cre/loxP system (**mouse model 1, appendix 1**), we have previously shown that epidermal specific deletion of PRR during skin development leads to a delayed epidermal development associated with embryonic lethality (at around E15.5) due to vein-lymphatic shunts in the dermis. Bulk RNAseq analyses indicate that mutant skin shows signs of proteotoxic stress associated with immune reaction. Our working **hypothesis** is that the deletion of PRR in keratinocytes leads to proteotoxic stress that induces immune reaction in the dermis.

To confirm this hypothesis and decipher the molecular and cellular mechanisms leading to proteotoxic stress, immune reaction, and veino-lymphatic shunts ([Goal 1 in the project proposal form](#)), we will perform Single cell (Sc) RNAseq analysis at different stages after PRR deletion (E13.5, E14.5, E15.5 and E18.5). That will help defining the chronology of the cellular response. This approach will provide information on the cell type that encounters proteolytic stress, the immune cells that are already present in the skin at different stages of development (Which is not well reported in literature) and activated in response to the stress. Main findings will be confirmed at the RNA (by qRT-PCR) and protein (immunofluorescence and immunoblotting) levels ([Goal 1.1](#)) as well as by functional restoration of the mutant phenotype either by administration of compounds or genetically ([Goal 1.2](#)).

By using inducible mouse Cre/loxP system (**mouse model 2, appendix 2**), we have previously shown that epidermal-deletion of PRR in post-natal epidermis, once the skin is established and vascular network is quiescent, leads to chronic inflammation associated with epidermal hyperplasia, dermal infiltration of inflammatory cells and lymphatic enlargement. Our current working **hypothesis** is that the post-natal deletion of PRR in keratinocyte leads to continuous intracellular stress associated with TH1 type of immune reaction and chronic inflammation in adult, where immune system is fully developed.

To confirm this hypothesis and decipher the molecular and cellular mechanisms leading to proteotoxic stress, immune reaction, and chronic inflammation ([Goal 2 in the project proposal form](#)), we will perform Single cell (Sc) RNAseq analysis at different stages after PRR deletion (early: day 5-8; intermediate: day 15 and late: day 90 post tamoxifen injection). This approach will provide information on the cell type that encounters proteolytic stress, the immune reaction that is initiated and how it is amplified over time. Main findings will be confirmed at the RNA (by qRT-PCR) and protein (immunofluorescence and immunoblotting) levels ([Goal 2.1](#)) as well as by functional restoration of the mutant phenotype either by administration of compounds or genetically ([Goal 2.2](#)).

The design of the project is described in the following scheme. Goal 1 and 2 are independent but complementary. During this project, a maximum of twenty compounds will be tested with 5 compounds maximum going through all steps (go moment) as well as a maximum of 5 different genetic backgrounds with 3 backgrounds maximum going through all steps (go moment). This numbers are based on our capacities in terms of human power and time (need of performing and analysing an experiment before starting the next one with another compound/background).

Goal 1: define the molecular and cellular mechanisms leading to the proteotoxic stress and the early immune response (mouse model 1, appendix 1)

Goal 1.1 Collection of skin from E13.5, E14.5 and E15.5 and E18.5.

-> 1.1.1. transcriptomic analysis of control and mutant genotypes at the cell level
*Confirm that keratinocyte show proteotoxic stress (previous analysis was bulk RNAseq with all skin cell types)
 What are the signalling pathways/ cell populations dysregulated in each cell type?
 How do immune cells are recruited to the skin during development?*

-> 1.1.2. confirm major findings by qRT-PCR and at the protein level

Goal 1.2 Functional restoration to validate main findings: collection of skin upon administration of compound or in a different genetic background. Restoration at E18.5 will be analyzed for a go- or no-go moment. If go-moment, the most appropriate time point will be defined in a pilot experiment.

-> 1.2.1. priority will be given to FDA approved compound with administration through route and doses based on literature

->1.2.2. Genetic approach as alternative if 1.2.1 is not possible

Goal 2: define how the continuous proteotoxic stress leads to chronic inflammation (mouse model 2, appendix 2)

Goal 2.1 Collection of skin between 5-8 days, at 15 and 90 day-post-tamoxifen injection (5 different time points maximum)

-> 2.1.1. transcriptomic analysis of control and mutant genotypes at the cell level
*Confirm that embryonic and post natal phenotypes are of similar origin (proteotoxic stress in keratinocytes).
 Decipher immune response.*

-> 2.1.2. confirm major findings by qRT-PCR and at the protein level

Goal 2.2 Functional restoration to validate main findings: collection of skin upon administration of compound or in a different genetic background. Restoration at day 15 will be analyzed for a go- or no-go moment. If go-moment, the most appropriate time point will be defined in a pilot experiment.

-> 2.2.1. priority will be given to FDA approved compound with administration through route and doses based on literature. If relevant, specific compounds know to improve atopic dermatitis in humans will be tested in this mouse model.

->2.2.2. Genetic approach as alternative if 1.2.1 not possible.

3.4.2 Provide a justification for the strategy described above.

Inflammation is key in the development of many skin conditions. In addition to environmental insults, there is more and more evidence that inflammation can be driven by intracellular stress such as proteotoxicity. Our previous results suggest that this is the case in our mouse models. They provide an integrated and well controlled system to study the complex immune response associated with intracellular stress. So far, inflammation shows such a degree of complexity in terms of molecular and cellular cascades that this process cannot be recapitulated *in vitro*. The development and implementation of Omics approaches will allow studying gene regulation during inflammation at the cell resolution. Our strategy will provide unique molecular data on each step of the immune and inflammatory responses in a cell-specific manner. This approach will allow defining specific early markers of proteotoxic stress that will be used to access the role played by such intracellular stress in skin disorders associated with chronic inflammation by using human samples.

3.4.3 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	Collection of skin from embryos at stages E13.5, E14.5, E15.5 and E18.5 (K5-Cre driven deletion). For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin.
2	Collection of skin from control and mutant mice at different time points of skin defect development (5-8 days, 15 days, 90 days post tamoxifen injection) (K14-Cre ESR1 driven deletion). For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin.



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.

5.1 lid2h

- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.

5.1 lid2h

- 1.3 List the serial number and type of animal procedure

Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.

Serial number	Type of animal procedure
3.4.3.1	Collection of skin from embryos at stages E13.5, E14.5, E15.5 and E18.5 (K5-Cre driven deletion). For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin.

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

The procedure required is '**Collection of skin from embryos at stages E13.5, E14.5, E15.5 and E18.5**' in which the progeny of the following cross will be harvested at different time points:
-Goal 1.1 and Goal 1.2.1 (compounds): Male K5-Cre/+ x Female *atp6ap2*^{Flox/Flox} that generates littermates with all interesting genotypes, i.e., male and female control embryos (+/+; *atp6ap2*^{Flox/Y} or *Flox/+*); male knock-out (K5-Cre/+; *atp6ap2*^{Flox/Y}) and heterozygous females (K5-Cre/+; *atp6ap2*^{Flox/+}). For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin will be performed.
Goal 1.2.2 (Genetics): Male K5-Cre/+ x Female *atp6ap2*^{Flox/Flox}; transgene (overexpression) or floxed alleles (loss of function) that generates littermates with all interesting genotypes, in particular males and females *atp6ap2* mutants within the new genetic background (gain or loss of function of candidate gene) that should restore initial phenotype of males and females *atp6ap2* mutants.

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

Females with embryos of required genotypes at desired stage (E13.5, E14.5, E15.5 or E18.5) will be euthanized according to directive 2010/63/EU and the skin of the embryos will be collected before subsequent processing (dissociation, flow cytometry, immunolabeling...).

We have previously defined that epidermal specific deletion of PRR is associated with embryonic lethality around E15.5. Therefore, embryos will be studied at this stage, just before they die *in utero*. To analyse cell population (homing, morphology, activation...) involved in PRR-dependent signalling, earlier stages (E13.5 and E14.5) will be studied. Finally, when restoration assays of dermal phenotype are performed, embryos should survive and will be studied at E18.5.

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

The next tables summarize the number of litters required (estimate of 6 embryos/litter).

For [Goal 1.1](#), five litters per embryonic stage will be used **to optimize** cell dissociation for ScRNAseq, which requires enzymatic cell dissociation with a high overall cell viability (90%). They will be indicated as (+5) in the table. Each embryonic stage may require different incubation times. Mice of different genotype should be included here to ensure that cell viability upon dissociation is not affected by the genotype. Based on our previous experience, about 10% of mutant embryos are already dead at E14.5, 30% at E15.5 and 90% at E18.5 and should be excluded from our experiments. Mutant viability is extremely low at E18.5 and skin area is larger. Therefore, at E18.5, back skin of each animal will be cut in three pieces for analysis in the three experimental set-ups (ScRNAseq, validation RNA and validation proteins).

Based on our former experience, statistically significant analysis requires at least **three experimental replicates**, i.e., independent litters and three technical replicates, i.e., individuals of same genotype (which is usually not obtained within a litter of 6 in average), therefore this must be corrected by increasing experimental replicates: 9 individuals of a genotype (at least from 3 independent litters)/experimental approach is the standard to access statistical significance. Statistical analysis will be performed with Prism 9 software (GraphPad) using a one-way ANOVA for multiple group comparison (power set at 80%, p-value ≤ 0.05).

Goal 1.1	ScRNAseq	Validation RNA	Validation protein
E13.5	9 litters (+ 5)	9 litters	9 litters
E14.5	10 litters (+5)	10 litters	10 litters
E15.5	13 litters (+5)	13 litters	13 litters
E18.5	100 litters (+5) for all experimental set-ups 3		
→ 216 females,	192 E13.5; 210 E14.5; 264 E18.5	E15.5 and 630 E18.5	

The [Goal 1.2](#). has Go / no Go moment.

For [Goal 1.2.1.\(compounds\)](#), five litters will be used to optimize dose of the compound to be administrated. Restoration of macroscopic phenotype/survival will be evaluated at E18.5.

For [Goal 1.2.1.\(compounds\)](#), twenty compounds maximum will be tested with 5 compounds maximum going through all steps (go moment). Administration of appropriate dose of compounds through adequate route will be performed based on literature. Compounds that can cross the placenta barrier will be selected. The window for treatment is narrow as death of 30% and 90% of mutant embryos is already observed at E15.5 and E18.5, respectively. Survival rate of mutant embryos will be accessed at E18.5. Pilot experiments will be used to define optimal dose. If no restoration is observed at the different doses tested in the pilot experiment, that will be a no-Go moment. Otherwise, optimal dose will be used to access statistical significance.

For [Goal 1.2.2.\(genetic background\)](#), five genetic background maximum will be tested with 3 backgrounds maximum going through all steps (go moment). Six litters will be used to evaluate the potential restoration of macroscopic phenotype/survival at E18.5. Indeed, depending on the genetic background changes (gain or loss of function), the probability to have mutant embryos in the new genetic background can be low.

If no restoration is observed, there will be no further experiment. If restoration is observed at E18.5, optimal stage(s) of restoration analysis (early E13.5- E15.5 or late E18.5) will be defined based on the process to be restored (proteotoxic stress should be restored at E13.5 already while immune response restoration should be accessed at later stage). One litter per embryonic stage will be studied by ScRNAseq analysis as a pilot experiment to define optimal stage to be studied in detail.

Goal 1.2.1- For ONE compound	Macroscopic restoration/survival? Go no Go moment		
E18.5	5 litters		
→ For 20	compounds: 100 females; 600 embryos E18.5		
If go moment	ScRNAseq	Validation RNA	Validation protein
E13.5	1 litter		
E14.5	1 litter		
E15.5	1 litter		
E18.5	1 litter		

Optimal stage	8 litters	9 litters	9 litters
→ For 5 comp-	-ounds: 150 females; 30	E13.5, 30 E14.5, 30 E15.5	, 30 E18.5 and 156 E'optimal'

Goal 1.2.2-For ONE genetic background	Macroscopic restoration/survival? Go no Go moment		
E18.5	6 litters		
→ For 5	backgrounds: 30 females; 180 embryos E18.5		
If go moment	ScRNAseq	Validation RNA	Validation protein
E13.5	1 litter		
E14.5	1 litter		
E15.5	1 litter		
E18.5	1 litter		
Optimal stage	8 litters	9 litters	9 litters
→ For 3 back-	-grounds: 90 females; 18	E13.5, 18 E14.5, 18E15.5	, 18 E18.5 and 156 E'optimal'

Specified numbers are based on our current knowledge; however these numbers may need to be slightly adapted. Breeding couples are not counted as experimental animals.

B. The animals

Specify the species, origin, life stages, estimated numbers, gender, genetic alterations and, if important for achieving the immediate goal, the strain.

Serial number	Species	Origin	Life stages	Number	Gender	Genetically altered	Strain
	<i>Mus musculus</i>	In house breeding	Primiparous > 8-week-old	466	female	atp6ap2 Flox/Flox	C57BL/6
	<i>Mus musculus</i>	In house breeding	E13.5/E14.5/E15.5/E18.5/E'optimal'	222/240/294/1260/156 TOTAL: 2172	both	Epidermal-specific deletion of atp6ap2 and control littermates	C57BL/6
	<i>Mus musculus</i>	In house breeding	Primiparous > 8-week-old	90	female	atp6ap2 Flox/Flox in combination with gain or loss of function in candidate gene	C57BL/6
	<i>Mus musculus</i>	In house breeding	E13.5/E14.5/E15.5/E18.5/E'optimal'	18/18/18/18/156 TOTAL: 228	both	Epidermal-specific deletion of atp6ap2 and control littermates in combination with gain or loss of function in candidate gene	C57BL/6

Provide justifications for these choices

Species	Homologous recombination in <i>Mus musculus</i> has allowed the generation of gain and loss of function models used to study gene's function
Origin	In house breeding of the animal avoids animal transportation
Life stages	Different stages defined in our former experiments. Embryonic lethality is at around E15.5
Number	For statistically significant analysis (see section A)
Gender	Pregnant females required; gender of embryos defined retrospectively
Genetic alterations	Epidermis-specific deletion of <i>atp6ap2</i> (K5-Cre). For restoration approach, in a genetic background (gain or loss of function of candidate gene)
Strain	Having a pure genetic background allows eliminating all confounding effects due to differences in the genetic background. Phenotype will come from induced genetic modifications.

C. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

Yes

No > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices

D. Pain and compromised animal welfare

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No

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

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

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

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

No adverse effects expected.

Explain why these effects may emerge.

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

E. Humane endpoints

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

No > Continue with question F

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

Indicate the likely incidence.

F. Classification of severity of procedures

Provide information on the experimental factors contributing to the discomfort of the animals and indicate to which category these factors are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe'). In addition, provide for each species and treatment group information on the expected levels of cumulative discomfort (in percentages).

Mild discomfort is expected for 100 of the mice (pregnant females and litters) and procedure is assigned as 'non-recovery' procedure.

Description	Animal species/strain and sex	Number of animals	Discomfort (expected cumulative discomfort) (% of total)	Discomfort is a sum of following procedures
Mothers	Mouse (female)	556	100% mild	Euthanasia
Embryo's stage	Mouse (male and female)	2400	100% mild	Euthanasia
		Total		

G. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement	The molecular mechanisms downstream of PRR deletion can be deciphered only <i>in vivo</i> as they involve interactions between cell types of epidermis and dermis. The 3D skin models currently available show reduced barrier properties and do not reflect the complexity of the skin. They show stratified epidermis, but composition of the dermis is reduced to fibroblasts and does not show vessels or immune cells. Discovering early markers of proteotoxic stress in mice will allow accessing if this process is generally found in human disorders. We have a collaboration with the Dermatology department of our institute and have access to human skin cryosections.
Reduction	The minimum number of mice required to get statistically significant results has been anticipated based on our previous experiments and statistical analyses. To reduce the number of mice, back skin including that of the head of the embryos will be used.
Refinement	The procedure used is dedicated to the collection of biological material. Experiments will be performed by staff that are highly skilled and experienced with animal handling. As a result, all procedures with the animals will be performed with the greatest care and minimal animal distress will be ensured.

Are adverse environmental effects expected? Explain what measures will be taken to minimise these effects.

No

Yes > Describe the environmental effects and explain what measures will be taken to minimise these effects.

H. Re-use

Will animals be used that have already been used in other animal procedures ?

No > Continue with question I.

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

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

No

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

I. Repetition

Explain for legally required animal procedures what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, describe why duplication is required.

Not applicable.

J. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question K.

Yes > Describe this establishment.

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

End of experiment

K. Destination of the animals

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Provide information on the destination of the animals.

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

The procedure used is dedicated to the collection of biological material, which requires to kill the animals before collection.

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

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

Yes > Will a method of killing be used for which specific requirements apply?

No > Describe the method of killing.

Yes > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Females will be euthanized, according to directive 2010/63/EU, by cervical dislocation and embryos will be submitted to decapitation., upon cooling on ice.

If animals are killed for non-scientific reasons, justify why it is not feasible to rehome the animals.



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.

5.1 lid2h

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

5.1 lid2h

1.3 List the serial number and type of animal procedure

Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.

Serial number	Type of animal procedure
3.4.3.2	Collection of skin from control and mutant mice at different time points of skin defect development (5-8 days, 15 days, 90 days post tamoxifen injection) (K14-Cre ESR1 driven deletion). For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin.

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

The procedure required is '**Collection of skin from control and mutant mice at different time points of skin defect development (5-8 days, 15 days, 90 days post tamoxifen injection)**' upon tamoxifen injection, in which the progeny of the following cross will be harvested at different time points:

-Goal 2.1 and Goal 2.2.1 (compounds): Male K14-Cre ESR1/+ x Female $atp6ap2^{Flox/Flox}$ that generates littermates with all interesting genotypes, i.e., control male and female (+/+; $atp6ap2^{Flox/Y}$ or $Flox/+$); male knock-out (K14-Cre ESR1/+; $atp6ap2^{Flox/Y}$) and heterozygous females (K14-Cre ESR1/+; $atp6ap2^{Flox/+}$) For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin.

Goal 2.2.2 (Genetics): Male K14-Cre ESR1/+ x Female $atp6ap2^{Flox/Flox}$; transgene (overexpression) or floxed alleles (loss of function) that generates littermates with all interesting genotypes, in particular males and females $atp6ap2$ mutants within the new genetic background (gain or loss of function of candidate gene) that should restore initial phenotype of males and females $atp6ap2$ mutants.

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

Our previous experiments showed efficient deletion of *atp6ap2*^{Flox} allele when one month-old mice were injected intraperitoneally with 1 mg of tamoxifen for 5 consecutive days. Macroscopic phenotype was then visible at day 15 post tamoxifen injection, with scaly epidermis in regions poor in hair follicle (ears, paws and tail). Then, the phenotype increased till about 6 weeks post-injection, with mice showing alopecia and starting to hatch constantly. Mice of appropriate genotype (littermates) will be therefore sacrificed at the following time points upon tamoxifen injection:

- days 5-8: to define the cell type with intracellular stress and early steps of the immune response
- day 15: to analyse inflammatory response

.... - day 90: to analyse long term effects mainly in the context of restoration experiments ([Goal 2.2 of the project proposal](#)) to prove long term amelioration.

Since *atp6ap2* is located on the X chromosome, mutant males are knock-out animals while heterozygous females are mosaic with virtually 50% of cells expressing wild-type levels of PRR and 50% of cells depleted of PRR. Therefore, most experiments will be performed first with control and knock-out male littermates only. Depending on the findings and on how relevant including females is (importance of showing cell autonomous versus non autonomous effects and dosage effects in females), there will be a Go no-Go moment to decide if females must be included in additional experiments.

In all cases, control and mutant littermates of one month (males in a pilot experiment and females included if relevant (Go no-Go moment)) will be injected intraperitoneally with 1 mg of tamoxifen for 5 consecutive days and they will be euthanized according to directive 2010/63/EU to collect their skin at different time points (5-8 days, 15 days, 90 days) before subsequent processing of the skin. Mice of goal 2.2.1 (see project proposal) will additionally be submitted to administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin, based on literature.

Only cross breeding bearing K14-Cre ESR1 show phenotype (see proposal section 3.4) and only littermates are included in the procedures as being experimental animals.

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

The next tables summarize the number of animals required.

For [Goal 2.1](#), 20 males (10 control and 10 knock-out) are reserved to optimize cell dissociation for ScRNAseq, which requires enzymatic cell dissociation with a high overall cell viability (90%) (enzyme and kinetics of incubation may have to be adjusted). Similar protocol should apply to all different time points, although the genotype may influence cell viability. Mutant mice should therefore be included into this optimization experiment.

Based on our former experience, statistically significant analysis requires three experimental replicates, i.e., independent litters and three technical replicates, i.e., individuals of same genotype (which is usually not obtained within a litter of 6 in average), therefore this must be corrected by increasing experimental replicates: 9 individuals of a genotype (at least from 3 independent litters)/experimental approach. Statistical analysis will be performed with Prism 9 software (GraphPad) using i) a T-test (power set at 80%, p-value ≤ 0.05) when two groups will be compared in each experiment (control and mutant males) or ii) a one-way ANOVA for multiple group comparison (power set at 80%, p-value ≤ 0.05). To reduce the number of animals, same animal will be used for the different experiments (ScRNAseq, validation RNA and validation protein).

Goal 2.1	Skin collection	Gender	Stage
Optimization cell dissociation	10 controls and 10 mutants	male	Da 15
Collection for experiments	9 controls and 9 mutants	male	Day 5
Collection for experiments	9 controls and 9 mutants	female	Day 5
Collection for experiments	9 controls and 9 mutants	male	Day 6
Collection for experiments	9 controls and 9 mutants	female	Day 6
Collection for experiments	9 controls and 9 mutants	male	Day 7
Collection for experiments	9 controls and 9 mutants	female	Day 7
Collection for experiments	9 controls and 9 mutants	male	Day 8
Collection for experiments	9 controls and 9 mutants	female	Day 8
Collection for experiments	9 controls and 9 mutants	male	Day 15
Collection for experiments	9 controls and 9 mutants	female	Day 15

The [Goal 2.2](#) has Go / no -Go moment.

For [Goal 2.2.1.\(compounds\)](#). Compounds (inhibitors/activators, blocking antibodies) specific to downstream signalling candidate pathways will be administered by the appropriate route at different doses, based on literature. Priority will be given to FDA approved compounds. Pilot experiment will be used to define optimal dose (10 mutants will be used to optimize dose). Restoration of macroscopic phenotype at day 15 will be evaluated in the pilot. If no restoration is observed at the different doses tested in the pilot experiment, that will be a no-Go moment. Otherwise, optimal dose will be used to assess statistical significance. Pilot and initial experiment will be performed with control and knock-out males. If restoration shows statistical significance and depending on the findings and on how relevant including females is (importance of showing cell autonomous versus non autonomous effects and dosage effects in females), there will be a Go no -Go moment to decide if females must be included in additional experiments. Twenty compounds maximum will be tested with 5 compounds maximum going through all steps (go moment).

For [Goal 2.2.2.\(genetic background\)](#), 9 control and 9 mutants will be used to estimate genetic restoration at Day 15.

If no restoration is observed, there will be no further experiment. If restoration is observed at Day 15, long term restoration will be assessed up to stage Day 90. If long term restoration is observed female littermates may be included in experiments.

Five genetic background maximum will be tested with 3 background maximum going through all steps (go moment).

Goal 2.2.1 For ONE compounds	Macroscopic restoration? Go no Go moment	Gender	Stages
Optimization doses	10 controls and 10 mutants	Males	Day 15
→ For 20 compounds:	200 controls and 200 mutant males Day 15		
If go moment, collection of	9 controls and 9 mutants	Males	Day 15

Long term	9 controls and 9 mutants	Males	Day 90 max
If go moment, collection of Long term	9 controls and 9 mutants	Females	Day 15
	9 controls and 9 mutants	Feales	Day 90 max
→ For 5 compounds: max 45 → max 45	Control males and 45 mutant males Day 15 and Control females and 45 mutant females Day 15 a	Day and Day	90 max and 90 max

Goal 2.2.1-For ONE genetic background	Macroscopic restoration? Go no Go moment	Gender	Stages
Collection skin	9 controls and 9 mutants	Males	Day 15
→ For 5 background:	45 controls and 45 mutant males Day 15		
If go moment, collection of	9 controls and 9 mutants	Males	Day 90 max
If go moment, collection of	9 controls and 9 mutants	Females	Day 15
	9 controls and 9 mutants	Females	Day 90 max
For 3 background: max 27 max 27	Male Controls and 27 mutant male Day 90 max Female controls and 27 mutant female Day 15	and Day	90

Specified numbers are based on our current knowledg, however these numbers may need to be slightly adapted. Breeding couples are not counted as experimental animals.

B. The animals

Specify the species, origin, life stages, estimated numbers, gender, genetic alterations and, if important for achieving the immediate goal, the strain.

Serial number	Species	Origin	Life stages	Number	Gender	Genetically altered	Strain
1	<i>Mus musculus</i>	In house breeding	1 month old	960	Male/female	specific deletion of atp6ap2 and control littermates	C57BL/6
2	<i>Mus musculus</i>	In house breeding	one month old	324	Male/female	Epidermal-specific deletion of atp6ap2 and control littermates in combination with gain or loss of function in candidate gene	C57BL/6

Provide justifications for these choices

Species	Homologous recombination in <i>Mus musculus</i> has allowed the generation of gain and loss of function models used to study gene's function
Origin	In house breeding of the animal avoids animal transportation
Life stages	Different stages of disease development defined in our former experiments.
Number	For statistically significant analysis (see section A)
Gender	Knock-out males as first steps, heterozygous females if go moment

Genetic alterations	Epidermis-specific deletion of <i>atp6ap2</i> (K14-Cre ESR1). For restoration approach, in a genetic background (gain or loss of function of candidate gene)
Strain	Having a pure genetic background allows eliminating all confounding effects due to differences in the genetic background. Phenotype will come from induced genetic modifications.

C. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

Yes

No > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices

D. Pain and compromised animal welfare

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No

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

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

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

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

The skin defects due to post-natal epidermis-specific deletion of PRR start to be visible with scaly epidermis in skin with low amount of hair follicle (ears, paws and tail) at 15 days post injection of tamoxifen. Therefore, for all time points less than or equal to 15 days, no other adverse effects are expected. The group of mice maintained 90 days will experience discomfort due to skin defects and constant hatching (at least the group of PRR mutants). They will be used exclusively to monitor long term restoration of specific treatment or genetic background. Human endpoints have been defined particularly for this last group of mice. Mice will be observed every other day and will be humanely sacrificed in case the following define end points are reached: visible pain (abnormal posture and/or movement), significant weight loss (> 10%), abnormal behaviour (isolation).

Explain why these effects may emerge.

These effects emerge from the chronic inflammation associated with the deletion of PRR from post-natal epidermis.

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

For mice sacrificed at late time point (90 days), to minimise severity, animals might be euthanized at earliest time point if restoration appears not to be efficient long term or if human endpoints are reached. In mutant mice, first phenotype is observed at day 15 post tamoxifen injection with scaly plaques observed at the level of the ear, paw and tail. If the phenotype is as strong in the 'restored' group that in the mutant group already at day 15, there is no need to keep the mice longer. If phenotypic restoration is observed at early time point (day 15), then this is important to see how strong this restoration is and therefore to keep the mice longer.

E. Humane endpoints

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

No > Continue with question F

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

Mice will be observed in a daily basis and will be humanely sacrificed in case the following define end points are reached: visible pain (abnormal posture and/or movement), significant weight loss (> 10 %), abnormal behavior (isolation).

Indicate the likely incidence.

Very unlikely (estimate 1%)

F. Classification of severity of procedures

Provide information on the experimental factors contributing to the discomfort of the animals and indicate to which category these factors are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe'). In addition, provide for each species and treatment group information on the expected levels of cumulative discomfort (in percentages).

All animals: Mild discomfort due to intraperitoneal injection of tamoxifen daily for 5 days

Animals of Goal 2.2 will experience additional discomfort due to administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin..

All animals (except those harvested at day 90): Mild discomfort due to the intracellular stress and immune response development

Animals harvested at Day 90: Moderate discomfort due to the development of chronic inflammation

All animals will have a 'non recovery' procedure at the specified end point in order to collect tissues to be analysed (sacrificed and tissue collection, subsequently).

Description	Animal species/strain and sex	Number of animals	Discomfort (expected cumulative discomfort) (% of total)	Discomfort is a sum of following procedures
Mice killed at max 15 days post tamoxifen And all control animals killed at 90 days after tamoxifen	Mouse (Male and female)	1140	100% mild	Tamoxifen Euthanasia
Experimental animals killed at day 90 after tamoxifen	Mouse (male and female)	144	100% moderate	Tamoxifen phenotype skin euthanasia
		Total		

G. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement	Phenotypic analysis of PRR deletion involves complex interaction between cell types of epidermis and dermis and the molecular relays are not well established so far and therefore can be determined only <i>in vivo</i> . We have a collaboration with the department of Dermatology of our institution to translate our mouse data to human conditions by using skin cryosections of human skin.
-------------	--

Reduction	The minimum number of mice required to get significant result has been anticipated based on our previous experiment and statistical analyses. To reduce the number of mice used, only male littermates will be used as a first step. Skin samples will be collected and used for the different analyses.
Refinement	Endpoints have been defined to allow humane sacrificed of animals. Experiments will be performed by staff that are highly skilled and experienced with animal handling. As a result, all procedures with the animals will be performed with the greatest care and minimal animal distress will be ensured.

Are adverse environmental effects expected? Explain what measures will be taken to minimise these effects.

No

Yes > Describe the environmental effects and explain what measures will be taken to minimise these effects.

H. Re-use

Will animals be used that have already been used in other animal procedures ?

No > Continue with question I.

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

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

No

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

I. Repetition

Explain for legally required animal procedures what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, describe why duplication is required.

Not applicable

J. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question K.

Yes > Describe this establishment.

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

End of experiment

K. Destination of the animals

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Provide information on the destination of the animals.

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

The procedure used is dedicated to the collection of biological material, which requires to kill the animals before collection.

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

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

Yes > Will a method of killing be used for which specific requirements apply?

No > Describe the method of killing.

Animal will be sacrificed by cervical dislocation.

Yes > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

If animals are killed for non-scientific reasons, justify why it is not feasible to rehome the animals.

Format Niet technische samenvatting

Let op: bij gebruik van dit word-format dient uiteindelijk alsnog het Excel-format te worden ingevuld voordat uw aanvraag vergund kan worden (zie Procesbeschrijving word-document NTS).

Please fill this form out in Dutch. Dit formulier moet ingevuld worden in het Nederlands.

=>Let op de richtlijn is ~500 woorden in totaal<=

Link naar EU Guidance document: [Working document on Non-Technical Project summaries](#)

Link naar CCD toelichting: [Toelichting bij de formulieren projectaanvraag](#)

Tab NTS

Country	NL
Language	NL
EU submission	<input checked="" type="checkbox"/> yes <input type="checkbox"/> no
Title of the project	De rol van de (pro)renine receptor (PRR) in de ontwikkeling en homeostase van de huid. Op weg naar de ontrafeling van ontstekingen veroorzaakt door proteotoxische stress.
NTS identifier	Deze wordt door de CCD ingevuld
NTS national identifier	Deze wordt door EC ingevuld
Duration of the project	60 maanden
Keywords/Trefwoorden	
Keyword 1	Huid
Keyword 2	Stress
Keyword 3	Immuunrespons
Keyword 4	Ontwikkeling
Keyword 5	ontsteking

Purpose(s) of the project
Objectives of the project/ Doel van het project
<i>Describe the objectives of the project (for example, addressing certain scientific unknowns, of scientific or clinical needs). Compulsory! Maximum length is 2500 characters</i>
<p>In dit project doen we onderzoek naar proteotoxische stress. Als reactie op verschillende externe factoren kunnen de eiwitten in onze cellen van vorm veranderen en gaan samenklonteren, waardoor ook de functie van deze eiwitten wordt beïnvloed. Dit proces, ook wel proteotoxische stress genoemd, kan leiden tot chronische ontstekingen. Deze ontstekingen worden gelinkt aan verschillende aandoeningen zoals kanker, neurodegeneratieve ziekten en veroudering. In dit onderzoek ligt de focus voornamelijk op chronische huidziekten, in het bijzonder eczeem.</p> <p>Het doel van het project is dan ook het ontrafelen van de onderliggende moleculaire en cellulaire mechanismen die leiden tot proteotoxische stress-geassocieerde ziekten. Het is reeds onderzocht dat in eczeem aanhoudende proteotoxische stress kan zorgen voor een immuunrespons en chronische ontstekingen. We hebben unieke muismodellen ontwikkeld die een belangrijke receptor missen (de (pro)renine receptor, hierna PRR genoemd) als gevolg hiervan ontstaat er intracellulaire stress. Dit model kan hierdoor ook de vroege en late stadia van de immuunrespons, die hieruit ontstaat, nabootsen. Ze zullen worden gebruikt om:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) De moleculaire en cellulaire mechanismen te definiëren die leiden tot proteotoxische stress en de vroege immuunrespons die daarmee samenhangt. (2) Te definiëren hoe continue proteotoxische stress leidt tot chronische ontstekingen en wat de mediatoren zijn van de immuunrespons die hiermee samenhangt.

Uiteindelijk zullen we ook potentiële stoffen evalueren die ontstekingen kunnen voorkomen. Op deze manier kunnen we het proces rond proteotoxische stress beter begrijpen, waardoor op den duur nieuwe aangrijpingspunten voor therapieën tegen chronische huidziekten gevonden kunnen worden.

Potential benefits likely to derive from this project / Mogelijke opbrengsten van het project

What are the potential benefits likely to derive from this project? Explain how science could be advanced, or humans, animals or environment may ultimately benefit from the projects. Where applicable, differentiate between short-term benefits (within the duration of the project) and long-term benefits (which may accrue after the project is finished). Compulsory! Maximum length is 2500 characters

De voordelen die waarschijnlijk zullen voortkomen uit dit project: kennis over de chronische ontsteking die voortkomen uit intracellulaire stress. Hiermee kunnen uiteindelijk ook nieuwe behandelingen uitgedacht worden. We hopen daarbij een goed preklinisch model voor humane eczeem te ontwikkelen. Bovendien moet dit project inzicht geven in hoe verschillende immuuncellen worden aangetrokken naar de huid tijdens de embryonale ontwikkeling, wat over het algemeen nogal wat discrepanties vertoont in de literatuur.

Omdat er nog niet veel bekend is over proteotoxische stress en de ontstekingen die hieruit voortkomen, kan er door dit model ook een basis worden gelegd voor onderzoek naar andere proteotoxische stress-geassocieerde ziekten.

Predicted harms

In what procedures will the animals typically be used / Welke handelingen ondergaan de dieren?

In what procedures will the animals typically be used (for example, injections, surgical procedures)? Indicate the number and duration of these procedures. Compulsory! Maximum length is 2500 characters

Dieren zullen de volgende handelingen ondergaan:

- (1) Verzameling van huid van controle- en mutante muizenembryo's (respectievelijk met en zonder PRR) in verschillende ontwikkelingsstadia. Dieren zullen (via de moeder) soms wel en soms niet behandeld zijn met stoffen die chronische ontstekingen kunnen voorkomen of behandelen.
- (2) Verzameling van huid van controle- en mutante (respectievelijk met en zonder PRR) muizen op verschillende tijdstippen van ontwikkeling van huiddefecten (5-8 dagen, 15 dagen, 90 dagen na injectie van tamoxifen). Dieren zullen soms wel en soms niet behandeld zijn met stoffen die chronische ontstekingen kunnen voorkomen of behandelen

Handeling (1) en (2) zijn onafhankelijke procedures waarbij dieren van verschillende genetische achtergronden betrokken zijn..

Expected impacts/adverse effects on the animals / Welk ongerief ondergaan de dieren en geef daarbij de verwachte ongeriefsclassificatie (terminaal, licht, matig of ernstig) aan.

What are the expected impacts/adverse effects on the animals for example pain, weight loss, inactivity/reduced mobility, stress, abnormal behaviour, and the duration of those effects? Compulsory! Maximum length is 2500 characters

We verwachten alleen negatieve gevolgen in de muizen waar het PRR-gen ontbreekt. Deze muizen kunnen vanaf 15 dagen tot 6 weken na het verwijderen van het PRR-gen veranderingen van de huid vertonen. De verschijnselen die worden gezien zijn o.a. haaruitval en jeuk. Vanwege dit lijden worden de muizen zo kort mogelijk na het verschijnen van deze huidveranderingen onderzocht.

In sommige experimenten worden vrouwelijke muizen bevrucht en vervolgens gedood om de embryo's in verschillende ontwikkelingsstadia te verkrijgen. In andere experimenten worden dieren behandeld met een stof (Tamoxifen) doormiddel van injectie. Bij sommige muizen kunnen hierdoor ontstekingen in de huid ontstaan, wat kan zorgen voor pijn en jeuk bij de dieren. Alle dieren worden gedood na afloop van de experimenten.

Het ongerief dat de dieren ondervinden kan als volgt worden ingedeeld:

Licht ongerief: 96,6 %

Matig ongerief: 3,4 %

Reasons for the planned fate of the animals after the procedure/ Beschrijf het eindpunt van de dieren en waarom dat zo gekozen is.

Please provide reasons for the planned fate of the animals after the procedure. Compulsory! Maximum length is 2500 characters

De muizen worden zullen worden gedood om de huid te verzamelen en er verdere experimenten mee uit te voeren. Daarnaast worden bij het verkrijgen van de muizenembryo's ook de moeders gedood.

Application of the Three Rs

1. Replacement/Vervanging

State which non-animal alternatives are available in this field and why they cannot be used for the purposes of the project. Compulsory! Maximum length is 2500 characters

Waar mogelijk gebruiken wij menselijke huid (die met toestemming verkregen is), voor experimenten in het laboratorium. Deze methode is echter niet uitgebreid genoeg. Het mechanisme wat in dit onderzoek bestudeerd wordt omvat namelijk veel verschillende celtypen (waaronder meerdere soorten huid- en immuuncellen) die in nauw contact staan en op elkaar reageren. Dit complexe systeem kan het beste onderzocht worden in een levend organisme. Een kweekbakje met cellen voldoet hierom niet. Daarnaast kan in een levend organisme ook onderzocht worden of de stoffen die toegediend worden, ook een effect hebben op normale cellen.

2. Reduction./Vermindering

Explain how the numbers of animals for this project were determined. Describe steps that have been taken to reduce the number of animals to be used, and principles used throughout the project to minimise the number of animals used consistent with scientific objectives. Those practices may include e.g. pilot studies, computer modelling, sharing of tissue and reuse. Compulsory! Maximum length is 2500 characters

Voordat er onderzoek wordt gedaan op muizen, zal het effect van de PRR mutatie en de toegediende stoffen eerst worden onderzocht op cellen in een kweekschaal. Ter vermindering van het aantal proefdieren hebben we berekend hoeveel dieren er statistisch gezien minimaal nodig zijn. Ten slotte wordt er zoveel mogelijk van de huid van de muizen gebruikt. Deze wordt vervolgens gebruikt voor verschillende soorten experimenten

3. Refinement/Verfijning

Give examples of the specific measures (e.g., increased monitoring, post-operative care, pain management, training of animals) to be taken, in relation to the procedures, to minimise welfare costs (harms) to the animals. Describe the mechanisms to take up emerging refinement techniques during the lifetime of the project. Compulsory! Maximum length is 2500 characters

Tijdens het onderzoek worden de muizen uitvoerig in de gaten gehouden. Zodra de muizen huidveranderingen vertonen worden ze zo snel mogelijk onderzocht. De muizen krijgen huisvesting volgens vaste richtlijnen. Van tevoren wordt een humaan eindpunt bepaald, om te voorkomen geval dat het dier teveel ongerief ondergaan zullen zij geëuthanaseerd worden wanneer dit behaald wordt. Dit zal naar verwachting echter bijna nooit voorkomen.

Explain the choice of species and the related life stages/ Beschrijf de keuze voor de soort, het diertype en de leeftijdsstadia.

Compulsory! Maximum length is 2500 characters

De muis wordt gebruikt omdat deze makkelijk genetisch gemodificeerd kan worden. Daarnaast is het voor dit onderzoek essentieel om een dier met een huid te gebruiken. Hierdoor zijn minder complexe organismen zoals insecten of vissen niet geschikt voor dit onderzoek. Wij bouwen voort op de ruime kennis die wij hebben van muizen, de huid en het immuunsysteem en hebben hierdoor dit model kunnen ontwikkelen.

De verschillende levensfasen die hier gebruikt zijn, zijn gebaseerd op onze eerdere experimenten. Proteotoxische stress en de beginfase van de immuunrespons zullen worden bestudeerd tijdens de ontwikkeling (E13.5 tot E18.5). De volledige immuunrespons en chronische ontsteking worden onderzocht na de geboorte omdat het immuunsysteem dan volledig ontwikkeld is.

Tab Purpose of the project

Basic research: Sensory Organs (skin, eyes, and ears) [PB9]

Maintenance of colonies of established genetically altered animals, not used in other procedures [PG43]

Choose a purpose

Choose a purpose

Choose a purpose

Tab Expected harms

What species and numbers of animals are expected to be used? What are the expected severities and the numbers of animals in each severity category (per species)?

Estimated numbers per severity				
<i>Please fill in all categories for selected species with whole numbers (0 or higher)!</i>				
Species	Non-recovery	Mild	Moderate	Severe
Mice (Mus muscules) [A1]	0	4096	144	0
Choose a species				

Tab Fate of animals kept alive

What will happen to the animals kept alive at the end of the procedure?

Estimated numbers per severity			
<i>Please fill in all categories for selected species with whole numbers (0 or higher)!</i>			
Species	Reused	Returned	Rehomed
Mice (Mus muscules) [A1]	N/A	N/A	N/A
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			

Van: 5.1 lid2h
Verzonden: donderdag 2 juni 2022 10:24
Aan: 5.1 lid2h
Onderwerp: Verzoek om advies over projectvergunningaanvraag AVD 5.1 lid 2 689 202216092
Bijlagen: PRR_appendix 2_20220601.docx; PRR_NTS_20220601.docx; PRR_aanvraagformulier_20220601.docx; PRR_projectproposal_20220601.docx; PRR_appendix 1_20220601.docx

Geachte leden van 5.1 lid2h

De Centrale Commissie Dierproeven (hierna: CCD) verzoekt u in het kader van vergunningverlening advies te geven over het project met als titel: "Role of the (Pro) renin receptor (PRR) in skin development and homeostasis. Towards deciphering inflammation induced by proteotoxic-stress." en aanvraagnummer: AVD 5.1 lid2h 202216092.

Uw commissie wordt verzocht op grond van artikel 10.a.2 van de Wet op de dierproeven de aanvraag te beoordelen en een ethische toetsing uit te voeren waarbij wordt afgewogen of de doelstelling van het project, de verwachte voordelen voor mens, dier of milieu en de haalbaarheid van de doelstellingen, het gebruik van dieren en de schade die zal worden toegebracht aan de dieren in de vorm van lijden, pijn en angst kan rechtvaardigen.

Graag ontvangen wij van u bericht dat deze e-mail goed is ontvangen en wanneer u dit advies in de vergadering gaat bespreken.

Voor het in te dienen advies dient de DEC gebruik te maken van de meest actuele versie van het op de website van de CCD gepubliceerde Format DEC-advies en de toelichting daarbij. U dient deze aanvraag vertrouwelijk te behandelen. Voor de communicatie met de CCD dient u gebruik te maken van FileSecure.

De CCD verzoekt u uiterlijk binnen 20 werkdagen, na 02-06-2022, uw advies bij de CCD in te dienen. Indien de aanvraag door uw commissie niet in behandeling kan worden genomen, dient u dit per ommekeer per e-mail aan de CCD te melden.

Ingeval uw commissie tussentijds aanvullende informatie wil inwinnen bij de aanvrager wordt de termijn opgeschort en geeft u in uw advies aan wanneer dit is geweest. Opschorting van de adviestermijn vindt niet plaats ingeval u ten behoeve van uw advies een onafhankelijk extern expert raadpleegt. Mocht u verwachten door een andere reden dan opschorting uw advies later dan 20 werkdagen na 02-06-2022 bij de CCD in te dienen, dan verzoeken wij u dit direct aan de CCD te melden.

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,
Centrale Commissie Dierproeven

www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag
.....

T: 0800 789 0789
E: info@zbo-ccd.nl

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD **5.1 lid2h** 202216092
2. Titel van het project: Role of the (Pro) renin receptor (PRR) in skin homeostasis. Towards deciphering inflammation induced by proteotoxic stress and how relevant this is to the pathogenesis of atopic dermatitis in human.
3. Titel van de NTS: De rol van de (pro)renine receptor (PRR) in de homeostase van de huid. Op weg naar de ontrafeling van ontstekingen veroorzaakt door proteotoxische stress en hoe dit relevant is voor het ontstaan van eczeem.
4. Type aanvraag:
 - ✓ nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: **5.1 lid2h**
 - telefoonnummer contactpersoon: **5.1 lid2h**
 - e-mailadres contactpersoon: **5.1 lid2h**
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ✓ ontvangen door DEC: 09-06-2022
 - ✓ aanvraag compleet: 09-06-2022
 - ✓ in vergadering besproken: 09-06-2022 & 29-09-2022
 - anderszins behandeld
 - ✓ termijnonderbreking(en) van / tot: 23-06-2022 t/m 05-09-2022
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - ✓ aanpassing aanvraag: 05-09-2022
 - ✓ advies aan CCD: 27-10-2022
7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.
8. Eventueel horen van aanvrager
 - Datum: 29-09-2022
 - Plaats: online
 - Aantal aanwezige DEC-leden: 6 leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager: **5.1 lid2e**
 - Strekking van de gestelde vragen:

De DEC heeft bij de aanvrager aanvullende informatie ingewonnen met betrekking tot de keuze voor het model, het ongerief van de embryo's, de humane eindpunten voor de dieren met een huidfenotype en de 3 replicaten.
 - Het horen van de aanvrager heeft niet geleid tot aanpassing van de aanvraag.

9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: 23-06-2022

- Strekking van de gestelde vragen:

De DEC heeft bij de aanvrager aanvullende informatie ingewonnen met betrekking tot de focus van het onderzoek, het type compounds dat gebruikt wordt, de go/no-go momenten, de selectiecriteria voor de te gebruiken compounds, de berekening van het aantal benodigde nestjes/dieren, de toedieningsroute en frequentie, het ongerief van de embryo's, het ongerief als gevolg van de toediening van compounds en de humane eindpunten. Daarnaast heeft de DEC verzocht de NTS aan te passen.

- De antwoorden hebben wel geleid tot aanpassing van de aanvraag

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

N.v.t.

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunning plichtig (dierproeven in de zin der wet)

2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.

3. De DEC is competent om over deze projectaanvraag te adviseren. De benodigde expertise op dit wetenschappelijke terrein is aanwezig binnen de DEC.

4. Geen van de DEC leden is betrokken bij het betreffende project.

C. Beoordeling (inhoud)

1. De aanvraag betreft vervolgonderzoek in muismodellen naar de gevolgen van de **afwezigheid van pro renine receptoren (PRR)** tijdens de embryonale ontwikkeling van de huid en postnataal de gevolgen voor huid homeostase. Eerder onderzoek heeft laten zien dat in muizenembryos met een deletie van PRR er vanaf E11.5 pathologische veranderingen optreden in de cel samenstelling van de epidermis en in het lymfatische systeem in de dermis (hyperplasie en bloed – lymfe shunts) en dat dit sterfte veroorzaakt rond E15.5. Daarnaast is in dit muismodel ook aangetoond dat het ontbreken van PRR in postnatale huid intracellulaire proteostase verstoort, er is sprake van proteotoxische stress hetgeen een TH2 immuunrespons induceert wat resulteert in chronische huidontsteking. Histologisch en immunologisch vertoont deze huidontsteking veel overeenkomsten met atopische dermatitis bij de mens. Dat maakt dat de onderzoekers dit (PRR deletie) muismodel willen inzetten voor pathogenese onderzoek van atopische dermatitis. Het onderzoek richt zich op het nauwkeuriger karakteriseren van de proteotoxische stress, het ontrafelen van de cellulaire en moleculaire mechanismen die leiden tot proteotoxische stress en het ontrafelen van de moleculaire cascade die volgt op de proteotoxische stress en de TH2 type immuunrespons induceert. Waar mogelijk willen de onderzoekers compounds toepassen, als verificatie en validatie van de (te ontcijferen) moleculaire mechanismen, die de cascade van pathologische veranderingen kunnen blokkeren, voorkomen of zelfs kunnen terugdraaien, m.a.w. regeneratie van pathofysiologische veranderingen. Deze benadering, validatie met compounds, was niet voor alle DEC leden direct helder en duidelijk maar de discussie hierover en de

mondelijke toelichting van de onderzoeker leverde uiteindelijk wel meer duidelijkheid op. Naar mening van de DEC is er een logische opbouw van de onderzoeksopzet en is er een duidelijke samenhang tussen de twee beschreven doelen en bijbehorende onderzoeklijnen. Het is voor de DEC leden duidelijk dat voor het beantwoorden van de onderzoeksvragen het gebruik van deze specifieke muismodellen onvermijdelijk is. De aanvraag betreft de inzet van 8464 muizen (6420 embryo's en 2044 volwassen dieren) waarvan 98,5% mild en 1,5% cumulatief matig ongerief zullen gaan ondervinden van de interventies. De haalbaarheid van de doelstellingen (binnen de termijn van vijf jaar) is volgens de DEC, gezien de aanwezige kennis, het beschikbare budget, de personele capaciteit, de ruime ervaring met PRR onderzoek, de samenwerking met diverse onderzoeksgroepen en de eerder behaalde onderzoeksresultaten voldoende onderbouwd. De DEC is ervan overtuigd dat op zorgvuldige wijze, met behulp van heldere go/no-go momenten, de voortgang van het project beoordeeld wordt waardoor er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande beoordeling van de inhoud is de DEC van mening dat de aanvraag in voldoende mate voldoet aan de definitie van een project, de aanvraag overeenkomsten vertoont met voorbeeld **3** uit de handreiking, het projectvoorstel navolgbaar is en dat daarmee de vergunningaanvraag ethisch toetsbaar is.

2. Voor zover de DEC kan beoordelen is er geen sprake van tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

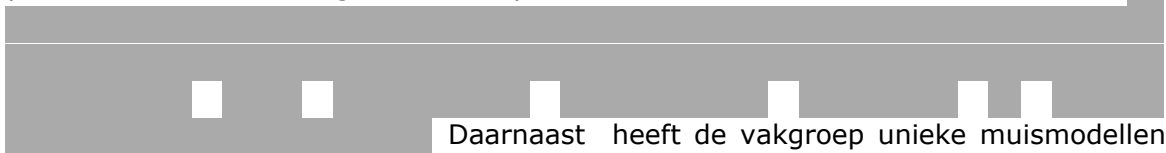
4. Het directe doel van het project is het ontcijferen van de moleculaire en cellulaire mechanismen die leiden tot proteotoxische stress-gerelateerde aandoeningen. Met als uiteindelijke doel het verwerven van kennis over de chronische ontsteking als reactie op intracellulaire stress en over hoe relevant deze is voor de pathogenese van atopische dermatitis. Concreet gaat het om de validatie van dit (PRR deletie) muismodel als preklinisch onderzoeksmodel voor atopische dermatitis bij de mens. De DEC is van mening dat er een duidelijke relatie is tussen het directe doel en het uiteindelijke doel.
5. De belangrijkste belanghebbenden in dit project zijn de proefdieren, de onderzoekers, patiënten met atopische dermatitis en de maatschappij.
Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: Zij worden gefokt, gebruikt in experimentele procedures die ongerief veroorzaken en uiteindelijk gedood voor dit project.
Waarden die voor de onderzoekers bevorderd worden: Dit project zal waardevolle kennis opleveren over de gevolgen van de afwezigheid van PRR tijdens de embryonale huidmorfogenese en voor de homeostase van de postnatale huid. De carrière mogelijkheden van de wetenschappers kunnen verbeteren door de nieuwe kennis te publiceren of te presenteren op wetenschapscongressen.
Waarden die voor patiënten bevorderd worden: zij kunnen op lange termijn baat hebben bij de wetenschappelijke bevindingen als er aangrijpingspunten worden gevonden voor een therapeutische benadering of interventie. Atopische dermatitis is geassocieerd met chronische huidontsteking maar de details van de pathogenese van de chronische ontsteking zijn nog niet volledig opgehelderd. Met deze aanvraag hoopt

men de vroege stadia van de respons bij muizen te kunnen karakteriseren om markers te vinden die ook terug te vinden zijn in huidmonsters van menselijke oorsprong. Als de hypothese niet verworpen wordt dan kunnen bijvoorbeeld remmers van proteotoxische stress wellicht gunstig zijn voor patiënten met atopische dermatitis. Waarden die voor de maatschappij bevorderd worden: Effectievere behandeling van chronische huidontsteking kan resulteren in daling van de ziektelast en de daaraan gerelateerde zorgkosten.

6. Er is geen aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken.

Proefopzet en haalbaarheid

7. Naar overtuiging van de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen (budget en capaciteit) om de projectdoelstelling met de gekozen strategie binnen de gevraagde termijn te kunnen realiseren. Dit projectvoorstel voor proefdieronderzoek is gebaseerd op eerder behaalde onderzoeksresultaten.



Daarnaast heeft de vakgroep unieke muismodellen ontwikkeld waarmee de functie van epidermale PRR tijdens de embryonale ontwikkeling en in het behoud van postnatale huidhomeostase kan worden bestudeerd.

8. De DEC is er van overtuigd dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten en geen hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten in de weg zullen staan. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder gekozen en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de **5.1 lid2h** tot het behalen van de doelstelling binnen de looptijd van het project.

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Alle dieren worden gefokt bij een geregistreerd fokbedrijf voor het gebruik in dierproeven, er is geen sprake van een afwijkende huisvestingslocatie, hergebruik, bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, zwerfdieren en/of dieren uit het wild. Er wordt geen anesthesie of analgesie toegepast. De dieren worden gedood volgens een voor de diersoort passende dodingsmethode die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.
10. De DEC is ervan overtuigd dat de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn. Het proefdiercentrum van de vergunninghouder beschikt over uitstekende faciliteiten en uitsluitend bevoegd en competent personeel zal zorg dragen voor de verzorging van de dieren en de uitvoering van de dierproeven.
11. De DEC heeft zich ervan verzekerd dat de aanvrager al het mogelijke heeft gedaan om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen. Een merendeel van de dieren zal gedood worden zonder

voorafgaande handelingen en zullen hierdoor licht ongerief ondervinden. Verder zal een deel van de dieren cumulatief licht ongerief ondervinden als gevolg van de injectie(s). Een klein deel (1,5% van het totaal) zal cumulatief maximaal matig ongerief ondervinden als gevolg van het fenotype. De DEC acht dit een realistische inschatting en weergave van het ongerief.

12. De integriteit van dieren wordt zowel fysiek als gedragsmatig aangetast. Voor het beschreven onderzoek zullen genetisch gemodificeerde muizen worden gebruikt. Deze muizen zullen tijdens de embryonale ontwikkeling een afwijkende huid en -lymfestelsel ontwikkelen en merendeels vroegtijdig (voor het einde van de dracht) dood gaan. Bij de volwassen muizen ontstaan chronische ontstekingen in de huid wat onder andere kan leiden tot haaruitval en jeuk. Hierdoor zullen de dieren mogelijk minder natuurlijk gedrag vertonen. Daarnaast worden de dieren gedood.
13. Voor de volwassen muizen wordt voor 15 dagen na tamoxifen toediening geen nadelige effecten verwacht. De eerste fenotype verschijnselen, o.a. schilferige huid van de oortjes, worden vanaf dag 15 (post tamoxifen) zichtbaar. De humane eindpunten voor de dieren die langer dan 15 dagen zitten zijn naar inziens van de DEC zorgvuldig beschreven. Ook is de inschatting van de incidentie met betrekking tot het bereiken van een humaan eindpunt zorgvuldig en realistisch beschreven in de projectaanvraag.

3V's

14. In het project wordt de noodzaak voor het gebruik van proefdieren duidelijk onderbouwd. De moleculaire mechanismen van PRR-deletie kunnen alleen *in vivo* worden ontcijferd, omdat ze interacties tussen celtypen van epidermis en dermis omvatten. Daarnaast vertonen de momenteel beschikbare 3D-huidmodellen verminderde barrière-eigenschappen en weerspiegelen niet de complexiteit van de huid. De DEC is ervan overtuigd dat er geen alternatieven beschikbaar zijn voor het voorgestelde gebruik van intacte dieren om de doelstelling van dit project te realiseren.
15. In het project wordt tegemoet gekomen aan "het verminderen van proefdieren beginsel". Voordat er onderzoek wordt gedaan op muizen, zal het effect van de afwezigheid van de PRR en de toegediende stoffen eerst worden onderzocht op cellen in een kweekschaal. Naar inzien van de DEC zijn de beschreven go/no-go momenten realistisch, helder en eenduidig omschreven, waardoor er geen onnodig onderzoek zal worden uitgevoerd. Daarnaast zullen de verzamelde huidmonsters gebruikt worden voor verschillende analyses. De DEC acht het maximale aantal te gebruiken dieren realistisch ingeschat.
16. De uitvoering van het project is in overeenstemming met de vereisten van verfijning van dierproeven en is zo opgezet dat de dierproeven met zo min mogelijk ongerief worden uitgevoerd. Bekwaam personeel is verantwoordelijk voor de uitvoering van de proeven en het monitoren van de dieren. De DEC is ervan overtuigd dat de desbetreffende dierproeven zo humaan mogelijk zullen worden uitgevoerd.
17. Het betreft hier geen wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Voor de experimenten in bijlage 1 zullen zowel mannelijke als vrouwelijke dieren worden gebruikt. Voor bijlage 2 zullen de meeste experimenten eerst worden uitgevoerd met alleen controle- en knock-out mannelijke muizen. Afhankelijk van de bevindingen en hoe relevant het opnemen van vrouwelijke muizen is, zal er een Go no-Go moment zijn om te beslissen of vrouwtjes moeten worden opgenomen in aanvullende experimenten. Dit is naar inziens van de DEC voldoende wetenschappelijk onderbouwd
19. De dieren worden in het kader van het project gedood, om de huid te verzamelen en er verdere experimenten mee uit te voeren. Daarnaast worden bij het verkrijgen van de muizenembryo's ook de moeders gedood. De dieren worden gedood volgens een voor de diersoort passende dodingsmethode die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.
20. Alle dieren worden gedood om wetenschappelijke redenen. Herplaatsing of hergebruik is niet mogelijk.

NTS

21. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd. De NTS voldoet daarmee aan de eisen zoals gesteld in artikel 10.a.1.7 van de Wod.

D. Ethische afweging

1. Rechtvaardigt het onderzoek dat gericht is op het ontrafelen van de moleculaire en cellulaire mechanismen van intracellulaire proteotoxische stress alsook de mechanismen van het induceren van een immunologische door proteotoxische stress de inzet van 6420 muizen, waarvan 6420 embryo's (>13.5) die allemaal mild ongerief zullen ondervinden en 2044 volwassen muizen waarvan 98,5% mild ongerief zullen ondervinden en 1,5% cumulatief matig ongerief?
2. De belangrijkste belanghebbenden in dit project dat gericht is op het ontrafelen van de moleculaire en cellulaire mechanismen van intracellulaire proteotoxische stress alsook de mechanismen van het induceren van een immunologische door proteotoxische stress zijn de proefdieren de betrokken onderzoekers, de patiënten en de samenleving
Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: een nadeel. De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de genetische modificatie en de muizen zullen licht (98,5% van de dieren) tot matig (1,5%) ongerief ondervinden.
Waarden die voor de onderzoekers bevorderd worden: mogelijk voordeel. Er zijn al veelbelovende resultaten behaald in voorgaande onderzoeken en de voorgestelde studies kunnen leiden tot enerzijds meer kennis over fundamentele pathogenetische aspecten van AD maar ook omtrent de validatie van het PRR deletie muizenmodel als onderzoeksmodel voor AD. Hierdoor zullen de wetenschappers nieuwe kennis verkrijgen wat kan uitmonden in publicaties waardoor hun carrièremogelijkheden kunnen verbeteren.
Waarden die de patiënten bevorderd kunnen worden: mogelijk voordeel door de beschikbaarheid van nieuwe kennis omtrent de pathogenese van AD kan er nieuw perspectief ontstaan op nieuwe behandelingsstrategieën waardoor de individuele

ziektelast zal afnemen en de kwaliteit van leven toenemen.

Waarden die voor de samenleving bevorderd kunnen worden: een mogelijk voordeel: effectievere behandeling van AD patiënten zal resulteren in daling van de zorgkosten en verzuimkosten.

De DEC leden zijn van mening dat het projectvoorstel en de antwoorden op de gestelde vragen nog onvoldoende duidelijkheid hebben opgeleverd over met name de berekeningen van het aantal dieren, de toepassing van compounds en de overeenkomst tussen het muismodel met PRR deletie en AD bij de mens. Om die reden is de aanvrager gevraagd om een mondelinge toelichting te geven tijdens de DEC vergadering. De toelichting en de daarop volgende discussie heeft ertoe geleid dat DEC leden wel hun individuele ethische afweging konden maken. De DEC leden zijn niet unaniem maar wel in meerderheid van mening dat de belangen van de AD patiënten, de samenleving en de onderzoekers groter dan die van de proefdieren.

3. Het belang van PRR receptoren voor een normale ontwikkeling van de huid en voor het behoud van huidhomeostase is in voorgaande studies vastgesteld. De pathologische huidveranderingen die optreden bij afwezigheid van PRR vertonen, histologisch en immunologisch, overeenkomst met de veranderingen in de huid bij Atopische dermatitis (AD) patiënten. Door het vergaren van fundamentele kennis over de cascade van pathofysiologische processen die optreden in de huid van het PRR deletie muismodel hoopt men meer kennis te verkrijgen over de pathogenese van AD. Nieuwe kennis over de pathogenese van AD biedt wellicht mogelijkheden om nieuwe behandelingsstrategieën te ontdekken. Volgens huidartsen is AD niet alleen een veel voorkomende maar ook een ondermijnende huidaandoening waar nog onvoldoende behandelingen voor beschikbaar zijn, m.a.w. er is behoefte aan verdieping van kennis over de pathogenese en aan aanknopingspunten voor mogelijk nieuwe behandelingen. Dit rechtvaardigt volgens de meerderheid van de DEC leden vervolgonderzoek in PRR deletie muismodellen. Deze DEC leden zijn overtuigd van het maatschappelijk – en wetenschappelijk belang van het beschreven onderzoek. De ethische afweging door DEC leden levert geen consensus op, de meeste DEC leden zijn van mening dat de belangen van de patiënten, de samenleving en de onderzoekers zwaarder wegen dan de belangen van de proefdieren; deze DEC leden geven een positief advies.

Deze DEC leden zijn overtuigd van het belang van de doelstellingen van dit project. Naar inziens van deze DEC leden beschrijft de aanvraag belangrijk onderzoek, dat zowel maatschappelijk als ook wetenschappelijk zeer relevant is. Deze DEC leden zijn van mening dat:

- de waarden die voor de patiënten, de samenleving en de onderzoekers bevorderd kunnen worden zwaarder wegen dan de waarden die voor de proefdieren in het geding zijn
- de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstelling en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project
- dat de onderzoeksgroep voldoende kennis en ervaring heeft om met de gekozen onderzoeksstrategie en met de voorgestelde dierproeven de doelstelling te behalen en dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om het ongerief van de dieren te beperken.
- de doelstelling niet zonder het gebruik van proefdieren behaald kan worden en acht het gebruik van proefdieren en het daarmee samenhangende ongerief bij de dieren ethisch gerechtvaardigd.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

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

- De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
 - Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
 - Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
 - Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...
- De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
 - De vaststelling dat het project niet vergunning plichtig is om de volgende redenen:...
 - De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...
 - De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt in de DEC.

Eén van de DEC leden komt tot een negatief advies: *"Hieronder geef ik mijn inschatting van het wetenschappelijke en maatschappelijke belang van het voorgestelde onderzoek en formuleer ik de twee belangrijkste bezwaren die ik tegen het onderzoek heb, en die mijn negatieve advies motiveren.*

Het belang van het onderzoek schat ik als gemiddeld in. Het wetenschappelijk belang is dat dit onderzoek kan bijdragen aan meer begrip van de mechanismen achter huidaandoeningen, in het bijzonder atopische dermatitis (AD) maar ook psoriasis en wellicht huidaandoeningen meer in het algemeen. Dit wetenschappelijke belang zie ik echter niet los van het maatschappelijke belang van dit onderzoek. De verwachte wetenschappelijke opbrengst van dit onderzoek heeft in mijn optiek waarde voor zover het (in combinatie met andere studies in dit domein) uiteindelijk bijdraagt aan de ontwikkeling van meer effectieve therapieën voor huidaandoeningen – ik zie geen grote waarde in de wetenschappelijke opbrengst in zichzelf, los van een eventuele vertaling naar therapieën. Het ontwikkelen van meer effectieve therapieën voor huidaandoeningen dient zeker een relevant maatschappelijk belang. Volgens een systematische review en meta-analyse (Birdi et al. 2020) heeft AD een significante invloed op de kwaliteit van leven (QoL) van patiënten, met name door symptomen als jeuk, ontsteking en slapeloosheid; deze symptomen zijn meer van invloed dan de impact op het uiterlijk. Volgens hetzelfde onderzoek is er ook een significante negatieve relatie tussen de ernst van de aandoening en QoL, maar lopen de scores in verschillende onderzoeken nogal uiteen – hoe zwaar ernstigere vormen van AD precies op de QoL drukken en in welke mate bestaande therapieën effectief zijn wordt (mij) dan ook niet helemaal duidelijk. Desondanks accepteer ik dat het ontwikkelen van therapieën een relevant maatschappelijk belang dient, vooral ook gezien door de hoge prevalentie van huidaandoeningen zoals atopische dermatitis. Dit belang is denk ik niet zo groot als voor aandoeningen met een eveneens hoge prevalentie en een ernstiger ziekteverloop, maar toch substantieel.

Ik heb echter bezwaar tegen, ten eerste, het model waarvan dit onderzoek gebruik wil maken. Zoals ik het begrijp is het plan genetisch aangepaste muizen te ontwikkelen die al als embryo een aandoening ontwikkelen die qua symptomen op AD lijkt. In de eerste fase van het onderzoek zou worden gekeken hoe de aandoening

zich in verschillende fasen in de embryo's manifesteert (met uiteenlopende uitleesparameters) en in de tweede fase of er stoffen toegediend kunnen worden die de ontwikkeling van de aandoening kunnen stoppen of remmen. Zoals ook in onze DEC vergaderingen over deze aanvraag besproken, is dit wetenschappelijk gezien een ingewikkeld model: de aandoening ontwikkelt zich op een heel andere manier in de muizen, waar de aandoening door specifieke genetisch aanpassingen geïnduceerd wordt, dan bij mensen, waar niet zo een duidelijke genetische oorzaak voor AD te vinden is. In de latere stadia zouden de mechanismen tussen mens en muismodel op elkaar moeten lijken, maar wetenschappelijk gezien is het model in elk geval niet straightforward. Bovendien roept het model in mijn optiek ethische bezwaren op. Naar verwachting zullen 10% van de embryo's van 13,5 dag oud, 30% van de embryo's van 15,5 dag oud, en 90% van de embryo's van 18,5 dag oud door de aandoening komen te overlijden. Op de overleden embryo's kunnen als ik het goed begrijp niet altijd wetenschappelijke experimenten uitgevoerd worden: zeker als het jongere embryo's betreft zijn ze vaak niet meer terug te vinden. Daarom moeten er méér embryo's 'gegeneerd' worden voor de wetenschappelijke doelstelling van het onderzoek en is de relatieve hoeveelheid (niet-)overleden embryo's een belangrijke uitkomstmaat om de effectiviteit van therapeutische stoffen te bepalen. Dit zie ik als een zeer onsubtiele en onwenselijke aanpak om de bedoelde huidaandoeningen te onderzoeken, die bij mensen immers hele andere en minder dodelijke uitkomsten hebben. Bovendien is – volgens het antwoord van de onderzoeker zelf op mijn vraag hierover – niet duidelijk in welke mate de embryo's ongerief van hun fenotype en overlijden ondervinden. De onderzoeker stelt dat dit moeilijk te bepalen is en verder dat de meeste embryo's al relatief jong overlijden (rond 15,5 dag oud). Een muizenembryo ontwikkelt zich echter in ongeveer 21 dagen, en muizen van 15,5 dag zijn dus naar mijn idee relatief ver ontwikkeld; daarnaast overlijdt 30% van de embryo's tussen de 15,5e en 18,5e dag. Daarom kan mijns inziens niet worden aangenomen dat de embryo's geen ongerief zullen ervaren. Dat de mate waarin embryo's zullen lijden zo onduidelijk is, zie ik als belangrijk probleem van deze onderzoeksopzet. Wellicht is er wetenschappelijk gezien op dit moment geen beter model – daar kan ik niet over oordelen – maar dat betekent niet dat de nadelen van dit model dus geaccepteerd moeten worden.

Een tweede bezwaar tegen dit onderzoek is dat de berekeningen van de aantallen benodigde dieren en de go/no-go momenten onduidelijk zijn gebleven. Hoewel de DEC algemeen de indruk had dat de onderzoekers goed over de onderzoeksopzet hadden nagedacht en op basis daarvan aannam dat de berekeningen en go/no-go momenten ook wel in orde (zij het onduidelijk) zouden zijn, vind ik dat onvoldoende. Eén van de taken van de DEC is om te controleren of aan de 3 V's voldaan is, maar wat mij betreft heeft de DEC niet kunnen vaststellen dat er inderdaad geen mogelijkheden tot vermindering zijn. Dit bezwaar weegt voor mij minder zwaar dan het vorige maar telt wel mee in mijn negatieve advies."

3. Er zijn tijdens de beoordeling van dit projectvoorstel geen echte knelpunten en of duidelijke dilemma's naar voren gekomen.



Form

Project proposal

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

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 5.1 lid2h
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. 5.1 lid2h
- 1.3 Provide the title of the project. Role of the (Pro) renin receptor (PRR) in skin homeostasis. Towards deciphering inflammation induced by proteotoxic stress and how relevant this is to the pathogenesis of atopic dermatitis in human.

2 Categories

- 2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.
- Basic research
- Translational or applied research
- Regulatory use or routine production
- Research into environmental protection in the interest of human or animal
- 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

This project licence application is the continuation of project AVD 5.1 lid2h 20171068.

State of the art

The (pro)renin receptor (**PRR**; encoded by the *atp6ap2* gene) has initially been discovered as a component of the renin-angiotensin system, that controls blood pressure (**1**). However, findings in *Xenopus* and *Drosophila*

demonstrate that PRR is an accessory receptor for Wnt (Wingless-type) pathways, where it acts independently of renin (**2-4**).

In mammals, PRR is broadly expressed in early development and progressively becomes restricted to the central nervous system and to epithelial tissues including the epidermis of the skin at E11.5 onwards (**5**). In the last years, mouse models have been developed to study PRR function in the context of hypertension, kidney and brain development (**6**). In human, missense mutations of *atp6ap2* have been recently associated with defects in glycosylation and autophagy leading to liver disease (**7**).

Findings obtained during the licence application AVD5.1 lid2h :

To understand the role of PRR in the skin, we have generated an *atp6ap2^{fl/fl}* mouse model to delete PRR encoding gene selectively in the epidermis. Our project **aimed** at studying :

- (1) *PRR-dependent mechanisms that control epidermis **development** and cellularity of the dermis.*
- (2) *PRR-dependent mechanisms regulating inflammation in **post-natal skin**, and define if this mouse model is relevant to study human psoriasis*

Our **results** revealed

(1) that the loss of PRR from the epidermis causes changes in the cellularity of the dermis including lymphatic hyperplasia and blood-lymphatic shunts, leading to embryonic lethality at around E15.5. The work performed (AVD5.1 lid2h) has allowed a more robust phenotypic analysis of the defects associated with the loss of PRR as well as a better understanding of the molecular mechanisms. Our bulk RNA sequencing analyses revealed that PRR mutant mice show proteotoxic stress associated with immune reaction as early as at E15.5.

Interestingly, our latest findings suggest that epidermis-specific-deletion of PRR in adult is associated with TH2 type of immune response, hallmarks that resemble **human atopic dermatitis** rather than psoriasis (associated with TH1 type of immune response), as initially thought.

(2) that chronic inflammation in adult mice is due to continuous **proteotoxic stress** rather than to autophagy defect, as suggested by the literature. We did test our initial hypothesis of DETCs (Dendritic Epidermal T Cells) being the cellular relay between the epidermis (where PRR is deleted) and the dermis (where the inflammation is observed). However, our genetic approach showed that the loss of function of DETCs does not impede chronic inflammation indicating that other cellular relays are involved. We also identified IL33 as a molecular mediator between the epidermis and the dermis. However, the use of IL33 blocking antibodies to normalize IL33 levels was not sufficient to impede chronic inflammation in adult mice.

In short, our results suggest that PRR deletion in post-natal epidermis leads to altered proteostasis, proteotoxic stress, initiation of Th2 type of immune response and subsequent chronic inflammation. Histology of the skin as well as the type of immune response initiated resemble features of human **atopic dermatitis**, suggesting that our mouse model is valuable to study pathogenesis of this disorder, which is the major chronic inflammatory immune-related skin disease worldwide (**8**). In addition, our findings in mouse models are important in the perspective of PRR inhibitors that are being developed by companies to treat patients with hypertension. Our study suggests that such developments will have major **side effects**, at the level of the skin, in hypertensive patients.

Follow-up of licence application AVD5.1 lid2h :

The **present project licence application** aims to finalize this study, to confirm the results, to better characterize the response to **proteotoxic stress** and to define the early mediators between the stress and the immune response. We aim to confirm that our mouse model is relevant to study human **atopic dermatitis**. Our current **hypothesis** is that proteotoxic stress plays a major role in various skin disorders associated with chronic inflammation, which often result from multiple factors of unknown origin. We hope to deeply define the proteotoxic stress response in mouse skin to find markers that will be used in human skin samples to access the generality of this process in chronic inflammatory of immune-related skin diseases. This study should help defining **risk factors** and **causative factors** at the global level in chronic inflammation potentially involving the whole skin.

References

- (1) Nguyen G (2011) *Clin Sci* **120**, 169-78
- (2) Buechling T et al (2010) *Curr Biol* **20**, 1263-68
- (3) Hermle T et al (2010) *Curr Biol* **20**, 1269-76
- (4) Cruciati CM et al (2010) *Science* **327**,459-63

- (5) 5.1 lid2h, 5.1 lid2e
- (6) Hoffmann and Peters (2021) *Pharmacol Res.* **173**, 105922
- (7) Rujano et al (2017) *J Exp Med* **214**, 3707-3729.
- (8) Pezzolo and Naldi (2020) *Exp Rev Clin Immunol* **16**, 155-166.

3.2 Purpose

3.2.1 Describe the project's immediate and ultimate goals. Describe to which extent achieving the project's immediate goal will contribute to achieving the ultimate goal.

- If applicable, describe all subobjectives

In this context, the project's **immediate goal** is to decipher the molecular and cellular mechanisms leading to proteotoxic stress associated disorders. We have developed unique mouse models that represent early and late stages of the immune reaction due to intracellular stress and they will be used to:

- **Goal 1:** define the molecular and cellular mechanisms leading to the proteotoxic stress and the early immune response associated (**mouse model 1, PRR deletion during embryogenesis, see 3.4.1**). Single cell (Sc) RNAseq analysis of the skin of the PRR mutant and control mice will be compared at different stages of disease development and dysregulated pathways will be confirmed at the protein level (**Goal 1.1**). When possible, functional restoration approaches will be used to validate major findings by an independent approach (**Goal 1.2**).
- **Goal 2:** define how this continuous proteotoxic stress leads to chronic inflammation and what are the mediators of the immune response (**mouse model 2, post-natal deletion of PRR, see 3.4.1**). Sc RNAseq analysis will be performed upon cell isolation at early and later time points and dysregulated pathways will be confirmed at the protein level (**Goal 1.1**). When possible, functional restoration approaches will be used to validate the findings by an independent approach and to evaluate potential compounds that can reduce inflammation. We will define if this mouse model is relevant to study atopic dermatitis, a human skin disorder associated with TH2 type of immune response (**Goal 2.2**).

The **ultimate goal** of this project is to get knowledge on the chronic inflammation in response to intracellular stress and on how relevant it is for the pathogenesis of atopic dermatitis, which is a prerequisite for clinical management. We hope to validate our mouse model as a preclinical model of human atopic dermatitis. In addition, this project should give insight on how different immune cells are recruited to the skin during embryonic development, which show quite discrepancies in literature.

3.2.2 Provide a justification for the project's feasibility.

We have developed unique mouse models that allow studying the function of epidermal PRR during skin development and maintenance. The phenotypic analysis of these models reveals previously unknown function of PRR in the skin, although molecular and cellular downstream events need to be further investigated. Main researchers share expertise 5.1 lid2h

3.2.3 Are, for conducting this project, other laws and regulations applicable that may affect the welfare of the animals and/or the feasibility of the project?

No

Yes > Describe which laws and regulations apply and describe the effects on the welfare of the animals and the feasibility of the project.

3.3 Relevance

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

The scientific relevance of the project is to provide:

- (1) knowledge on PRR function during skin morphogenesis: first demonstration that PRR controls the epidermal progenitor fate, and that the epidermis controls dermal lymphatic remodelling during development. This communication between epidermis and dermal lymphatic vessels represents a novel area of research, that seems to be associated to an immune reaction as early as at E15.5.
- (2) knowledge on PRR function in post-natal skin: in particular, on skin inflammation, which is a feature of most of skin conditions. These models will allow deciphering how chronic inflammation is induced and maintained in response to intracellular stress. We hope to develop a good model of atopic dermatitis that integrates the different aspects of the pathology (crosstalk of epidermis and dermis involving immune cells).

The social relevance of these findings is to assess the contribution of proteotoxic stress to various skin disorders associated with chronic inflammation. Disorders such as atopic dermatitis, psoriasis, although associated with TH2 and TH1 type of immune response respectively, are both associated with chronic inflammation, which is due to multiple factors of unknown origin. We believe that proteotoxic stress contributes to this inflammation and we hope to characterize the early stages of the response in mice to find markers to access these questions within samples of human origin. If our hypothesis is true, the development of inhibitors of such stress (to be applied topically) could be beneficial for patients with such chronic disorders.

3.3.2 Who are the project's stakeholders? Describe their specific interests.

...Project's stakeholders and their specific interest are the following:

- (1) The animals as they are bred, used in procedures, and killed for this project. Their interest is that the discomfort and the animal numbers are reduced to a minimum.
- (2) The scientists as they will test the validity of the hypothesis of the proteotoxic stress being one of the factors involved in skin chronic inflammation, by using this integrated model, with all different cell types leading to inflammation. Their interest is to produce robust results by using the least number of mice and with minimal discomfort.
- (3) The patient with chronic skin inflammation as in a long term they may benefit from the scientific findings (development of inhibitors of proteotoxic stress).

3.4 Strategy

3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy). If applicable, describe the different phases in the project, the coherence, the milestones, selection points and decision criteria.

To investigate the role of PRR in skin development and homeostasis, we have generated two mouse models based on the Cre/loxP system:

mouse model (1) to investigate the role of PRR **during skin development**, the *atp6ap2^{fl/fl}* mice are crossed with mice expressing the Cre under the control of Keratin 5 promoter (**K5-Cre**) (**embryonic deletion of *atp6ap2*, constitutive expression**). Based on our previous experience, embryonic lethality is as followed: about 10% of mutant embryos die at E14.5, 30% at E15.5 and 90% at E18.5.

mouse model (2) to study the role of PRR in skin homeostasis, the *atp6ap2^{fl/fl}* mice are crossed with **K14-Cre ESR1** mice where the Cre enzyme is fused with estrogen receptor allowing its functionality only when tamoxifen is added (**post-natal deletion of *atp6ap2*, inducible promotor**). Different time points have been selected based on our previous experiments. Mice will be harvested between day 5-8 post first-injection of tamoxifen (before first macroscopic signs of skin defects are observed), or at day 15 post first-injection of tamoxifen (when first macroscopic signs of skin defects are visible), or 1 month post-injection (to prove long term amelioration in functional restoration assays).

By using the mouse Cre/loxP system (**mouse model 1, appendix 1**), we have previously shown that epidermal specific deletion of PRR during skin development leads to a delayed epidermal development associated with embryonic lethality (at around E15.5) due to vein-lymphatic shunts in the dermis. Bulk

RNAseq analyses indicate that mutant skin shows signs of proteotoxic stress associated with immune reaction. Our working **hypothesis** is that the deletion of PRR in keratinocytes leads to proteotoxic stress that induces immune reaction in the dermis.

To confirm this hypothesis and decipher the molecular and cellular mechanisms leading to proteotoxic stress, immune reaction, and veino-lymphatic shunts ([Goal 1 in the project proposal form](#)), we will perform Single cell (Sc) RNAseq analysis at different stages after PRR deletion (E13.5, E14.5, E15.5 and E18.5). That will help defining the chronology of the cellular response. This approach will provide information on the cell type that encounters proteolytic stress, the immune cells that are already present in the skin at different stages of development (Which is not well reported in literature) and activated in response to the stress. Main findings will be confirmed at the RNA (by qRT-PCR) and protein (immunofluorescence and immunoblotting) levels ([Goal 1.1](#)) as well as by functional restoration of the mutant phenotype either by administration of compounds or genetically ([Goal 1.2](#)).

By using inducible mouse Cre/loxP system (**mouse model 2, appendix 2**), we have previously shown that epidermal deletion of PRR in post-natal epidermis, once the skin is established and vascular network is quiescent, leads to chronic inflammation associated with epidermal hyperplasia, dermal infiltration of inflammatory cells and lymphatic enlargement. Our current working **hypothesis** is that the post-natal deletion of PRR in keratinocyte leads to continuous intracellular stress associated with TH2 type of immune reaction and chronic inflammation in adult, where immune system is fully developed.

To confirm this hypothesis and decipher the molecular and cellular mechanisms leading to proteotoxic stress, immune reaction, and chronic inflammation ([Goal 2 in the project proposal form](#)), we will perform Single cell (Sc) RNAseq analysis at different stages after PRR deletion (early: day 5-8; intermediate: day 15 and late: day 30 post tamoxifen injection). This approach will provide information on the cell type that encounters proteolytic stress, the immune reaction that is initiated and how it is amplified over time. Main findings will be confirmed at the RNA (by qRT-PCR) and protein (immunofluorescence and immunoblotting) levels ([Goal 2.1](#)) as well as by functional restoration of the mutant phenotype either by administration of compounds or genetically ([Goal 2.2](#)).

The design of the project is described in the following scheme. Goal 1 and 2 are independent but complementary. During this project, a maximum of twenty compounds will be tested with 5 compounds maximum going through all steps (go moment) as well as a maximum of 5 different genetic backgrounds with 3 backgrounds maximum going through all steps (go moment). This numbers are based on our capacities in terms of human power and time (need of performing and analysing an experiment before starting the next one with another compound/background). The compounds/genetic background used will be primarily dedicated to performing functional restorations (basic research). When possible, compounds/background will be used to validate mechanistic pathways by reverting the phenotype of PRR deficient mice (inhibitors/activators of pathways that we believe are overactivated/inhibited in PRR deficient mice). Compounds that are already approved in human will be selected when possible as their safety profile is known.

Goal 1: define the molecular and cellular mechanisms leading to the proteotoxic stress and the early immune response (mouse model 1, appendix 1)

Goal 1.1 Collection of skin from E13.5, E14.5 and E15.5 and E18.5.

-> 1.1.1. transcriptomic analysis of control and mutant genotypes at the cell level

Confirm that keratinocyte show proteotoxic stress (previous analysis was bulk RNAseq with all skin cell types)

What are the signalling pathways/ cell populations dysregulated in each cell type?

How do immune cells are recruited to the skin during development?

-> 1.1.2. confirm major findings by qRT-PCR and at the protein level

Goal 1.2 Functional restoration to validate main findings: collection of skin upon administration of compound or in a different genetic background. Restoration at E18.5 will be analyzed for a go- or no-go moment. If go-moment, the most appropriate time point will be defined in a pilot experiment.

-> 1.2.1. priority will be given to FDA approved compound with administration through route and doses based on literature

->1.2.2. Genetic approach as alternative if 1.2.1 is not possible

Goal 2: define how the continuous proteotoxic stress leads to chronic inflammation (mouse model 2, appendix 2)

Goal 2.1 Collection of skin between 5-8 days, at 15 and 30 day-post-tamoxifen injection (5 different time points maximum)

-> 2.1.1. transcriptomic analysis of control and mutant genotypes at the cell level

Confirm that embryonic and post natal phenotypes are of similar origin (proteotoxic stress in keratinocytes).

Decipher immune response.

-> 2.1.2. confirm major findings by qRT-PCR and at the protein level

Goal 2.2 Functional restoration to validate main findings: collection of skin upon administration of compound or in a different genetic background. Restoration at day 15 will be analyzed for a go- or no-go moment. If go-moment, the most appropriate time point will be defined in a pilot experiment.

-> 2.2.1. priority will be given to FDA approved compound with administration through route and doses based on literature. If relevant, specific compounds known to improve atopic dermatitis in humans will be tested in this mouse model.

->2.2.2. Genetic approach as alternative if 1.2.1 not possible.

3.4.2 Provide a justification for the strategy described above.

Inflammation is key in the development of many skin conditions. In addition to environmental insults, there is more and more evidence that inflammation can be driven by intracellular stress such as proteotoxicity. Our previous results suggest that this is the case in our mouse models. They provide an integrated and well controlled system to study the complex immune response associated with intracellular stress. So far, inflammation shows such a degree of complexity in terms of molecular and cellular cascades that this process cannot be recapitulated *in vitro*. The development and implementation of Omics approaches will allow studying gene regulation during inflammation at the cell resolution. Our strategy will provide unique molecular data on each step of the immune and inflammatory responses in a cell-specific manner. This approach will allow defining specific early markers of proteotoxic stress that will be used to access the role played by such intracellular stress in skin disorders associated with chronic inflammation by using human samples.

3.4.3 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	Collection of skin from embryos at stages E13.5, E14.5, E15.5 and E18.5 (K5-Cre driven deletion). For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin.
2	Collection of skin from control and mutant mice at different time points of skin defect development (5-8 days, 15 days, 30 days post tamoxifen injection) (K14-Cre ESR1 driven deletion). For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin.



Appendix Description animal procedures

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

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	5.1 lid2h	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	5.1 lid2h	
1.3 List the serial number and type of animal procedure <i>Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.</i>	Serial number	Type of animal procedure
	3.4.3.1	Collection of skin from embryos at stages E13.5, E14.5, E15.5 and E18.5 (K5-Cre driven deletion). For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin.

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

The procedure required is 'Collection of skin from embryos at stages E13.5, E14.5, E15.5 and E18.5' in which the progeny of the following cross will be harvested at different time points:

-Goal 1.1 and Goal 1.2.1 (compounds): Male K5-Cre/+ x Female $atp6ap2^{Flox/Flox}$ that generates littermates with all interesting genotypes, i.e., male and female control embryos (+/+; $atp6ap2^{Flox/Y}$ or $Flox/+$); male knock-out (K5-Cre/+; $atp6ap2^{Flox/Y}$) and heterozygous mutant females (K5-Cre/+; $atp6ap2^{Flox/+}$). For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin will be performed.

Goal 1.2.2 (Genetics): Male K5-Cre/+ x Female $atp6ap2^{Flox/Flox}$; transgene (overexpression) or floxed alleles (loss of function) that generates littermates with all interesting genotypes, in particular males and females $atp6ap2$ mutants within the new genetic background (gain or loss of function of candidate gene) that should restore initial phenotype of males and females $atp6ap2$ mutants.

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

Females with embryos of required genotypes at desired stage (E13.5, E14.5, E15.5 or E18.5) will be euthanized according to directive 2010/63/EU and the skin of the embryos will be collected before subsequent processing (dissociation, flow cytometry, immunolabeling...).

We have previously defined that epidermal specific deletion of PRR is associated with embryonic lethality at ~ E15.5. Therefore, embryos will be studied at this stage, just before they die *in utero*. To analyse cell population (homing, morphology, activation...) involved in PRR-dependent signalling, earlier stages (E13.5 and E14.5) will be studied. Finally, when restoration assays of dermal phenotype are performed, embryos should survive and will be studied at E18.5. Indeed, we have previously defined that 10% of the mutant embryos survive at E18.5, i.e., they don't get veno-lymphatic shunts, while all mutant embryos die perinatally due to a fatal defect in the barrier function of the skin, leading to dehydration. These dead animals are often eaten by their mother and thus cannot be counted. At E18.5, as embryo can survive without being connected to their mother, viability is easy to access when compared to E15.5 where viability must be monitored in the few minutes following the rupture of the placenta.

For Goal 1.2.1.(compounds), compounds that can cross the placenta barrier will be selected. Most probable route of injection will be intraperitoneal injection, with injections every other day from E11.5 till E17.5, with a selected substance that should have beneficial impact on mutant embryos (restoration of the phenotype, i.e., blockade of the proteotoxic stress or of the initial steps of the immune response). However, these parameters (route and frequency of administration) may be adapted based on the literature. Initial dose administered will be the highest dose within the range recommended by the literature. If there is no beneficial effect, frequency of administration may be changed to a daily administration of the substance (7 following days). If independent additional adverse effects are observed the dose may be reduced. A maximum of 4 conditions (2 frequencies and/or 2 doses) will be performed/compound. Restoration of survival will be evaluated at E18.5. A minimum of 50% of difference between groups (i.e. from 10% viability of mutant embryos without treatment to ~60% viability with treatment) will be considered efficient (a go-moment) for further analysis. Each condition tested in the pilot requires 5 litters to access the effect unequivocally: from ~< 1 mutant embryo alive/5 litters without treatment to ~4.5 mutant embryo alive/5 litters with treatment). If no restoration is observed at the different conditions tested in the pilot experiment, it will be a no-Go moment. If a minimum of 50% of difference between groups is observed (go-moment), 3 litters will be used/stage to access the kinetics of restoration (cell populations identity i.e, immune cells recruited when compared to control embryos) by ScRNAseq. Finally, optimal stage (most probably E18.5 but may differ based on the kinetics) will be studied in depth, and validations of molecular mechanisms associated will be performed. Within the 5 years of the project, based on our capacities in terms of human resource and financial investment, a maximum of 20 compounds will be tested with a maximum of 5 compounds going through all steps (go moment).

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

An estimate of 6 embryos/litter is used for the calculations with, if all alive, an average of 1.5 embryos/group/litter (4 genotypes: male and female and control and mutant). Based on our previous experience, about 10% of mutant embryos are already dead at E14.5, 30% at E15.5 and 90% at E18.5 and should be excluded from our experiments. The surface of the skin (back and head) is quite small at stages E13.5 to E15.5 and therefore cannot be used simultaneously for various experimental applications. At these stages, skin sample from one animal allows validating ~5 gene products by classical approach (Q-RT-PCR and immunoblotting). A maximum of 10 gene products will be validated by these approaches. In addition, skin samples will be embedded for cryosection followed by immunolabeling, which allows accessing the levels of more gene products and provides a visual information on the cell types that show differences in a specific marker. Mutant viability is extremely low at E18.5 and skin surface is larger. Therefore, to minimize the number of animals required at E18.5, back skin of each animal will be cut in four pieces for analysis in the four experimental set-ups (ScRNAseq, validation RNA, validation proteins (immunoblotting and immunofluorescence)). A maximum of 5 gene products will be validated at this stage. Statistical analysis will be performed with Prism 9 software (GraphPad) using ANOVA for multiple group comparison (power set at 80%, p-value ≤ 0.05).

For Goal 1.1, five litters per embryonic stage will be used to optimize cell dissociation for ScRNAseq, which requires enzymatic cell dissociation with a high overall cell viability (90%). They will be indicated as (+5) in the table. Each embryonic stage may require different incubation times. Mice of different genotype should be included here to ensure that cell viability upon dissociation is not affected by the genotype.

-For ScRNAseq (descriptive approach of cell populations that are altered/recruited along the process): to account for variation within litters (strength of the phenotype differs within mutant embryo of a same litter) as well as between litters (mainly due to subtle differences in age groups), cell populations will be analyzed from at least 6 embryos per group isolated from at least 3 litters.

- E13.5: from 4 litters, 6 embryos/group are obtained
- E14.5: from 5 litters, 6 alive embryos/group are obtained (10% mortality of mutant)
- E15.5: from 6 litters, 6 alive embryos/group are obtained (30% mortality of mutant)
- E18.5: from 40 litters, 6 alive embryos/group are obtained (90% mortality of mutant)

-For validation RNA and protein (Q-RT-PCR and immunoblotting), based on our experience and with ANOVA analysis (power set at 80%, p-value ≤ 0.05, in-group variation of 20% and 30% of difference between groups), 7 embryos should be analysed per group to get a statistically significant analysis (obtained from at least 3 independent litters) for 5 gene products. For 10 gene products, 14 embryos are required for RNA validation and 14 for protein validation. At E18.5, due to the low viability of mutant embryos and the larger surface of the skin at this stage, skin of one embryo will be shared for the 4 groups of experiment (ScRNAseq, Q-RT-PCR, Immunoblotting and immunofluorescence) and a maximum of 5 gene products will be validated.

- E13.5: from 10 litters, 15 embryos/group
- E14.5: from 11 litters, 14 alive embryos/group
- E15.5: from 15 litters, 14 alive embryos/group
- E18.5: from 40 litters, 6 alive embryos/group (shared with other approaches of Goal 1.1) + 1 alive embryo/group obtained from 7 additional litters to reach 7 alive mutant embryos required.

-For protein validation by immunofluorescence analysis, this is a descriptive approach. Based on our experience, at least 4 embryos per group, preferentially from 3 independent litters to get rid of potential variations due to subtle differences in age groups are required.

- E13.5: from 3 litters, ~4 embryos/group
- E14.5: from 4 litters, ~5 alive embryos/group
- E15.5: from 5 litters, ~5 alive embryos/group
- E18.5: skin sample shared with other approaches of Goal1.1

The next tables summarize the number of litters required for Goal1.1

Goal 1.1 (litters)	ScRNAseq	Validation RNA			Validation protein	
		Q-RT-PCR	Immunoblotting	Immunolabeling		
E13.5	4 (+5)	10	10	3		
E14.5	5 (+5)	11	11	4		
E15.5	6 (+5)	15	15	5		
E18.5	40 (+5)	+10	-	-		

->169 females : 192 E13.3 ; 216 E14.5 ; 276 E15.5 ; 330 E18.5

heeft opmaaktoegepast: Engels (Verenigde Staten)

The Goal 1.2. has Go / no Go moment.

For Goal 1.2.1.(compounds), 5 litters (E18.5) will be used in a pilot experiment/condition tested. A maximum of 4 conditions will be tested in a pilot/compound (see paragraph 'Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment. Provide justifications for the selected approach'). A minimum of 50% of difference between groups will be considered efficient (a go-moment) for further analysis; i.e., going from ~10% mutant viability without treatment (~<1 mutant embryo alive/5 litters) to ~ 60% viability with treatment (~4.5 mutant embryo alive/5 litters). Since only beneficial effect will be accessed, one-tailed ANOVA test will be used and 6 embryo/group (already obtained within the pilot) should be sufficient to get a robust statistical analysis (power set at 80%, p-value ≤ 0.05, in-group variation of 20% and 50% of difference between groups). Skin sample will be collected within these pilot experiments to access RNA levels (Q-RT-PCR) protein levels (immunoblotting and immunolabelling) of specific markers. If go-moment, 3 independent litters will be used to access kinetics of restoration by ScRNAseq (descriptive analysis). If molecular analysis requires validation at a different stage (based on the kinetics of restoration), skin samples will be collected at a different stage:

-For validation RNA and protein (Q-RT-PCR and immunoblotting), 6 alive embryos/group should be obtained from 7 litters at different stages (with a minimum of 60% viability) to confirm around 5 gene product per method. For 10 gene products, 14 litters are required/approach.

-For protein validation by immunofluorescence analysis, this is a descriptive approach. Based on our experience, at least 4 embryos per group, preferentially from 3 independent litters to get rid of potential variations due to subtle differences in age groups are required.

Goal 1.2.1- For ONE compound	Macroscopic restoration/survival? Go/no Go moment			
E18.5	Pilot: 4 conditions max, 5 litters/condition			
➔ For 20 compounds: max:400 females; 2400 embryos E18.5				
If go moment	ScRNAseq	Validation RNA Q-RT-PCR	Validation protein immunoblotting	immunolabelling
E13.5	3 litters			
E14.5	3 litters			
E15.5	3 litters			
E18.5	3 litters			
Optimal stage	-	14 litters	14 litters	3 litters
➔ For 5 compounds: 215 females; 90 E13.5, 90 E14.5, 90 E15.5, 90E18.5 and 930 E'optimal'				

For Goal 1.2.2.(genetic background), within the five years of the project, a maximum of five genetic background will be tested with 3 backgrounds maximum going through all steps (go moment). Similarly to 1.2.1., a minimum of 50% of difference between groups will be considered efficient (go-moment) for further analysis. Since only beneficial effect will be accessed, one-tailed ANOVA test will be used and 6 embryo/group should be sufficient to get a robust statistical analysis (power set at 80%, p-value ≤ 0.05, in-group variation of 20% and 50% of difference between groups). However, the groups are different: mutant (male and female) will be compared to mutant (male and female) in a gain or loss of function background. Within a litter of 6, an average of 0.75 embryo/group will be found. Therefore 8 litters are required to obtain 6 embryos/group to evaluate the potential restoration of macroscopic phenotype/survival at E18.5). Skin sample will be collected within these pilot experiment to access RNA levels (Q-RT-PCR) protein levels (immunoblotting and immunolabelling) of specific markers. If go-moment, 5 independent litters will be used to access kinetics of restoration by ScRNAseq (descriptive analysis within at least 3 alive embryos/group). If molecular analysis requires validation at a different stage (based on the kinetics of restoration), skin samples will be collected at a different stage:

-For validation RNA and protein (Q-RT-PCR and immunoblotting), 6 alive embryos/group should be obtained from 15 litters at different stages (with a minimum of 60% viability) to confirm around 5 gene product per method. For 10 gene products, 30 litters are required/approach.

-For protein validation by immunofluorescence analysis, this is a descriptive approach. Based on our experience, at least 4 embryos per group, preferentially from 3 independent litters to get rid of potential variations due to subtle differences in age groups are required (obtained from 6 litters).

Goal 1.2.2-For ONE genetic background	Macroscopic restoration/survival? Go no Go moment			
E18.5	8 litters			
→ For 5 backgrounds: 40 females, 240 embryos E18.5				
If go moment	ScRNAseq	Validation RNA Q-RT-PCR	Validation protein immunoblotting	immunoblotting
E13.5	4 litters			
E14.5	4 litters			
E15.5	4 litters			
E18.5	4 litters			
Optimal stage	-	30 litters	30 litters	6 litters
→ For 3 backgrounds, 246 females; 72 E13.5; 72 E14.5; 72 E15.5; 72 E18.5; 1188 E'optimal'				

Specified numbers are based on our current knowledge; however, these numbers may need to be slightly adapted. Breeding couples are not counted as experimental animals.

B. The animals

Specify the species, origin, life stages, estimated numbers, gender, genetic alterations and, if important for achieving the immediate goal, the strain.

Serial number	Species	Origin	Life stages	Number	Gender	Genetically altered	Strain
	<i>Mus musculus</i>	In house breeding	Primiparous > 8-week-old	784	female	atp6ap2 Flox/Flox	C57BL/6
	<i>Mus musculus</i>	In house breeding	E13.5/E14.5/E15.5/E18.5/E'optimal'	282/306/366/2820/930 TOTAL 4704	both	Epidermal-specific deletion of atp6ap2 and control littermates	C57BL/6
	<i>Mus musculus</i>	In house breeding	Primiparous > 8-week-old	286	female	atp6ap2 Flox/Flox in combination with gain or loss of function in candidate gene	C57BL/6
	<i>Mus musculus</i>	In house breeding	E13.5/E14.5/E15.5/E18.5/E'optimal'	72/72/72/72/312/188 TOTAL: 1716	both	Epidermal-specific deletion of atp6ap2 and control littermates in combination with gain or loss of function in candidate gene	C57BL/6

Provide justifications for these choices

Species	Homologous recombination in <i>Mus musculus</i> has allowed the generation of gain and loss of function models used to study gene's function
Origin	In house breeding of the animal avoids animal transportation
Life stages	Different stages defined in our former experiments. Embryonic lethality is at around E15.5

Number	For statistically significant analysis (see section A)
Gender	Pregnant females required; gender of embryos defined retrospectively
Genetic alterations	Epidermis-specific deletion of <i>atp6ap2</i> (K5-Cre). For restoration approach, in a genetic background (gain or loss of function of candidate gene)
Strain	Having a pure genetic background allows eliminating all confounding effects due to differences in the genetic background. Phenotype will come from induced genetic modifications.

C. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

Yes

No > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices

D. Pain and compromised animal welfare

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No

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

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

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

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

No adverse effects expected.

Explain why these effects may emerge.

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

E. Humane endpoints

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

No > Continue with question F

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

Indicate the likely incidence.

F. Classification of severity of procedures

Provide information on the experimental factors contributing to the discomfort of the animals and indicate to which category these factors are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe'). In addition, provide for each species and treatment group information on the expected levels of cumulative discomfort (in percentages).

Mild discomfort is expected for 100 of the mice (pregnant females and litters) and procedure is assigned as 'non-recovery' procedure.

Description	Animal species/strain and sex	Number of animals	Discomfort (expected cumulative discomfort) (% of total)	Discomfort is a sum of following procedures
Mothers	Mouse (female)	615	100% mild	Euthanasia Compound administration
Mothers	Mouse (female)	455	100% mild	Euthanasia
Embryo's stage	Mouse (male and female)	6420	100% mild	Euthanasia
	TOTAL	7490		

G. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement	The molecular mechanisms downstream of PRR deletion can be deciphered only <i>in vivo</i> as they involve interactions between cell types of epidermis and dermis. The 3D skin models currently available show reduced barrier properties and do not reflect the complexity of the skin. They show stratified epidermis, but composition of the dermis is reduced to fibroblasts and does not show vessels or immune cells. Discovering early markers of proteotoxic stress in mice will allow accessing if this process is generally found in human disorders. We have a collaboration with the Dermatology department of our institute and have access to human skin cryosections.
Reduction	The minimum number of mice required to get statistically significant results has been anticipated based on our previous experiments and statistical analyses. To reduce the number of mice, back skin including that of the head of the embryos will be used.
Refinement	The procedure used is dedicated to the collection of biological material. Experiments will be performed by staff that are highly skilled and experienced with animal handling. As a result, all procedures with the animals will be performed with the greatest care and minimal animal distress will be ensured.

Are adverse environmental effects expected? Explain what measures will be taken to minimise these effects.

No

Yes > Describe the environmental effects and explain what measures will be taken to minimise these effects.

H. Re-use

Will animals be used that have already been used in other animal procedures?

No > Continue with question I.

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

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

No

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

I. Repetition

Explain for legally required animal procedures what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, describe why duplication is required.

Not applicable.

J. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question K.

Yes > Describe this establishment.

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

End of experiment

K. Destination of the animals

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Provide information on the destination of the animals.

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

The procedure used is dedicated to the collection of biological material, which requires to kill the animals before collection.

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

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

Yes > Will a method of killing be used for which specific requirements apply?

No > Describe the method of killing.

Yes > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Females will be euthanized, according to directive 2010/63/EU, by cervical dislocation and embryos will be submitted to decapitation., upon cooling on ice.

If animals are killed for non-scientific reasons, justify why it is not feasible to rehome the animals.



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.

5.1 lid2h

- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.

5.1 lid2h

- 1.3 List the serial number and type of animal procedure

Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.

Serial number	Type of animal procedure
3.4.3.2	Collection of skin from control and mutant mice at different time points of skin defect development (5-8 days, 15 days, 30 days post tamoxifen injection) (K14-Cre ESR1 driven deletion). For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin.

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

The procedure required is '**Collection of skin from control and mutant mice at different time points of skin defect development (5-8 days, 15 days, 30 days post tamoxifen injection)**' upon tamoxifen injection, in which the progeny of the following cross will be harvested and compared at different time points: -**Goal 2.1 and Goal 2.2.1 (compounds)**: Male K14-Cre ESR1/+ x Female *atp6ap2*^{Flox/Flox} that generates littermates with all interesting genotypes, i.e., control male and female (+/+; *atp6ap2*^{Flox/Y} or *Flox/+*); male knock-out (K14-Cre ESR1/+; *atp6ap2*^{Flox/Y}) and heterozygous females (K14-Cre ESR1/+; *atp6ap2*^{Flox/+}). For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin.

Goal 2.2.2 (Genetics): Male K14-Cre ESR1/+ x Female *atp6ap2*^{Flox/Flox}; transgene (overexpression) or floxed alleles (loss of function) that generates littermates with all interesting genotypes, in particular males and females *atp6ap2* mutants within the new genetic background (gain or loss of function of candidate gene) that should restore initial phenotype of males and females *atp6ap2* mutants.

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

Our previous experiments showed efficient deletion of *atp6ap2*^{Flox} allele when one month-old mice were injected intraperitoneally with 1 mg of tamoxifen for 5 consecutive days. Macroscopic phenotype was then visible at day 15 post tamoxifen injection, with scaly epidermis in regions poor in hair follicle (ears, paws, and tail). Then, the phenotype increased till about 6 weeks post-injection, with mice showing alopecia and starting to hatch constantly. Mice of appropriate genotype (littermates) will be therefore sacrificed at the following time points upon tamoxifen injection:

- days 5-8: to define the cell type with intracellular stress and early steps of the immune response
- day 15: to analyse inflammatory response
- day 30: to analyse long term effects mainly in the context of restoration experiments ([Goal 2.2 of the project proposal](#)) to prove long term amelioration.

Since *atp6ap2* is located on the X chromosome, mutant males are knock-out animals while heterozygous females are mosaic with virtually 50% of cells expressing wild-type levels of PRR and 50% of cells depleted of PRR. Therefore, most experiments will be performed first with control and knock-out male littermates only. Depending on the findings and on how relevant including females is (importance of showing cell autonomous versus non autonomous effects and dosage effects in females), there will be a Go no-Go moment to decide if females must be included in additional experiments.

In all cases, control and mutant littermates of one month (males in a pilot experiment and females included if relevant (Go no-Go moment)) will be injected intraperitoneally with 1 mg of tamoxifen for 5 consecutive days and they will be euthanized according to directive 2010/63/EU to collect their skin at different time points (5-8 days, 15 days, 30 days) before subsequent processing of the skin.

For [goal 2.2.1](#) (compounds) mice will additionally be submitted to administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin, based on literature. Most probable route of injection will be intraperitoneal injection, with injection every other day (starting on the second day of tamoxifen injection till ~day 15 post first tamoxifen injection), with a selected substance that should have a beneficial effect on mutant mice (restoration of the phenotype). If possible, priority will be given to FDA approved compounds, for which toxicity of the compound should be minimal. Restoration of macroscopic phenotype at ~ day 15 will be evaluated in a pilot experiment by comparing the phenotype of treated and non-treated (vehicle-treated) knock-out males. Absence of scaly plaques development when compared to vehicle-treated mice will be a go-moment. Initial dose used will be the highest dose in the range described by the literature. If there is no beneficial effect, frequency of administration may be changed with a daily administration of the substance. If there are independent adverse effects, dose may be reduced. Route of injection may be adapted based on literature. A maximum of two doses and frequencies will be tested/compound (4 conditions). If no restoration is observed in the pilot experiment, that will be a no-Go moment. If restoration is observed in the pilot, long-term restoration will be evaluated at day 30. In addition, there will be a Go/no-Go moment to decide if females must be included in additional experiments (importance of showing cell autonomous versus non autonomous effects and dosage effects in females). A maximum of twenty compounds will be tested with 5 compounds maximum going through all steps (go moment) within the five years of this project, based on our human and financial resources.

Only cross breeding bearing K14-Cre ESR1 show phenotype (see proposal section 3.4) and only littermates are included in the procedures as being experimental animals.

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

The surface of the skin (back) is large in post-natal mice, therefore back skin of each animal will be cut in four pieces for analysis in the four experimental set-ups (ScRNAseq, validation RNA, validation proteins (immunoblotting and immunofluorescence)). Statistical analysis will be performed with Prism 9 software (GraphPad) using either T-test (when two groups are compared) or ANOVA for multiple group comparison (power set at 80%, p-value ≤ 0.05).

For **Goal 2.1**, 20 males (10 control and 10 knock-out, Day 15) will be used to optimize cell dissociation for ScRNAseq, which requires enzymatic cell dissociation with a high overall cell viability (90%) (enzyme and kinetics of incubation may have to be adjusted). They will be indicated as (+10) in the table. Similar protocol should apply to all different time points, although the genotype may influence cell viability. Mutant mice should therefore be included into this optimization experiment.

-For ScRNAseq (descriptive approach of cell populations that are altered/recruited along the process), to account for slight inter-individual variations (mainly due to slight differences in kinetics of gene deletion), cell populations will be analyzed from 4 animals per group, isolated from at least 3 litters. To prove dose-dependency and cell-autonomous effects, females will be included in this approach.

-For cellular and molecular validations (RNA and protein levels), based on our experience (power set at 80%, p-value ≤ 0.05 , in-group variation of 20% and 30% of difference between groups), will require 3 additional animal/group to get a robust statistical analysis.

Goal 2.1	Gender	ScRNAseq	Validations
Day 5	Male	4 control & 4 mutants	+ 3 control & 3 mutants
	Female	4 control & 4 mutants	+ 3 control & 3 mutants
Day 6	Male	4 control & 4 mutants	+ 3 control & 3 mutants
	Female	4 control & 4 mutants	+ 3 control & 3 mutants
Day 7	Male	4 control & 4 mutants	+ 3 control & 3 mutants
	Female	4 control & 4 mutants	+ 3 control & 3 mutants
Day 8	Male	4 control & 4 mutants	+ 3 control & 3 mutants
	Female	4 control & 4 mutants	+ 3 control & 3 mutants
Day 15	Male	4 control(+10) & 4 mutants (+10)	+ 3 control & 3 mutants
	Female	4 control & 4 mutants	+ 3 control & 3 mutants

The **Goal 2.2** has Go / no-Go moment.

For **Goal 2.2.1.(compounds)**. Compounds (inhibitors/activators, blocking antibodies) specific to downstream signalling candidate pathways will be administrated to perform restoration studies at day 15. Pilot experiment will be performed with mutant males (treated or not) and a maximum of 4 regimens (2 doses and 2 treatment frequencies) will be tested per compound (see paragraph 'Describe which statistical methods have been used and which other considerations have been taken into account to minimise the number of animals'). To access the restoration of the macroscopic phenotype at ~day 15 (lack of scaly scale development in the treated group compared to untreated mutant), based on our experience, 3 males/ group are required in a pilot. If go-moment, based on our experience, for cellular and molecular validation, 4 additional males/group will be required (power set at 80%, p-value ≤ 0.05 , in-group variation of 20% and 30% of difference between groups) and use simultaneously for ScRNAseq analysis. Long term restoration will be accessed at day 30 with 4 males/group (all types of experiments). If females are included (Go/ no-Go moment), 7 females/group will be required for robust statistical analysis for all experiments and 4 females/group will be analysed for long term restoration. Based on our human and financial investment, a maximum of 20 compounds will be tested with 5 compounds maximum going through all steps (go moment) within the 5 years of the project.

Goal 2.2.1 For ONE compound	Macroscopic restoration? Go no Go moment	Gender	Stages
Optimization doses	3 mutants (vehicle-treated) and 3 mutants (treated) for one regimen (4 regimens maximum tested)	Males	Day 15
→ For 20 compounds: 240 (vehicle -treated) and 240 (treated) mutant males Day 15			
If go moment, collection of	4 mutants (vehicle-treated) and 4 mutants(treated)	Males	Day 15
Long term	4 mutants (vehicle-treated) and 4 mutants(treated)	Males	Day 30

If go moment, collection of	7 mutants (vehicle-treated) and 7 mutants (treated)	Females	Day 15
Long term	4 mutants (vehicle-treated) and 4 mutants(treated)	Females	Day 30
→ For 5 compounds: 20 vehicle-treated and 20 treated mutant males day 15 and 30; 35 vehicle-treated and 35 treated mutant females day 15 and 20 vehicle-treated and 20 treated mutant females day 30			

For Goal 2.2.2.(genetic background), mutant males in initial genetic background will be compared to mutant males in a gain/loss of function genetic background to estimate macroscopic restoration at ~Day 15. Based on our former experience, 3 males/group are required to access potential restoration in a pilot. If no restoration is observed, there will be no further experiment. Similarly to 2.1.1, 4 additional males/group will be required (power set at 80%, p-value ≤ 0.05, in-group variation of 20% and 30% of difference between groups) and used simultaneously for ScRNAseq analysis. Long term restoration will be accessed at day 30 with 4 males/group (all types of experiments). If females are included (Go/ no-Go moment), 7 females/group will be required for robust statistical analysis for all experiments and 4 females/group will be analysed for long term restoration. A maximum of 5 genetic background will be tested with 3 background maximum going through all steps (go moment) within the five years of this project, based on our human and financial resources.

Goal 2.2.1-For ONE genetic background	Macroscopic restoration? Go no Go moment	Gender	Stages
Pilot	3 'restored' and 3 mutants	Males	Day 15
→ For 5 backgrounds:15 'restored' and 15 mutant males Day 15			
If go moment, collection of	4 restored' and 4 mutants	Males	Day 15
	4 restored' and 4 mutants	Males	Day 30
If go moment, collection of	7 'restored' and 7 mutants	Females	Day 15
	4 'restored' and 4 mutants	Females	Day 30
→ For 3 backgrounds: 12 'restored' and 12 mutant males Days 15 and 30 21 'restored' and 21 mutant females Day 15 12 'restored' and 12 mutant females Days 30			

Specified numbers are based on our current knowledge, however these numbers may need to be slightly adapted. Breeding couples are not counted as experimental animals.

B. The animals

Specify the species, origin, life stages, estimated numbers, gender, genetic alterations and, if important for achieving the immediate goal, the strain.

Serial number	Species	Origin	Life stages	Number	Gender	Genetically altered	Strain
1	<i>Mus musculus</i>	In house breeding	1 month old	830	Male/female	specific deletion of atp6ap2 and control littermates	C57BL/6

2	<i>Mus musculus</i>	In house breeding	one month old	144	Male/female	Epidermal-specific deletion of <i>atp6ap2</i> and control littermates in combination with gain or loss of function in candidate gene	C57BL/6
---	---------------------	-------------------	---------------	-----	-------------	--	---------

Provide justifications for these choices

Species	Homologous recombination in <i>Mus musculus</i> has allowed the generation of gain and loss of function models used to study gene's function
Origin	In house breeding of the animal avoids animal transportation
Life stages	Different stages of disease development defined in our former experiments.
Number	For statistically significant analysis (see section A)
Gender	Knock-out males as first steps, heterozygous females if go moment
Genetic alterations	Epidermis-specific deletion of <i>atp6ap2</i> (K14-Cre ESR1). For restoration approach, in a genetic background (gain or loss of function of candidate gene)
Strain	Having a pure genetic background allows eliminating all confounding effects due to differences in the genetic background. Phenotype will come from induced genetic modifications.

C. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

Yes

No > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices

D. Pain and compromised animal welfare

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No

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

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

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

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

The skin defects due to post-natal epidermis-specific deletion of PRR start to be visible with scaly epidermis in skin with low amount of hair follicle (ears, paws and tail) at 15 days post injection of tamoxifen. Therefore, for all time points less than or equal to 15 days, no other adverse effects are expected. The group of mice maintained 30 days will experience discomfort due to skin defects and constant hatching (at least the group of PRR mutants). They will be used exclusively to monitor long term restoration of specific treatment or genetic background. Human endpoints have been defined particularly for this last group of mice. Mice will be observed every other day and will be humanely sacrificed in case the following define end points are reached: visible pain (abnormal posture and/or movement), significant weight loss (> 10%), abnormal behaviour (isolation).

Explain why these effects may emerge.

These effects emerge from the chronic inflammation associated with the deletion of PRR from post-natal epidermis.

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

For mice sacrificed at late time point (30 days), to minimise severity, animals might be euthanized at earliest time point if restoration appears not to be efficient long term or if human endpoints are reached. In mutant mice, first phenotype is observed at day 15 post tamoxifen injection with scaly plaques observed at the level of the ear, paw and tail. If the phenotype is as strong in the 'restored' group that in the mutant group already at day 15, there is no need to keep the mice longer. If phenotypic restoration is observed at early time point (day 15), then this is important to see how strong this restoration is and therefore to keep the mice longer.

E. Humane endpoints

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

No > Continue with question F

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

Mice will be observed in a daily basis starting at Day 15 post-tamoxifen injection and will be humanely sacrificed in case the following define end points are reached: visible pain (abnormal posture and/or movement), significant weight loss (> 10 %), abnormal behavior (isolation) as well as if 50% of their body surface exhibits erythema or if they constantly scratch or if they have a wound greater than 0.5 cm in length.

Indicate the likely incidence.

Very unlikely (estimate 1%)

F. Classification of severity of procedures

Provide information on the experimental factors contributing to the discomfort of the animals and indicate to which category these factors are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe'). In addition, provide for each species and treatment group information on the expected levels of cumulative discomfort (in percentages).

All animals: Mild discomfort due to intraperitoneal injection of tamoxifen daily for 5 days
 Animals of Goal 2.2 will experience additional discomfort due to administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin.
 All animals (except those harvested at day 30): Mild discomfort due to the intracellular stress and immune response development
 Animals harvested at Day 30: Moderate discomfort due to the development of chronic inflammation
 All animals will have a 'non recovery' procedure at the specified end point in to collect tissues to be analysed (sacrificed and tissue collection, subsequently).

Description	Animal species/strain and sex	Number of animals	Discomfort (expected cumulative discomfort) (% of total)	Discomfort is a sum of following procedures
Mice sacrificed at max day 15 post tamoxifen (goal 2.1+ Goal 2.2.2)	Mouse (Male and female)	256	100% mild	Tamoxifen Euthanasia
Mice for Goal 2.2 .1, sacrificed day 15	Mouse (male and female)	590	100% mild	Tamoxifen compound administration euthanasia
Mice for Goal 2.2.1 sacrificed day 30	Mouse (male and female)	48	100% moderate	Tamoxifen compound administration Skin phenotype euthanasia
Miced for Goal 2.2.2 sacrificed day 30	Mouse (male and female)	80	100% moderate	Tamoxifen Skin phenotype euthanasia
		Total 974		

G. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement	Phenotypic analysis of PRR deletion involves complex interaction between cell types of epidermis and dermis and the molecular relays are not well established so far and therefore can be determined only <i>in vivo</i> . We have a collaboration with the department of Dermatology of our institution to translate our mouse data to human conditions by using skin cryosections of human skin.
Reduction	The minimum number of mice required to get significant result has been anticipated based on our previous experiment and statistical analyses. To reduce the number of mice used, only male littermates will be used as a first step. Skin samples will be collected and used for the different analyses.
Refinement	Endpoints have been defined to allow humane sacrificed of animals. Experiments will be performed by staff that are highly skilled and experienced with animal handling. As a result, all procedures with the animals will be performed with the greatest care and minimal animal distress will be ensured.

Are adverse environmental effects expected? Explain what measures will be taken to minimise these effects.

No

Yes > Describe the environmental effects and explain what measures will be taken to minimise these effects.

H. Re-use

Will animals be used that have already been used in other animal procedures ?

No > Continue with question I.

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

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

No

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

I. Repetition

Explain for legally required animal procedures what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, describe why duplication is required.

Not applicable

J. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question K.

Yes > Describe this establishment.

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

End of experiment

K. Destination of the animals

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Provide information on the destination of the animals.

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

The procedure used is dedicated to the collection of biological material, which requires to kill the animals before collection.

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

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

Yes > Will a method of killing be used for which specific requirements apply?

No > Describe the method of killing.

Animal will be sacrificed by cervical dislocation.

Yes > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

If animals are killed for non-scientific reasons, justify why it is not feasible to rehome the animals.

Format Niet technische samenvatting

Let op: bij gebruik van dit word-format dient uiteindelijk alsnog het Excel-format te worden ingevuld voordat uw aanvraag vergund kan worden (zie Procesbeschrijving word-document NTS).

Please fill this form out in Dutch. Dit formulier moet ingevuld worden in het Nederlands.

=>Let op de richtlijn is ~500 woorden in totaal<=

Link naar EU Guidance document: [Working document on Non-Technical Project summaries](#)

Link naar CCD toelichting: [Toelichting bij de formulieren projectaanvraag](#)

Tab NTS

Country	NL
Language	NL
EU submission	<input checked="" type="checkbox"/> yes <input type="checkbox"/> no
Title of the project	De rol van de (pro)renine receptor (PRR) in de homeostase van de huid. Op weg naar de ontrafeling van ontstekingen veroorzaakt door proteotoxische stress en hoe dit relevant is voor het ontstaan van eczeem.
NTS identifier	Deze wordt door de CCD ingevuld
NTS national identifier	Deze wordt door EC ingevuld
Duration of the project	60 maanden
Keywords/Trefwoorden	
Keyword 1	Huid
Keyword 2	Stress
Keyword 3	Immuunrespons
Keyword 4	Ontwikkeling
Keyword 5	Ontsteking

Purpose(s) of the project
Objectives of the project/ Doel van het project
<i>Describe the objectives of the project (for example, addressing certain scientific unknowns, of scientific or clinical needs). Compulsory! Maximum length is 2500 characters</i>
<p>In dit project doen we onderzoek naar proteotoxische stress. Proteotoxische stress is een proces wat zich afspeelt in cellen. Door verschillende externe factoren kunnen de eiwitten in deze cellen van vorm gaan veranderen en samenklonteren. Doordat deze eiwitten een abnormaal uiterlijk hebben, kunnen ze ook hun functie niet correct uitvoeren. Dit kan zorgen voor verschillende problemen in de cel, waaronder chronische ontstekingen. In dit onderzoek ligt de focus op chronische ontstekingen in de huid, in het bijzonder op eczeem.</p> <p>Het doel van het project is dan ook het ontrafelen van de onderliggende mechanismen die de oorzaak zijn van proteotoxische stress-geassocieerde ziekten. Het is reeds onderzocht dat in eczeem aanhoudende proteotoxische stress kan leiden tot chronische ontstekingen, wat samenhangt met een constante aanwezigheid van immuuncellen.</p> <p>Om dit alles te onderzoeken hebben we speciale muismodellen ontwikkeld. Deze muizen missen een belangrijk molecuul op de buitenkant van hun cellen: de (pro)renine receptor (hierna PRR genoemd). Door de afwezigheid hiervan ontstaat er proteotoxische stress in hun cellen. Deze muizen kunnen hierdoor gebruikt worden om:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) De mechanismen te bestuderen die leiden tot proteotoxische stress en de immuunrespons die hiermee samenhangt. (2) Te onderzoeken hoe continue proteotoxische stress kan leiden tot chronische ontstekingen.

Uiteindelijk zullen we ook verschillende stoffen evalueren die kunnen voorkomen dat er chronische ontstekingen ontstaan. Op deze manier kunnen we het proces rond proteotoxische stress beter begrijpen, waardoor er op den duur ook nieuwe aangrijpingspunten voor therapieën tegen chronische huidziekten gevonden kunnen worden.

Potential benefits likely to derive from this project / Mogelijke opbrengsten van het project

What are the potential benefits likely to derive from this project? Explain how science could be advanced, or humans, animals or environment may ultimately benefit from the projects. Where applicable, differentiate between short-term benefits (within the duration of the project) and long-term benefits (which may accrue after the project is finished). Compulsory! Maximum length is 2500 characters

Met dit project verwachten wij meer te weten te komen over de chronische ontsteking die voortkomen uit proteotoxische stress.

Verder willen wij een goed model te ontwikkelen dat menselijk eczeem accuraat nabootst. Dit model kan vervolgens gebruikt worden om medicijnen op te testen waardoor er uiteindelijk nieuwe behandelingen voor eczeem uitgedacht kunnen worden.

Omdat er nog niet veel bekend is over proteotoxische stress en de ontstekingen die hieruit voortkomen, kan er door dit model ook een basis worden gelegd voor onderzoek naar andere proteotoxische stress-geassocieerde ziekten.

Predicted harms

In what procedures will the animals typically be used / Welke handelingen ondergaan de dieren?

In what procedures will the animals typically be used (for example, injections, surgical procedures)? Indicate the number and duration of these procedures. Compulsory! Maximum length is 2500 characters

In dit onderzoek gebruiken wij muizen die een genetische aanpassing hebben ondergaan (de verwijdering van de PRR op de buitenkant van hun cellen). Deze muizen zullen hierdoor chronische ontstekingen in de huid ontwikkelen. Dieren zullen de volgende handelingen ondergaan:

- (1) De huid van deze aangepaste (en onaangepaste) muizen zal verzameld worden. Dit wordt gedaan op verschillende tijdstippen voor de geboorte van de muizen. Daarnaast zullen deze dieren (via de moeder) stoffen toegediend krijgen die de chronische ontstekingen kunnen voorkomen of behandelen.
- (2) De huid van aangepaste (en onaangepaste) muizen wordt ook verzameld na de geboorte. Dit wordt gedaan op verschillende tijdstippen van ontwikkeling van huiddefecten (5-8 dagen, 15 dagen, 90 dagen). Dieren zullen soms behandeld worden met stoffen die chronische ontstekingen kunnen voorkomen of behandelen.

Handeling (1) en (2) zijn onafhankelijke procedures waarbij dieren van verschillende genetische achtergronden betrokken zijn.

Expected impacts/adverse effects on the animals / Welk ongerief ondergaan de dieren en geef daarbij de verwachte ongeriefsclassificatie (terminaal, licht, matig of ernstig) aan.

What are the expected impacts/adverse effects on the animals for example pain, weight loss, inactivity/reduced mobility, stress, abnormal behaviour, and the duration of those effects? Compulsory! Maximum length is 2500 characters

We verwachten alleen negatieve gevolgen in de muizen waar het PRR-gen ontbreekt. Deze muizen kunnen na het verwijderen van het PRR-gen veranderingen van de huid vertonen. De verschijnselen die worden gezien zijn o.a. haaruitval en jeuk. Vanwege dit lijden worden de muizen zo kort mogelijk na het verschijnen van deze huidveranderingen onderzocht.

In sommige experimenten worden vrouwelijke muizen bevrucht en vervolgens gedood om de embryo's in verschillende ontwikkelingsstadia te verkrijgen. In andere experimenten worden dieren behandeld met een stof doormiddel van injectie. Bij sommige muizen kunnen hierdoor ontstekingen

in de huid ontstaan, wat kan zorgen voor pijn en jeuk bij de dieren. Alle dieren worden gedood na afloop van de experimenten.

Het ongerief dat de dieren ondervinden kan als volgt worden ingedeeld:

Licht ongerief: 96,6 %

Matig ongerief: 3,4 %

Reasons for the planned fate of the animals after the procedure / Beschrijf het eindpunt van de dieren en waarom dat zo gekozen is.

Please provide reasons for the planned fate of the animals after the procedure. Compulsory! Maximum length is 2500 characters

De muizen zullen worden gedood om de huid te verzamelen en er verdere experimenten mee uit te voeren. Daarnaast worden bij het verkrijgen van de muizenembryo's ook de moeders gedood.

Application of the Three Rs

1. Replacement/Vervanging

State which non-animal alternatives are available in this field and why they cannot be used for the purposes of the project. Compulsory! Maximum length is 2500 characters

Waar mogelijk gebruiken wij menselijke huid (die met toestemming verkregen is), voor experimenten in het laboratorium. Deze methode is echter niet uitgebreid genoeg. Het mechanisme wat in ons onderzoek bestudeerd wordt omvat namelijk veel verschillende celtypes (waaronder meerdere soorten huid- en immuuncellen) die in nauw contact staan en op elkaar reageren. Dit complexe systeem kan het beste onderzocht worden in een levend organisme. Een kweekbakje met cellen voldoet hierom niet. Daarnaast kan in een levend organisme onderzocht worden of de stoffen die toegediend worden, ook effect hebben op normale cellen.

2. Reduction./Vermindering

Explain how the numbers of animals for this project were determined. Describe steps that have been taken to reduce the number of animals to be used, and principles used throughout the project to minimise the number of animals used consistent with scientific objectives. Those practices may include e.g. pilot studies, computer modelling, sharing of tissue and reuse. Compulsory! Maximum length is 2500 characters

Voordat er onderzoek wordt gedaan op muizen, zal het effect van de afwezigheid van de PRR en de toegediende stoffen eerst worden onderzocht op cellen in een kweekschaal. Ter vermindering van het aantal proefdieren hebben we statistisch berekend hoeveel dieren er minimaal nodig zijn. Ten slotte wordt er zoveel mogelijk van de huid van elke muis gebruikt. Deze wordt vervolgens gebruikt voor verschillende soorten experimenten, zodat er niks verloren gaat.

3. Refinement/Verfijning

Give examples of the specific measures (e.g., increased monitoring, post-operative care, pain management, training of animals) to be taken, in relation to the procedures, to minimise welfare costs (harms) to the animals. Describe the mechanisms to take up emerging refinement techniques during the lifetime of the project. Compulsory! Maximum length is 2500 characters

Tijdens het onderzoek worden de muizen uitvoerig in de gaten gehouden. Zodra de muizen huidveranderingen vertonen worden ze zo snel mogelijk onderzocht. De muizen krijgen daarnaast huisvesting volgens vaste richtlijnen.

Van tevoren wordt een humaan eindpunt bepaald. Om te voorkomen dat het dier te veel ongerief ondergaan zullen zij geëuthanaseerd worden wanneer dit eindpunt behaald wordt. Dit zal naar verwachting echter bijna nooit voorkomen.

Explain the choice of species and the related life stages/ Beschrijf de keuze voor de soort, het diermodel en de leeftijdsstadia.

Compulsory! Maximum length is 2500 characters

De muis wordt gebruikt omdat deze makkelijk genetisch gemodificeerd kan worden. Daarnaast is het voor dit onderzoek essentieel om een dier met een huid te gebruiken. Hierdoor zijn minder complexe organismen zoals insecten of vissen niet geschikt voor dit onderzoek. Wij bouwen voort

op de ruime kennis die wij hebben van muizen, de huid en het immuunsysteem en hebben hierdoor dit model kunnen ontwikkelen.

De verschillende levensfasen die hier gebruikt zijn, zijn gebaseerd op onze eerdere experimenten. Proteotoxische stress en de beginfase van de immuunrespons zullen worden bestudeerd voor de geboorte van de muizen. De volledige immuunrespons en chronische ontsteking worden onderzocht na de geboorte omdat het immuunsysteem dan pas volledig ontwikkeld is.

Tab Purpose of the project

Basic research: Sensory Organs (skin, eyes, and ears) [PB9]

Maintenance of colonies of established genetically altered animals, not used in other procedures [PG43]

Choose a purpose

Choose a purpose

Choose a purpose

Tab Expected harms

What species and numbers of animals are expected to be used? What are the expected severities and the numbers of animals in each severity category (per species)?

Estimated numbers per severity				
<i>Please fill in all categories for selected species with whole numbers (0 or higher)!</i>				
Species	Non-recovery	Mild	Moderate	Severe
Mice (Mus muscules) [A1]	0	8336	128	0
Choose a species				

Tab Fate of animals kept alive

What will happen to the animals kept alive at the end of the procedure?

Estimated numbers per severity			
<i>Please fill in all categories for selected species with whole numbers (0 or higher)!</i>			
Species	Reused	Returned	Rehomed
Mice (Mus muscules) [A1]	N/A	N/A	N/A
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			
Choose a species			



Advies aan CCD

Datum 15 november 2022
Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202216092

Instelling: 5.1 lid2h
Onderzoeker: 5.1 lid2h
Project: Role of the (Pro) renin receptor (PRR) in skin development and homeostasis. Towards deciphering inflammation induced by proteotoxic-stress.
Aanvraagnummer: AVD202216092
Betreft: Nieuwe aanvraag
Categorieën: Fundamenteel onderzoek

1 Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's

Proces	<p>Het Secretariaat heeft nog geen vragen gesteld, maar stelt voor om de volgende vragen te stellen:</p> <ul style="list-style-type: none">- Uit het projectvoorstel blijkt onvoldoende wat het atp6ap2fl/fl model geschikt maakt voor voor het onderzoeken van proteotoxische stress in algemene zin, aangezien dieren met deze specifieke afwijking niet levensvatbaar lijken te zijn. Ook is onvoldoende toegelicht wat de translationele waarde is van het model ten aanzien van atopische dermatitis in mensen en hoe de voorgestelde proeven hier inzicht in kunnen verschaffen. Deze informatie is van belang voor het maken van een schade/baten analyse van het project. Wij verzoeken u deze punten verder toe te lichten.- De algehele onderzoeksstrategie in uw projectaanvraag is onvoldoende inzichtelijk. Het is niet duidelijk hoe restoratieve (genetische of farmacologische) behandelingen zullen worden geselecteerd en uitgevoerd. Ook is onvoldoende helder beschreven wat er tijdens de pilotexperimenten in bijlage 3.4.3.1 zal worden onderzocht en welke uitkomstparameters zullen worden gebruikt om het restoratieve effect van behandelingen vast te stellen in bijlage 3.4.3.2. en wat in deze bijlage de go/no-go criteria zijn voor verdere experimenten. Wij verzoeken u om de strategie op deze punten verder toe te lichten.- In beide bijlagen is niet helder op welke manier de potentiële effectiviteit van de, nog te selecteren, behandelingen zal worden onderzocht. Kunt u toelichten welke manier geborgd wordt dat bij de selectie en inzet van deze behandelingen voldaan zal worden aan de vereisten omtrent vervanging, vermindering en verfijning?
---------------	--

- In bijlage 3.4.3.1 stelt u dat (nog onbekende) behandelingen bijwerkingen kunnen veroorzaken. U hebt echter kaders gesteld voor het mogelijke ongerief van deze bijwerkingen. Ook zijn in deze bijlagen geen humane eindpunten geformuleerd die het ongerief van eventuele bijwerkingen kunnen inperken. Kunt u de bijlage op deze punten aanvullen?

- In bijlage 3.4.3.2 zal een deel van de dieren (huid)inflammatie ontwikkelen. Het is echter niet duidelijk welke mogelijkheden tot pijnstilling voor deze dieren zijn overwogen en waarom pijnstilling niet wordt toegepast. Kunt u uw overwegingen omtrent pijnstilling toelichten?

- Ten aanzien van de embryo's in bijlage 3.4.3.1 stelt u dat deze licht ongerief zullen ondergaan. Een aanzienlijk deel van deze embryo's zal echter in een vergevorderd stadium van de dracht komen te overlijden aan de gevolgen van hun genetische modificatie. In bijlage VIII van richtlijn 2010/63/EU geeft de volgende voorbeelden van ernstig ongerief:

- Toxiciteitstests met de dood als eindpunt, dan wel met naar verwachting sterfgevallen en de opwekking van ernstige pathopsychologische toestanden.

- Modellen voor de inductie van tumoren, of met spontane tumoren, waarbij naar verwachting een dodelijke voortschrijdende ziekte optreedt, gepaard met een langdurige matige vorm van pijn, angst of lijden.

- Het fokken van dieren met genetische afwijkingen die naar verwachting de algemene toestand van het dier ernstig en permanent zullen hinderen. Op basis van de raakvlakken van het atp6ap2 model met de bovengenoemde voorbeelden is in onze ogen ernstig ongerief niet uit te sluiten. Voor ongeboorte dieren is moeilijk vast te stellen in welke mate de dieren daadwerkelijk pijn kunnen ervaren. Daarom zou in onze ogen zou het zorgvuldigheidsprincipe hier op zijn plaats zijn. Kunt u onderbouwen waarom u van oordeel bent dat deze dieren slechts licht ongerief zullen ervaren ondergaan of het ongerief voor deze dieren aanpassen naar een niveau dat in lijn is met de voorbeelden in de richtlijn?

Vragen NTS:

- In de NTS hebt u 'Instandhouding kolonies' als doelstelling aangevinkt, terwijl dit niet het geval is in de projectaanvraag zelf. Kunt u deze doelcategorie uit de NTS verwijderen?

- Kunt u de NTS in het officiële Excel format aanleveren? Dit format is te downloaden op de website van de CCD.

Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
3.4.3.1 Collection of skin from embryos at stages E13.5, E14.5, E15.5 and E18.5 (K5-Cre driven deletion). For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin				
	Muizen (Mus musculus)	Primiparous > 8-week-old, atp6ap2 Flox/Flox of atp6ap2 Flox/Flox in combination with gain or loss of function in candidate gene; E13.5/E14.5/E15.5/E18.5, Epidermal-specific deletion of atp6ap2 and control littermates in combination with gain or loss of function in candidate gene	7.490	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn
3.4.3.2 Collection of skin from control and mutant mice at different time points of skin defect development (5-8 days, 15 days, 30 days post tamoxifen injection) (K14-Cre ESR1 driven deletion). For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin				

	Muizen (<i>Mus musculus</i>)	Epidermal-specific deletion of <i>atp6ap2</i> sometimes in combination with gain or loss of function in candidate gene, and control littermates	974	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn
--	--------------------------------	---	-----	---------------------------------------

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

3.4.3.1 Collection of skin from embryos at stages E13.5, E14.5, E15.5 and E18.5 (K5-Cre driven deletion). For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin

Muizen (*Mus musculus*) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

3.4.3.2 Collection of skin from control and mutant mice at different time points of skin defect development (5-8 days, 15 days, 30 days post tamoxifen injection) (K14-Cre ESR1 driven deletion). For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin

Muizen (*Mus musculus*) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

Locatie uitvoering experimenten	- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
--	--

2 DEC advies

DEC-advies	Citaat C18. Voor de experimenten in bijlage 1 zullen zowel mannelijke als vrouwelijke dieren worden gebruikt. Voor bijlage 2 zullen de meeste experimenten eerst worden uitgevoerd met alleen controle- en knock-out mannelijke muizen. Afhankelijk van de bevindingen en hoe relevant het opnemen van vrouwelijke muizen is, zal er een Go no-Go moment zijn om te beslissen of vrouwtjes moeten worden opgenomen in aanvullende experimenten. Dit is naar inziens van de DEC voldoende wetenschappelijk onderbouwd Ethische afweging van de DEC: Citaat.
-------------------	---

1. Rechtvaardigt het onderzoek dat gericht is op het ontrafelen van de moleculaire en cellulaire mechanismen van intracellulaire proteotoxische stress alsook de mechanismen van het induceren van een immunologische door proteotoxische stress de inzet van 6420 muizen, waarvan 6420 embryo's (>13.5) die allemaal mild ongerief zullen ondervinden en 2044 volwassen muizen waarvan 98,5% mild ongerief zullen ondervinden en 1,5% cumulatief matig ongerief?

2. De belangrijkste belanghebbenden in dit project dat gericht is op het ontrafelen van de moleculaire en cellulaire mechanismen van intracellulaire proteotoxische stress alsook de mechanismen van het induceren van een immunologische door proteotoxische stress zijn de proefdieren de betrokken onderzoekers, de patiënten en de samenleving. Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: een nadeel. De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de genetische modificatie en de muizen zullen licht (98,5% van de dieren) tot matig (1,5%) ongerief ondervinden.

Waarden die voor de onderzoekers bevorderd worden: mogelijk voordeel. Er zijn al veelbelovende resultaten behaald in voorgaande onderzoeken en de voorgestelde studies kunnen leiden tot enerzijds meer kennis over fundamentele pathogenetische aspecten van AD maar ook omtrent de validatie van het PRR deletie muizenmodel als onderzoeksmodel voor AD. Hierdoor zullen de wetenschappers nieuwe kennis verkrijgen wat kan uitmonden in publicaties waardoor hun carrièremogelijkheden kunnen verbeteren.

Waarden die de patiënten bevorderd kunnen worden: mogelijk voordeel door de beschikbaarheid van nieuwe kennis omtrent de pathogenese van AD kan er nieuw perspectief ontstaan op nieuwe behandelingsstrategieën waardoor de individuele ziektelast zal afnemen en de kwaliteit van leven toenemen.

Waarden die voor de samenleving bevorderd kunnen worden: een mogelijk voordeel: effectievere behandeling van AD patiënten zal resulteren in daling van de zorgkosten en verzuimkosten.

De DEC leden zijn van mening dat het projectvoorstel en de antwoorden op de gestelde vragen nog onvoldoende duidelijkheid hebben opgeleverd over met name de berekeningen van het aantal dieren, de toepassing van compounds en de overeenkomst tussen het muismodel met PRR deletie en AD bij de mens. Om die reden is de aanvrager gevraagd om een mondelinge toelichting te geven tijdens de DEC vergadering. De toelichting en de daarop volgende discussie heeft ertoe geleid dat DEC leden wel hun individuele ethische afweging konden maken. De DEC leden zijn niet unaniem maar wel in meerderheid van mening dat de belangen van de AD patiënten, de samenleving en de onderzoekers groter dan die van de proefdieren.

3. Het belang van PRR receptoren voor een normale ontwikkeling van de huid en voor het behoud van huidhomeostase is in voorgaande studies vastgesteld. De pathologische huidveranderingen die optreden bij afwezigheid van PRR vertonen, histologisch en immunologisch, overeenkomst met de veranderingen in de huid bij Atopische dermatitis (AD) patiënten. Door het vergaren van fundamentele kennis over de cascade van pathofysiologische processen die optreden in de huid van het PRR deletie muismodel hoopt men meer kennis te verkrijgen over de pathogenese van AD. Nieuwe kennis over de pathogenese van AD biedt wellicht mogelijkheden om nieuwe behandelingsstrategieën te ontdekken. Volgens huidartsen is AD niet alleen een veel voorkomende maar ook een ondermijnende huidaandoening waar nog onvoldoende behandelingen voor beschikbaar zijn, m.a.w. er is behoefte aan verdieping van kennis over de pathogenese en aan aanknopingspunten voor mogelijk nieuwe behandelingen. Dit rechtvaardigt volgens de meerderheid van de DEC leden vervolgonderzoek in PRR deletie muismodellen. Deze DEC leden zijn overtuigd van het maatschappelijk – en wetenschappelijk belang van het beschreven onderzoek. De ethische afweging door DEC leden levert geen consensus op, de meeste DEC leden zijn van mening dat de belangen van de patiënten, de samenleving en de onderzoekers zwaarder wegen dan de belangen van de proefdieren; deze DEC leden geven een positief advies.

Deze DEC leden zijn overtuigd van het belang van de doelstellingen van dit project. Naar inziens van deze DEC leden beschrijft de aanvraag belangrijk onderzoek, dat zowel maatschappelijk als ook wetenschappelijk zeer relevant is. Deze DEC leden zijn van mening dat:

- de waarden die voor de patiënten, de samenleving en de onderzoekers bevorderd kunnen worden zwaarder wegen dan de waarden die voor de proefdieren in het geding zijn.
- de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstelling en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.
- dat de onderzoeksgroep voldoende kennis en ervaring heeft om met de gekozen onderzoeksstrategie en met de voorgestelde dierproeven de doelstelling te behalen en dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om het ongerief van de dieren te beperken.
- de doelstelling niet zonder het gebruik van proefdieren behaald kan worden en acht het gebruik van proefdieren en het daarmee samenhangende ongerief bij de dieren ethisch gerechtvaardigd.

De DEC heeft extern advies ingewonnen bij

- de aanvrager is om aanvullingen gevraagd

Citaat A8 (horen van de aanvrager).

De DEC heeft bij de aanvrager aanvullende informatie ingewonnen met betrekking tot de keuze voor het model, het ongerief van de embryo's, de humane eindpunten voor de dieren met een huidfenotype en de 3 replicaten.

- Het horen van de aanvrager heeft niet geleid tot aanpassing van de aanvraag.

Citaat A9 (Correspondentie met de aanvrager).

De DEC heeft bij de aanvrager aanvullende informatie ingewonnen met betrekking tot de focus van het onderzoek, het type compounds dat gebruikt wordt, de go/no-go momenten, de selectiecriteria voor de te gebruiken compounds, de berekening van het aantal benodigde nestjes/dieren, de toedieningsroute en frequentie, het ongerief van de embryo's, het ongerief als gevolg van de toediening van compounds en de humane eindpunten. Daarnaast heeft de DEC verzocht de NTS aan te passen.

- De antwoorden hebben wel geleid tot aanpassing van de aanvraag

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus.

Citaat E3.

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt in de DEC.

Eén van de DEC leden komt tot een negatief advies: "Hieronder geef ik mijn inschatting van het wetenschappelijke en maatschappelijke belang van het voorgestelde onderzoek en formuleer ik de twee belangrijkste bezwaren die ik tegen het onderzoek heb, en die mijn negatieve advies motiveren.

Het belang van het onderzoek schat ik als gemiddeld in. Het wetenschappelijk belang is dat dit onderzoek kan bijdragen aan meer begrip van de mechanismen achter huidaandoeningen, in het bijzonder atopische dermatitis (AD) maar ook psoriasis en wellicht huidaandoeningen meer in het algemeen. Dit wetenschappelijke belang zie ik echter niet los van het maatschappelijke belang van dit onderzoek. De verwachte wetenschappelijke opbrengst van dit onderzoek heeft in

mijn optiek waarde voor zover het (in combinatie met andere studies in dit domein) uiteindelijk bijdraagt aan de ontwikkeling van meer effectieve therapieën voor huidaandoeningen – ik zie geen grote waarde in de wetenschappelijke opbrengst in zichzelf, los van een eventuele vertaling naar therapieën. Het ontwikkelen van meer effectieve therapieën voor huidaandoeningen dient zeker een relevant maatschappelijk belang. Volgens een systematische review en meta-analyse (Birdi et al. 2020) heeft AD een significante invloed op de kwaliteit van leven (QoL) van patiënten, met name door symptomen als jeuk, ontsteking en slapeloosheid; deze symptomen zijn meer van invloed dan de impact op het uiterlijk. Volgens hetzelfde onderzoek is er ook een significante negatieve relatie tussen de ernst van de aandoening en QoL, maar lopen de scores in verschillende onderzoeken nogal uiteen – hoe zwaar ernstigere vormen van AD precies op de QoL drukken en in welke mate bestaande therapieën effectief zijn wordt (mij) dan ook niet helemaal duidelijk. Desondanks accepteer ik dat het ontwikkelen van therapieën een relevant maatschappelijk belang dient, vooral ook gezien door de hoge prevalentie van huidaandoeningen zoals atopische dermatitis. Dit belang is denk ik niet zo groot als voor aandoeningen met een eveneens hoge prevalentie en een ernstiger ziekteverloop, maar toch substantieel. Ik heb echter bezwaar tegen, ten eerste, het model waarvan dit onderzoek gebruik wil maken. Zoals ik het begrijp is het plan genetisch aangepaste muizen te ontwikkelen die al als embryo een aandoening ontwikkelen die qua symptomen op AD lijkt. In de eerste fase van het onderzoek zou worden gekeken hoe de aandoening zich in verschillende fasen in de embryo's manifesteert (met uiteenlopende uitleesparameters) en in de tweede fase of er stoffen toegediend kunnen worden die de ontwikkeling van de aandoening kunnen stoppen of remmen. Zoals ook in onze DEC vergaderingen over deze aanvraag besproken, is dit wetenschappelijk gezien een ingewikkeld model: de aandoening ontwikkelt zich op een heel andere manier in de muizen, waar de aandoening door specifieke genetisch aanpassingen geïnduceerd wordt, dan bij mensen, waar niet zo een duidelijke genetische oorzaak voor AD te vinden is. In de latere stadia zouden de mechanismen tussen mens en muismodel op elkaar moeten lijken, maar wetenschappelijk gezien is het model in elk geval niet straightforward. Bovendien roept het model in mijn optiek ethische bezwaren op. Naar verwachting zullen 10% van de embryo's van 13,5 dag oud, 30% van de embryo's van 15,5 dag oud, en 90% van de embryo's van 18,5 dag oud door de aandoening komen te overlijden. Op de overleden embryo's kunnen als ik het goed begrijp niet altijd wetenschappelijke experimenten uitgevoerd worden: zeker als het jongere embryo's betreft zijn ze vaak niet meer terug te vinden. Daarom moeten er méér embryo's 'gegeneerd' worden voor de wetenschappelijke doelstelling van het onderzoek en is

	<p>de relatieve hoeveelheid (niet-)overleden embryo's een belangrijke uitkomstmaat om de effectiviteit van therapeutische stoffen te bepalen. Dit zie ik als een zeer onsubtiele en onwenselijke aanpak om de bedoelde huidandoeningen te onderzoeken, die bij mensen immers hele andere en minder dodelijke uitkomsten hebben. Bovendien is – volgens het antwoord van de onderzoeker zelf op mijn vraag hierover – niet duidelijk in welke mate de embryo's ongerief van hun fenotype en overlijden ondervinden. De onderzoeker stelt dat dit moeilijk te bepalen is en verder dat de meeste embryo's al relatief jong overlijden (rond 15,5 dag oud). Een muizenembryo ontwikkelt zich echter in ongeveer 21 dagen, en muizen van 15,5 dag zijn dus naar mijn idee relatief ver ontwikkeld; daarnaast overlijdt 30% van de embryo's tussen de 15,5e en 18,5e dag. Daarom kan mijns inziens niet worden aangenomen dat de embryo's geen ongerief zullen ervaren. Dat de mate waarin embryo's zullen lijden zo onduidelijk is, zie ik als belangrijk probleem van deze onderzoeksopzet. Wellicht is er wetenschappelijk gezien op dit moment geen beter model – daar kan ik niet over oordelen – maar dat betekent niet dat de nadelen van dit model dus geaccepteerd moeten worden. Een tweede bezwaar tegen dit onderzoek is dat de berekeningen van de aantallen benodigde dieren en de go/no-go momenten onduidelijk zijn gebleven. Hoewel de DEC algemeen de indruk had dat de onderzoekers goed over de onderzoeksopzet hadden nagedacht en op basis daarvan aannam dat de berekeningen en go/no-go momenten ook wel in orde (zij het onduidelijk) zouden zijn, vind ik dat onvoldoende. Eén van de taken van de DEC is om te controleren of aan de 3 V's voldaan is, maar wat mij betreft heeft de DEC niet kunnen vaststellen dat er inderdaad geen mogelijkheden tot vermindering zijn. Dit bezwaar weegt voor mij minder zwaar dan het vorige maar telt wel mee in mijn negatieve advies."</p>
--	---

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies	<p>Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen. maar de beantwoording van beoordelingsvragen sluit in onze ogen niet op alle punten aan bij de inhoud van de projectaanvraag. Ten aanzien van de projectaanvraag in de huidige staat (28-10-2022) kunnen wij ons meer vinden in het minderheidsstandpunt.</p> <p>De aanvraag schiet in onze ogen inhoudelijk nog te kort op de volgende punten:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Uit het projectvoorstel blijkt onvoldoende wat het atp6ap2fl/fl model geschikt maakt voor voor het onderzoeken van proteotoxische stress in algemene zin. Dieren met deze specifieke afwijking lijken immers niet levensvatbaar te zijn. Ook is onvoldoende toegelicht wat de translationele waarde is van het model ten aanzien van atopische dermatitis in mensen en hoe de voorgestelde
-----------------------------	--

proeven hier inzicht in kunnen verschaffen. Deze informatie is van belang voor het maken van een schade/baten analyse van het project.

- De algehele onderzoeksstrategie in de projectaanvraag is onvoldoende inzichtelijk. Het is niet duidelijk hoe restoratieve (genetische of farmacologische) behandelingen zullen worden geselecteerd en uitgevoerd. Ook is onvoldoende helder beschreven wat er tijdens de pilotexperimenten in bijlage 3.4.3.1 zal worden onderzocht en welke uitkomstparameters zullen worden gebruikt om het restoratieve effect van behandelingen vast te stellen in bijlage 3.4.3.2. en wat in deze bijlage de go/no-go criteria zijn voor verdere experimenten.

- In beide bijlagen is niet helder beschreven op welke manier de potentiële effectiviteit van de, nog te selecteren, behandelingen zal worden onderzocht. Zodoende is niet navolgbaar of bij de selectie en inzet van deze behandelingen voldaan zal worden aan de vereisten omtrent vervanging, vermindering en verfijning. Ook worden in bijlage 1.4.3.1. gewezen op mogelijk bijwerkingen van behandelingen, maar worden deze niet ingekaderd door middel van een ongeriefklasse of humane eindpunten. Tot slot zullen dieren in bijlage 3.4.3.2 (huid)inflammatie ontwikkelen. Het is echter niet duidelijk welke mogelijkheden tot pijnstilling voor deze dieren zijn overwogen en waarom pijnstilling niet wordt toegepast.

- Voor het embryomodel in bijlage 3.4.3.1 is het onzeker of het ongerief beperkt zal blijven tot licht. Een aanzienlijk deel van deze embryo's zal in een vergevorderd stadium van de dracht komen te overlijden aan de gevolgen van hun genetische modificatie. In bijlage VIII van richtlijn 2010/63/EU worden de volgende voorbeelden gegeven voor ernstig ongerief:

- Toxiciteitstests met de dood als eindpunt, dan wel met naar verwachting sterfgevallen en de opwekking van ernstige pathopsychologische toestanden.
- Modellen voor de inductie van tumoren, of met spontane tumoren, waarbij naar verwachting een dodelijke voortschrijdende ziekte optreedt, gepaard met een langdurige matige vorm van pijn, angst of lijden.
- Het fokken van dieren met genetische afwijkingen die naar verwachting de algemene toestand van het dier ernstig en permanent zullen hinderen.

Op basis van de raakvlakken van het atp6ap2 model met de bovengenoemde voorbeelden is in onze ogen ernstig ongerief voor deze dieren niet uit te sluiten. Voor ongeboren dieren is moeilijk vast te stellen in welke mate de dieren daadwerkelijk pijn kunnen ervaren. In onze ogen zou het zorgvuldigheidsprincipe hier echter op zijn plaats zijn.

4 Inhoudelijke beoordeling

Belangen- verstrengeling	5.1 lid 2e
-------------------------------------	------------

<p>Doelstelling Doelstelling</p>	<p>Citaat.</p> <p>In this context, the project's immediate goal is to decipher the molecular and cellular mechanisms leading to proteotoxic stress associated disorders. We have developed unique mouse models that represent early and late stages of the immune reaction due to intracellular stress and they will be used to:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Goal 1: define the molecular and cellular mechanisms leading to the proteotoxic stress and the early immune response associated (mouse model 1, PRR deletion during embryogenesis, see 3.4.1). Single cell (Sc) RNAseq analysis of the skin of the PRR mutant and control mice will be compared at different stages of disease development and dysregulated pathways will be confirmed at the protein level (Goal 1.1). When possible, functional restoration approaches will be used to validate major findings by an independent approach (Goal 1.2). - Goal 2: define how this continuous proteotoxic stress leads to chronic inflammation and what are the mediators of the immune response (mouse model 2, post-natal deletion of PRR, see 3.4.1). Sc RNAseq analysis will be performed upon cell isolation at early and later time points and dysregulated pathways will be confirmed at the protein level (Goal 1.1). When possible, functional restoration approaches will be used to validate the findings by an independent approach and to evaluate potential compounds that can reduce inflammation. We will define if this mouse model is relevant to study atopic dermatitis, a human skin disorder associated with TH2 type of immune response (Goal 2.2). <p>The ultimate goal of this project is to get knowledge on the chronic inflammation in response to intracellular stress and on how relevant it is for the pathogenesis of atopic dermatitis, which is a prerequisite for clinical management. We hope to validate our mouse model as a preclinical model of human atopic dermatitis. In addition, this project should give insight on how different immune cells are recruited to the skin during embryonic development, which show quite discrepancies in literature.</p>
---	---

Wetenschappelijk en maatschappelijk belang	<p>Citaat.</p> <p>The scientific relevance of the project is to provide:</p> <p>(1) knowledge on PRR function during skin morphogenesis: first demonstration that PRR controls the epidermal progenitor fate, and that the epidermis controls dermal lymphatic remodelling during development. This communication between epidermis and dermal lymphatic vessels represents a novel area of research, that seems to be associated to an immune reaction as early as at E15.5.</p> <p>(2) knowledge on PRR function in post-natal skin: in particular, on skin inflammation, which is a feature of most of skin conditions. These models will allow deciphering how chronic inflammation is induced and maintained in response to intracellular stress. We hope to develop a good model of atopic dermatitis that integrates the different aspects of the pathology (crosstalk of epidermis and dermis involving immune cells).</p> <p>The social relevance of these findings is to assess the contribution of proteotoxic stress to various skin disorders associated with chronic inflammation. Disorders such as atopic dermatitis, psoriasis, although associated with TH2 and TH1 type of immune response respectively, are both associated with chronic inflammation, which is due to multiple factors of unknown origin. We believe that proteotoxic stress contributes to this inflammation and we hope to characterize the early stages of the response in mice to find markers to access these questions within samples of human origin. If our hypothesis is true, the development of inhibitors of such stress (to be applied topically) could be beneficial for patients with such chronic disorders.</p>
Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang	Het belang is voldoende uitgewerkt.

<p>Wetenschappelijke kwaliteit Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek</p>	<p>Citaat DEC advies C7. Naar overtuiging van de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen (budget en capaciteit) om de projectdoelstelling met de gekozen strategie binnen de gevraagde termijn te kunnen realiseren. Dit projectvoorstel voor proefdieronderzoek is gebaseerd op eerder behaalde onderzoeksresultaten. 5.1 lid2h</p> <p>[Redacted text]</p> <p>Daarnaast heeft de vakgroep unieke muismodellen ontwikkeld waarmee de functie van epidermale PRR tijdens de embryonale ontwikkeling en in het behoud van postnatale huidhomeostase kan worden bestudeerd.</p> <p>Het Secretariaat heeft geen reden te twijfelen aan de kwaliteit van de aanvragers en het onderzoek.</p>
---	---

3V's

Vervanging	<p>3.4.3.1 Collection of skin from embryos at stages E13.5, E14.5, E15.5 and E18.5 (K5-Cre driven deletion). For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin: Citaat.</p> <p>The molecular mechanisms downstream of PRR deletion can be deciphered only in vivo as they involve interactions between cell types of epidermis and dermis. The 3D skin models currently available show reduced barrier properties and do not reflect the complexity of the skin. They show stratified epidermis, but composition of the dermis is reduced to fibroblasts and does not show vessels or immune cells. Discovering early markers of proteotoxic stress in mice will allow accessing if this process is generally found in human disorders. We have a collaboration with the Dermatology department of our institute and have access to human skin cryosections.</p>
	<p>3.4.3.2 Collection of skin from control and mutant mice at different time points of skin defect development (5-8 days, 15 days, 30 days post tamoxifen injection) (K14-Cre ESR1 driven deletion). For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin: Citaat.</p> <p>Phenotypic analysis of PRR deletion involves complex interaction between cell types of epidermis and dermis and the molecular relays are not well established so far and therefore can be determined only in vivo. We have a collaboration with the department of Dermatology of our institution to translate our mouse data to human conditions by using skin cryosections of human skin.</p>

Verminderen	
	<p>3.4.3.1 Collection of skin from embryos at stages E13.5, E14.5, E15.5 and E18.5 (K5-Cre driven deletion). For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin: Citaat.</p> <p>The minimum number of mice required to get statistically significant results has been anticipated based on our previous experiments and statistical analyses. To reduce the number of mice, back skin including that of the head of the embryos will be used.</p>
	<p>3.4.3.2 Collection of skin from control and mutant mice at different time points of skin defect development (5-8 days, 15 days, 30 days post tamoxifen injection) (K14-Cre ESR1 driven deletion). For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin: Citaat.</p> <p>The minimum number of mice required to get significant result has been anticipated based on our previous experiment and statistical analyses. To reduce the number of mice used, only male littermates will be used as a first step.</p> <p>Skin samples will be collected and used for the different analyses.</p>
Verfijnen	
	<p>3.4.3.1 Collection of skin from embryos at stages E13.5, E14.5, E15.5 and E18.5 (K5-Cre driven deletion). For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin: Citaat.</p> <p>The procedure used is dedicated to the collection of biological material. Experiments will be performed by staff that are highly skilled and experienced with animal handling. As a result, all procedures with the animals will be performed with the greatest care and minimal animal distress will be ensured.</p>
	<p>3.4.3.2 Collection of skin from control and mutant mice at different time points of skin defect development (5-8 days, 15 days, 30 days post tamoxifen injection) (K14-Cre ESR1 driven deletion). For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin: Citaat.</p> <p>Endpoints have been defined to allow humane sacrificed of animals. Experiments will be performed by staff that are highly skilled and experienced with animal handling. As a result, all procedures with the animals will be performed with the greatest care and minimal animal distress will be ensured.</p>

Hergebruik	Er is geen sprake van hergebruik van dieren.
-------------------	--

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.3.1 Collection of skin from embryos at stages E13.5, E14.5, E15.5 and E18.5 (K5-Cre driven deletion). For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.3.2 Collection of skin from control and mutant mice at different time points of skin defect development (5-8 days, 15 days, 30 days post tamoxifen injection) (K14-Cre ESR1 driven deletion). For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin	Ja	volgens de richtlijn.

Naam proef		
-------------------	--	--

<p>3.4.3.1 Collection of skin from embryos at stages E13.5, E14.5, E15.5 and E18.5 (K5-Cre driven deletion). For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin</p>	<p>HEP: Worden niet verwacht</p>	
<p>Muizen (Mus musculus)</p>	<p>Ongerief: 100,0% Licht</p>	<p>Een aanzienlijk deel van de Embryo's zal door de genetische modificatie in atp6ap2 komen te overlijden voor E18,5. 5.2 lid1 niet vast te stellen of deze dieren licht ongerief zullen ondergaan, het zorgvuldigheidsprincipe zou daarom moeten worden toegepast. In bijlage VIII van richtlijn 2010/63/EU geeft de volgende voorbeelden van ernstig ongerief:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Toxiciteitstests met de dood als eindpunt, dan wel met naar verwachting sterfgevallen en de opwekking van ernstige pathopsychologische toestanden. - Modellen voor de inductie van tumoren, of met spontane tumoren, waarbij naar verwachting een dodelijke voortschrijdende ziekte optreedt, gepaard met een langdurige matige vorm van pijn, angst of lijden. - Het fokken van dieren met genetische afwijkingen die naar verwachting de algemene toestand van het dier ernstig en permanent zullen hinderen. <p>Op basis van de raakvlakken van het model voor proteotoxische stress in embryo's in het laatste derde deel van de zwangerschap, zou vanuit het zorgvuldighedsprincipe uitgegaan moeten worden van ernstig ongerief voor deze embryo's.</p>

3.4.3.2 Collection of skin from control and mutant mice at different time points of skin defect development (5-8 days, 15 days, 30 days post tamoxifen injection) (K14-Cre ESR1 driven deletion). For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin	HEP: 1%	Citaat. Mice will be observed in a daily basis starting at Day 15 post-tamoxifen injection and will be humanely sacrificed in case the following define end points are reached: visible pain (abnormal posture and/or movement), significant weight loss (> 10 %), abnormal behavior (isolation) as well as if 50% of their body surface exhibits erythema or if they constantly scratch or if they have a wound greater than 0.5 cm in length
Muizen (Mus musculus)	Ongerief: 13,1% Matig 86,9% Licht	

5 Samenvatting

Het project is een voortzetting van AVD **5.1 lid 2h**, hierin heeft men een atp6ap2fl/fl muismodel opgezet waarbij geen The (pro)renin receptor (PRR) op de opperhuid wordt aangemaakt. Zie pagina 2 van het projectvoorstel voor de opbrengsten van dit project. In navolging van dit project wil men in de huidige aanvraag proteotoxische stress (pathologie door beschadigde of verkeerd gevouwen eiwitten) nauwkeuriger karakteriseren, de cellulaire en moleculaire mechanismen ontrafelen die leiden tot proteotoxische stress en de moleculaire cascade ontrafelen die volgt op de proteotoxische stress en de TH2 type immuunrespons induceert. De TH2 immuunrespons resulteert in chronische huidontsteking die histologisch en immunologisch veel overeenkomsten vertoont met atopische dermatitis bij de mens. Dat maakt dat de onderzoekers dit (PRR deletie) muismodel willen inzetten voor pathogenese onderzoek van atopische dermatitis.

Waar mogelijk willen de onderzoekers manipulaties (genetisch/compounds) toepassen, als verificatie en validatie van de ondeliggende moleculaire mechanismen, die de cascade van pathologische veranderingen kunnen blokkeren, voorkomen of zelfs kunnen terugdraaien, m.a.w. regeneratie van pathofysiologische veranderingen.

5.2 lid1

De DEC geeft een positief advies met een op basis van een meerderheidsstandpunt. Eén lid geeft een negatief advies op basis van twijfels over de translationele waarde van het model voor humane atopische dermatitis en omdat het atp6ap2fl/fl model met embryodterfte als uitkomstparameter ethisch zeer onwenselijk zou zijn is gezien het grote aantal benodigde embryo's, waarvan slechts een beperkt aantal geanalyseerd wordt en de onduidelijke mate van ongerief dat deze embryo's, waarvan een deel ver ontwikkeld zal zijn, zullen ondergaan. Tot slot vindt dit DEC lid dat de benodigde aantallen go/no-go momenten onvoldoende de helder zijn. ^{5.2 lid1}

5.2 lid1 isonvoldoende toegelicht waarom het atp6ap2fl/fl een geschikt model is voor het onderzoeken van proteotoxische stress in algemene zin. 5.2 lid1 onvoldoende toegelicht wat de mogelijke translationele waarde is van het model voor atopische dermatitis in mensen.

De strategie is onvoldoende inzichtelijk. Het is niet duidelijk hoe restoratieve (genetische of farmacologische) behandelingen zullen worden geselecteerd en uitgevoerd, wat er in pilotexperimenten (bijlage 1) zal worden onderzocht en welke uitkomstparameters zullen worden gebruikt om het restoratieve effect van een behandeling vast te stellen (bijlage 2) en wanneer dit to een go/no-go zal leiden.

Het is niet te beoordelen is of de aanvraag voldoet aan de vereisten omtrent de 3V's. Er wordt in bijlage 1 gesproken over mogelijke bijwerkingen van behandelingen, maar er zijn geen humane eindpunten geformuleerd ten aanzien van deze mogelijke bijwerkingen. In bijlage 2 zullen dieren huidinflammatie ontwikkelen, maar wordt niet ingegaan op de mogelijkheid om analgesie toe te passen. In beide bijlagen zullen nog onbepaalde behandelingen worden geselecteerd, maar wordt niet beschreven hoe de potentiële effectiviteit zal worden getoetst voorafgaand aan de in vivo experimenten.

Het ongerief voort de embryo's is te licht ingeschat. Een aanzienlijk deel van de Embryo's zal door de genetische modificatie in atp6ap2 komen te overlijden tussen E15,5 (30% en E18,5 (90%). 5.2 lid1 niet vast te stellen of deze dieren licht ongerief zullen ondergaan, het zorgvuldigheidsprincipe zou daarom moeten worden toegepast. In bijlage

VIII van richtlijn 2010/63/EU geeft de volgende voorbeelden van ernstig ongerief:

- Toxiciteitstests met de dood als eindpunt, dan wel met naar verwachting sterfgevallen en de opwekking van ernstige pathopsychologische toestanden.
 - Modellen voor de inductie van tumoren, of met spontane tumoren, waarbij naar verwachting een dodelijke voortschrijdende ziekte optreedt, gepaard met een langdurige matige vorm van pijn, angst of lijden.
 - Het fokken van dieren met genetische afwijkingen die naar verwachting de algemene toestand van het dier ernstig en permanent zullen hinderen.
- Op basis van de raakvlakken van het model voor proteotoxische stress in embryo's in het laatste derde deel van de zwangerschap, zou vanuit het zorgvuldighedsprincipe uitgegaan moeten worden van ernstig ongerief voor deze embryo's.

6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning

5.2 lid1



5.2 lid1



De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.

7 Concept beschikking voor akkoord CCD



Advies aan CCD

B

Datum 18 november 2022
Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202216092

Instelling: 5.1 lid2h
Onderzoeker: 5.1 lid2e
Project: Role of the (Pro) renin receptor (PRR) in skin development and homeostasis. Towards deciphering inflammation induced by proteotoxic-stress.
Aanvraagnummer: AVD202216092
Betreft: Nieuwe aanvraag
Categorieën: Fundamenteel onderzoek

1 Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's

Proces	<p>Het Secretariaat heeft nog geen vragen gesteld, maar stelt voor om de volgende vragen te stellen, indien de commissie zich hierin kan vinden:</p> <ul style="list-style-type: none">- Uit het projectvoorstel blijkt onvoldoende wat het atp6ap2fl/fl model geschikt maakt voor voor het onderzoeken van proteotoxische stress in algemene zin, aangezien dieren met deze specifieke afwijking niet levensvatbaar lijken te zijn. Ook is onvoldoende toegelicht wat de translationele waarde is van het model ten aanzien van atopische dermatitis in mensen en hoe de voorgestelde proeven hier inzicht in kunnen verschaffen. Deze informatie is van belang voor het maken van een schade-baten analyse van het project. Wij verzoeken u deze punten verder toe te lichten.- De algehele onderzoeksstrategie in uw projectaanvraag is onvoldoende inzichtelijk. Het is niet duidelijk hoe restoratieve (genetische of farmacologische) behandelingen zullen worden geselecteerd en uitgevoerd. Ook is onvoldoende helder beschreven wat er tijdens de pilotexperimenten in bijlage 3.4.3.1 zal worden onderzocht en welke uitkomstparameters zullen worden gebruikt om het restoratieve effect van behandelingen vast te stellen in bijlage 3.4.3.2 en wat in deze bijlage de go/no-go criteria zijn voor verdere experimenten. Wij verzoeken u om de strategie op deze punten verder toe te lichten.- In beide bijlagen is niet helder op welke manier de potentiële effectiviteit van de, nog te selecteren, behandelingen zal worden onderzocht. Kunt u toelichten welke manier geborgd wordt dat bij de selectie en inzet van deze behandelingen voldaan zal worden aan de vereisten omtrent vervanging, vermindering en verfijning?
---------------	---

- In bijlage 3.4.3.1 stelt u dat (nog onbekende) behandelingen bijwerkingen kunnen veroorzaken. U hebt echter kaders gesteld voor het mogelijke ongerief van deze bijwerkingen. Ook zijn in deze bijlagen geen humane eindpunten geformuleerd die het ongerief van eventuele bijwerkingen kunnen inperken. Kunt u de bijlage op deze punten aanvullen?

- In bijlage 3.4.3.2 zal een deel van de dieren (huid)inflammatie ontwikkelen. Het is echter niet duidelijk welke mogelijkheden tot pijnstilling voor deze dieren zijn overwogen en waarom pijnstilling niet wordt toegepast. Kunt u uw overwegingen omtrent pijnstilling toelichten?

- Ten aanzien van de embryo's in bijlage 3.4.3.1 stelt u dat deze licht ongerief zullen ondergaan. Een aanzienlijk deel van deze embryo's zal echter in een vergevorderd stadium van de dracht komen te overlijden aan de gevolgen van hun genetische modificatie. In bijlage VIII van richtlijn 2010/63/EU geeft de volgende voorbeelden van ernstig ongerief:

- Toxiciteitstests met de dood als eindpunt, dan wel met naar verwachting sterfgevallen en de opwekking van ernstige pathopsychologische toestanden.

- Modellen voor de inductie van tumoren, of met spontane tumoren, waarbij naar verwachting een dodelijke voortschrijdende ziekte optreedt, gepaard met een langdurige matige vorm van pijn, angst of lijden.

- Het fokken van dieren met genetische afwijkingen die naar verwachting de algemene toestand van het dier ernstig en permanent zullen hinderen. Op basis van de raakvlakken van het atp6ap2 model met de bovengenoemde voorbeelden is in onze ogen ernstig ongerief niet uit te sluiten. Voor ongeboorte dieren is moeilijk vast te stellen in welke mate de dieren daadwerkelijk pijn kunnen ervaren. Daarom zou in onze ogen het zorgvuldigheidsprincipe hier op zijn plaats zijn. Kunt u onderbouwen waarom u van oordeel bent dat deze dieren slechts licht ongerief zullen ervaren ondergaan of het ongerief voor deze dieren aanpassen naar een niveau dat in lijn is met de voorbeelden in de richtlijn?

- Wij verzoeken u om na te gaan of de beantwoording van bovenstaande vragen ook leidt tot aanpassingen in de NTS.

Vragen NTS:

- De titel van de NTS bevat termen die voor de gemiddelde Nederlander lastig navolgbaar zijn. Kunt u de titel herschrijven op een manier die beter navolgbaar is voor het algemeen publiek?

- In de NTS hebt u 'Instandhouding kolonies' als doelstelling aangevinkt,

	<p>terwijl dit niet het geval is in de projectaanvraag zelf. Kunt u deze doelcategorie uit de NTS verwijderen?</p> <p>- Onder verfijning schrijft u dat de dieren worden 'geëthanaseerd'. De CCD vindt dat het woord 'doden' een beter beeld geeft bij wat er met de dieren gebeurt. Kunt u euthanaseren aanpassen in doden?</p> <p>- Kunt u de NTS in het officiële Excel format aanleveren? Dit format is te downloaden op de website van de CCD.</p>			
Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
<p>3.4.3.1 Collection of skin from embryos at stages E13.5, E14.5, E15.5 and E18.5 (K5-Cre driven deletion). For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin</p>				

	Muizen (<i>Mus musculus</i>)	Primiparous > 8-week-old, atp6ap2 Flox/Flox of atp6ap2 Flox/Flox in combination with gain or loss of function in candidate gene; E13.5/E14.5/E15.5/E18.5, Epidermal-specific deletion of atp6ap2 and control littermates in combination with gain or loss of function in candidate gene	7.490	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn
--	--------------------------------	---	-------	---------------------------------------

3.4.3.2 Collection of skin from control and mutant mice at different time points of skin defect development (5-8 days, 15 days, 30 days post tamoxifen injection) (K14-Cre ESR1 driven deletion). For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin

	Muizen (<i>Mus musculus</i>)	Epidermal-specific deletion of <i>atp6ap2</i> sometimes in combination with gain or loss of function in candidate gene, and control littermates	974	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn
--	--------------------------------	---	-----	---------------------------------------

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

3.4.3.1 Collection of skin from embryos at stages E13.5, E14.5, E15.5 and E18.5 (K5-Cre driven deletion). For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin

Muizen (*Mus musculus*) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt. Citaat. Pregnant females required; gender of embryos defined retrospectively.

3.4.3.2 Collection of skin from control and mutant mice at different time points of skin defect development (5-8 days, 15 days, 30 days post tamoxifen injection) (K14-Cre ESR1 driven deletion). For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin

Muizen (*Mus musculus*) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt. Citaat. Knock-out males as first steps, heterozygous females if go moment

Locatie uitvoering experimenten	- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
--	--

2 DEC advies

DEC-advies	Citaat C18. Voor de experimenten in bijlage 1 zullen zowel mannelijke als vrouwelijke dieren worden gebruikt. Voor bijlage 2 zullen de meeste experimenten eerst worden uitgevoerd met alleen controle- en knock-out mannelijke muizen. Afhankelijk van de bevindingen en hoe relevant het opnemen van vrouwelijke muizen is, zal er een Go no-Go moment zijn om te beslissen of vrouwtjes moeten worden opgenomen in aanvullende experimenten. Dit is naar inziens van de DEC voldoende wetenschappelijk onderbouwd
-------------------	---

Ethische afweging van de DEC:

Citaat.

1. Rechtvaardigt het onderzoek dat gericht is op het ontrafelen van de moleculaire en cellulaire mechanismen van intracellulaire proteotoxische stress alsook de mechanismen van het induceren van een immunologische door proteotoxische stress de inzet van 6420 muizen, waarvan 6420 embryo's (>13.5) die allemaal mild ongerief zullen ondervinden en 2044 volwassen muizen waarvan 98,5% mild ongerief zullen ondervinden en 1,5% cumulatief matig ongerief?

2. De belangrijkste belanghebbenden in dit project dat gericht is op het ontrafelen van de moleculaire en cellulaire mechanismen van intracellulaire proteotoxische stress alsook de mechanismen van het induceren van een immunologische door proteotoxische stress zijn de proefdieren de betrokken onderzoekers, de patiënten en de samenleving. Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: een nadeel. De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de genetische modificatie en de muizen zullen licht (98,5% van de dieren) tot matig (1,5%) ongerief ondervinden.

Waarden die voor de onderzoekers bevorderd worden: mogelijk voordeel. Er zijn al veelbelovende resultaten behaald in voorgaande onderzoeken en de voorgestelde studies kunnen leiden tot enerzijds meer kennis over fundamentele pathogenetische aspecten van AD maar ook omtrent de validatie van het PRR deletie muizenmodel als onderzoeksmodel voor AD. Hierdoor zullen de wetenschappers nieuwe kennis verkrijgen wat kan uitmonden in publicaties waardoor hun carrièremogelijkheden kunnen verbeteren.

Waarden die de patiënten bevorderd kunnen worden: mogelijk voordeel door de beschikbaarheid van nieuwe kennis omtrent de pathogenese van AD kan er nieuw perspectief ontstaan op nieuwe behandelingsstrategieën waardoor de individuele ziektelast zal afnemen en de kwaliteit van leven toenemen.

Waarden die voor de samenleving bevorderd kunnen worden: een mogelijk voordeel: effectievere behandeling van AD patiënten zal resulteren in daling van de zorgkosten en verzuimkosten.

De DEC leden zijn van mening dat het projectvoorstel en de antwoorden op de gestelde vragen nog onvoldoende duidelijkheid hebben opgeleverd over met name de berekeningen van het aantal dieren, de toepassing van compounds en de overeenkomst tussen het muismodel met PRR deletie en AD bij de mens. Om die reden is de aanvrager gevraagd om een mondelinge toelichting te geven tijdens de DEC vergadering. De toelichting en de daarop volgende discussie heeft ertoe geleid dat DEC leden wel hun individuele ethische afweging konden maken. De DEC leden zijn niet unaniem maar wel in meerderheid van mening dat de

belangen van de AD patiënten, de samenleving en de onderzoekers groter dan die van de proefdieren.

3. Het belang van PRR receptoren voor een normale ontwikkeling van de huid en voor het behoud van huidhomeostase is in voorgaande studies vastgesteld. De pathologische huidveranderingen die optreden bij afwezigheid van PRR vertonen, histologisch en immunologisch, overeenkomst met de veranderingen in de huid bij Atopische dermatitis (AD) patiënten. Door het vergaren van fundamentele kennis over de cascade van pathofysiologische processen die optreden in de huid van het PRR deletie muismodel hoopt men meer kennis te verkrijgen over de pathogenese van AD. Nieuwe kennis over de pathogenese van AD biedt wellicht mogelijkheden om nieuwe behandelingsstrategieën te ontdekken. Volgens huidartsen is AD niet alleen een veel voorkomende maar ook een ondermijnende huidaandoening waar nog onvoldoende behandelingen voor beschikbaar zijn, m.a.w. er is behoefte aan verdieping van kennis over de pathogenese en aan aanknopingspunten voor mogelijk nieuwe behandelingen. Dit rechtvaardigt volgens de meerderheid van de DEC leden vervolgonderzoek in PRR deletie muismodellen. Deze DEC leden zijn overtuigd van het maatschappelijk – en wetenschappelijk belang van het beschreven onderzoek. De ethische afweging door DEC leden levert geen consensus op, de meeste DEC leden zijn van mening dat de belangen van de patiënten, de samenleving en de onderzoekers zwaarder wegen dan de belangen van de proefdieren; deze DEC leden geven een positief advies.

Deze DEC leden zijn overtuigd van het belang van de doelstellingen van dit project. Naar inziens van deze DEC leden beschrijft de aanvraag belangrijk onderzoek, dat zowel maatschappelijk als ook wetenschappelijk zeer relevant is. Deze DEC leden zijn van mening dat:

- de waarden die voor de patiënten, de samenleving en de onderzoekers bevorderd kunnen worden zwaarder wegen dan de waarden die voor de proefdieren in het geding zijn.
- de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstelling en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.
- dat de onderzoeksgroep voldoende kennis en ervaring heeft om met de gekozen onderzoeksstrategie en met de voorgestelde dierproeven de doelstelling te behalen en dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om het ongerief van de dieren te beperken.
- de doelstelling niet zonder het gebruik van proefdieren behaald kan worden en acht het gebruik van proefdieren en het daarmee samenhangende ongerief bij de dieren ethisch gerechtvaardigd.

De DEC heeft extern advies ingewonnen bij

- de aanvrager is om aanvullingen gevraagd
Citaat A8 (horen van de aanvrager).

De DEC heeft bij de aanvrager aanvullende informatie ingewonnen met betrekking tot de keuze voor het model, het ongerief van de embryo's, de humane eindpunten voor de dieren met een huidfenotype en de 3 replicaten.

Citaat A9 (Correspondentie met de aanvrager).

De DEC heeft bij de aanvrager aanvullende informatie ingewonnen met betrekking tot de focus van het onderzoek, het type compounds dat gebruikt wordt, de go/no-go momenten, de selectiecriteria voor de te gebruiken compounds, de berekening van het aantal benodigde nestjes/dieren, de toedieningsroute en frequentie, het ongerief van de embryo's, het ongerief als gevolg van de toediening van compounds en de humane eindpunten. Daarnaast heeft de DEC verzocht de NTS aan te passen.

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus.

Citaat E2.

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt in de DEC.

Eén van de DEC leden komt tot een negatief advies: "Hieronder geef ik mijn inschatting van het wetenschappelijke en maatschappelijke belang van het voorgestelde onderzoek en formuleer ik de twee belangrijkste bezwaren die ik tegen het onderzoek heb, en die mijn negatieve advies motiveren.

Het belang van het onderzoek schat ik als gemiddeld in. Het wetenschappelijk belang is dat dit onderzoek kan bijdragen aan meer begrip van de mechanismen achter huidaandoeningen, in het bijzonder atopische dermatitis (AD) maar ook psoriasis en wellicht huidaandoeningen meer in het algemeen. Dit wetenschappelijke belang zie ik echter niet los van het maatschappelijke belang van dit onderzoek. De verwachte wetenschappelijke opbrengst van dit onderzoek heeft in mijn optiek waarde voor zover het (in combinatie met andere studies in dit domein) uiteindelijk bijdraagt aan de ontwikkeling van meer effectieve

therapieën voor huidaandoeningen – ik zie geen grote waarde in de wetenschappelijke opbrengst in zichzelf, los van een eventuele vertaling naar therapieën. Het ontwikkelen van meer effectieve therapieën voor huidaandoeningen dient zeker een relevant maatschappelijk belang. Volgens een systematische review en meta-analyse (Birdi et al. 2020) heeft AD een significante invloed op de kwaliteit van leven (QoL) van patiënten, met name door symptomen als jeuk, ontsteking en slapeloosheid; deze symptomen zijn meer van invloed dan de impact op het uiterlijk. Volgens hetzelfde onderzoek is er ook een significante negatieve relatie tussen de ernst van de aandoening en QoL, maar lopen de scores in verschillende onderzoeken nogal uiteen – hoe zwaar ernstigere vormen van AD precies op de QoL drukken en in welke mate bestaande therapieën effectief zijn wordt (mij) dan ook niet helemaal duidelijk. Desondanks accepteer ik dat het ontwikkelen van therapieën een relevant maatschappelijk belang dient, vooral ook gezien door de hoge prevalentie van huidaandoeningen zoals atopische dermatitis. Dit belang is denk ik niet zo groot als voor aandoeningen met een eveneens hoge prevalentie en een ernstiger ziekteverloop, maar toch substantieel. Ik heb echter bezwaar tegen, ten eerste, het model waarvan dit onderzoek gebruik wil maken. Zoals ik het begrijp is het plan genetisch aangepaste muizen te ontwikkelen die al als embryo een aandoening ontwikkelen die qua symptomen op AD lijkt. In de eerste fase van het onderzoek zou worden gekeken hoe de aandoening zich in verschillende fasen in de embryo's manifesteert (met uiteenlopende uitleesparameters) en in de tweede fase of er stoffen toegediend kunnen worden die de ontwikkeling van de aandoening kunnen stoppen of remmen. Zoals ook in onze DEC vergaderingen over deze aanvraag besproken, is dit wetenschappelijk gezien een ingewikkeld model: de aandoening ontwikkelt zich op een heel andere manier in de muizen, waar de aandoening door specifieke genetisch aanpassingen geïnduceerd wordt, dan bij mensen, waar niet zo een duidelijke genetische oorzaak voor AD te vinden is. In de latere stadia zouden de mechanismen tussen mens en muismodel op elkaar moeten lijken, maar wetenschappelijk gezien is het model in elk geval niet straightforward. Bovendien roept het model in mijn optiek ethische bezwaren op. Naar verwachting zullen 10% van de embryo's van 13,5 dag oud, 30% van de embryo's van 15,5 dag oud, en 90% van de embryo's van 18,5 dag oud door de aandoening komen te overlijden. Op de overleden embryo's kunnen als ik het goed begrijp niet altijd wetenschappelijke experimenten uitgevoerd worden: zeker als het jongere embryo's betreft zijn ze vaak niet meer terug te vinden. Daarom moeten er méér embryo's 'gegeneerd' worden voor de wetenschappelijke doelstelling van het onderzoek en is de relatieve hoeveelheid (niet-)overleden embryo's een belangrijke uitkomstmaat om de effectiviteit van therapeutische stoffen te bepalen. Dit zie ik als een zeer

	<p>onsubtiele en onwenselijke aanpak om de bedoelde huidaandoeningen te onderzoeken, die bij mensen immers hele andere en minder dodelijke uitkomsten hebben. Bovendien is – volgens het antwoord van de onderzoeker zelf op mijn vraag hierover – niet duidelijk in welke mate de embryo's ongerief van hun fenotype en overlijden ondervinden. De onderzoeker stelt dat dit moeilijk te bepalen is en verder dat de meeste embryo's al relatief jong overlijden (rond 15,5 dag oud). Een muizenembryo ontwikkelt zich echter in ongeveer 21 dagen, en muizen van 15,5 dag zijn dus naar mijn idee relatief ver ontwikkeld; daarnaast overlijdt 30% van de embryo's tussen de 15,5e en 18,5e dag. Daarom kan mijns inziens niet worden aangenomen dat de embryo's geen ongerief zullen ervaren. Dat de mate waarin embryo's zullen lijden zo onduidelijk is, zie ik als belangrijk probleem van deze onderzoeksopzet. Wellicht is er wetenschappelijk gezien op dit moment geen beter model – daar kan ik niet over oordelen – maar dat betekent niet dat de nadelen van dit model dus geaccepteerd moeten worden.</p> <p>Een tweede bezwaar tegen dit onderzoek is dat de berekeningen van de aantallen benodigde dieren en de go/no-go momenten onduidelijk zijn gebleven. Hoewel de DEC algemeen de indruk had dat de onderzoekers goed over de onderzoeksopzet hadden nagedacht en op basis daarvan aannam dat de berekeningen en go/no-go momenten ook wel in orde (zij het onduidelijk) zouden zijn, vind ik dat onvoldoende. Eén van de taken van de DEC is om te controleren of aan de 3 V's voldaan is, maar wat mij betreft heeft de DEC niet kunnen vaststellen dat er inderdaad geen mogelijkheden tot vermindering zijn. Dit bezwaar weegt voor mij minder zwaar dan het vorige maar telt wel mee in mijn negatieve advies."</p>
--	--

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies	
<p>Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen, maar de beantwoording van beoordelingsvragen sluit in onze ogen niet op alle punten aan bij de inhoud van de projectaanvraag. Ten aanzien van de projectaanvraag in de huidige staat (28-10-2022) kunnen wij ons meer vinden in het minderheidsstandpunt.</p> <p>De aanvraag schiet in onze ogen inhoudelijk nog te kort op de volgende punten:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Uit het projectvoorstel blijkt onvoldoende wat het atp6ap2fl/fl model geschikt maakt voor voor het onderzoeken van proteotoxische stress in algemene zin. Dieren met deze specifieke afwijking lijken immers niet levensvatbaar te zijn. Ook is onvoldoende toegelicht wat de translationele waarde is van het model ten aanzien van atopische dermatitis in mensen en hoe de voorgestelde proeven hier inzicht in kunnen verschaffen. Deze informatie is van belang voor het maken van een schade/baten analyse van het project. 	

- De algehele onderzoeksstrategie in de projectaanvraag is onvoldoende inzichtelijk. Het is niet duidelijk hoe restoratieve (genetische of farmacologische) behandelingen zullen worden geselecteerd en uitgevoerd. Ook is onvoldoende helder beschreven wat er tijdens de pilotexperimenten in bijlage 3.4.3.1 zal worden onderzocht en welke uitkomstparameters zullen worden gebruikt om het restoratieve effect van behandelingen vast te stellen in bijlage 3.4.3.2. en wat in deze bijlage de go/no-go criteria zijn voor verdere experimenten.

- In beide bijlagen is niet helder beschreven op welke manier de potentiële effectiviteit van de, nog te selecteren, behandelingen zal worden onderzocht. Zodoende is niet navolgbaar of bij de selectie en inzet van deze behandelingen voldaan zal worden aan de vereisten omtrent vervanging, vermindering en verfijning. Ook worden in bijlage 1.4.3.1. gewezen op mogelijk bijwerkingen van behandelingen, maar worden deze niet ingekaderd door middel van een ongeriefklasse of humane eindpunten. Tot slot zullen dieren in bijlage 3.4.3.2 (huid)inflammatie ontwikkelen. Het is echter niet duidelijk welke mogelijkheden tot pijnstilling voor deze dieren zijn overwogen en waarom pijnstilling niet wordt toegepast.

- Voor het embryomodel in bijlage 3.4.3.1 is het onzeker of het ongerief beperkt zal blijven tot licht. Een aanzienlijk deel van deze embryo's zal in een vergevorderd stadium van de dracht komen te overlijden aan de gevolgen van hun genetische modificatie. In bijlage VIII van richtlijn 2010/63/EU worden de volgende voorbeelden gegeven voor ernstig ongerief:

- Toxiciteitstests met de dood als eindpunt, dan wel met naar verwachting sterfgevallen en de opwekking van ernstige pathopsychologische toestanden.

- Modellen voor de inductie van tumoren, of met spontane tumoren, waarbij naar verwachting een dodelijke voortschrijdende ziekte optreedt, gepaard met een langdurige matige vorm van pijn, angst of lijden.

- Het fokken van dieren met genetische afwijkingen die naar verwachting de algemene toestand van het dier ernstig en permanent zullen hinderen.

Op basis van de raakvlakken van het atp6ap2 model met de bovengenoemde voorbeelden is in onze ogen ernstig ongerief voor deze dieren niet uit te sluiten. Voor ongeboren dieren is moeilijk vast te stellen in welke mate de dieren daadwerkelijk pijn kunnen ervaren. In onze ogen zou het zorgvuldigheidsprincipe hier echter op zijn plaats zijn.

4 Inhoudelijke beoordeling

Belangen- verstrengeling	5.1 lid2e
-------------------------------------	-----------

<p>Doelstelling Doelstelling</p>	<p>Citaat.</p> <p>In this context, the project's immediate goal is to decipher the molecular and cellular mechanisms leading to proteotoxic stress associated disorders. We have developed unique mouse models that represent early and late stages of the immune reaction due to intracellular stress and they will be used to:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Goal 1: define the molecular and cellular mechanisms leading to the proteotoxic stress and the early immune response associated (mouse model 1, PRR deletion during embryogenesis, see 3.4.1). Single cell (Sc) RNAseq analysis of the skin of the PRR mutant and control mice will be compared at different stages of disease development and dysregulated pathways will be confirmed at the protein level (Goal 1.1). When possible, functional restoration approaches will be used to validate major findings by an independent approach (Goal 1.2). - Goal 2: define how this continuous proteotoxic stress leads to chronic inflammation and what are the mediators of the immune response (mouse model 2, post-natal deletion of PRR, see 3.4.1). Sc RNAseq analysis will be performed upon cell isolation at early and later time points and dysregulated pathways will be confirmed at the protein level (Goal 1.1). When possible, functional restoration approaches will be used to validate the findings by an independent approach and to evaluate potential compounds that can reduce inflammation. We will define if this mouse model is relevant to study atopic dermatitis, a human skin disorder associated with TH2 type of immune response (Goal 2.2). <p>The ultimate goal of this project is to get knowledge on the chronic inflammation in response to intracellular stress and on how relevant it is for the pathogenesis of atopic dermatitis, which is a prerequisite for clinical management. We hope to validate our mouse model as a preclinical model of human atopic dermatitis. In addition, this project should give insight on how different immune cells are recruited to the skin during embryonic development, which show quite discrepancies in literature.</p>
---	---

Wetenschappelijk en maatschappelijk belang	<p>Citaat.</p> <p>The scientific relevance of the project is to provide:</p> <p>(1) knowledge on PRR function during skin morphogenesis: first demonstration that PRR controls the epidermal progenitor fate, and that the epidermis controls dermal lymphatic remodelling during development. This communication between epidermis and dermal lymphatic vessels represents a novel area of research, that seems to be associated to an immune reaction as early as at E15.5.</p> <p>(2) knowledge on PRR function in post-natal skin: in particular, on skin inflammation, which is a feature of most of skin conditions. These models will allow deciphering how chronic inflammation is induced and maintained in response to intracellular stress. We hope to develop a good model of atopic dermatitis that integrates the different aspects of the pathology (crosstalk of epidermis and dermis involving immune cells).</p> <p>The social relevance of these findings is to assess the contribution of proteotoxic stress to various skin disorders associated with chronic inflammation. Disorders such as atopic dermatitis, psoriasis, although associated with TH2 and TH1 type of immune response respectively, are both associated with chronic inflammation, which is due to multiple factors of unknown origin. We believe that proteotoxic stress contributes to this inflammation and we hope to characterize the early stages of the response in mice to find markers to access these questions within samples of human origin. If our hypothesis is true, the development of inhibitors of such stress (to be applied topically) could be beneficial for patients with such chronic disorders.</p>
Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang	Het belang is voldoende uitgewerkt.

<p>Wetenschappelijke kwaliteit Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek</p>	<p>Citaat DEC advies C7. Naar overtuiging van de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen (budget en capaciteit) om de projectdoelstelling met de gekozen strategie binnen de gevraagde termijn te kunnen realiseren. Dit projectvoorstel voor proefdieronderzoek is gebaseerd op eerder behaalde onderzoeksresultaten. 5.1 lid2h</p> <p>[Redacted]</p> <p>Daarnaast heeft de vakgroep unieke muismodellen ontwikkeld waarmee de functie van epidermale PRR tijdens de embryonale ontwikkeling en in het behoud van postnatale huidhomeostase kan worden bestudeerd.</p> <p>Het Secretariaat heeft geen reden te twifelen aan de kwaliteit van de aanvragers en het onderzoek.</p>
---	---

3V's

Vervanging	<p>3.4.3.1 Collection of skin from embryos at stages E13.5, E14.5, E15.5 and E18.5 (K5-Cre driven deletion). For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin: Citaat.</p> <p>The molecular mechanisms downstream of PRR deletion can be deciphered only in vivo as they involve interactions between cell types of epidermis and dermis. The 3D skin models currently available show reduced barrier properties and do not reflect the complexity of the skin. They show stratified epidermis, but composition of the dermis is reduced to fibroblasts and does not show vessels or immune cells. Discovering early markers of proteotoxic stress in mice will allow accessing if this process is generally found in human disorders. We have a collaboration with the Dermatology department of our institute and have access to human skin cryosections.</p>
	<p>3.4.3.2 Collection of skin from control and mutant mice at different time points of skin defect development (5-8 days, 15 days, 30 days post tamoxifen injection) (K14-Cre ESR1 driven deletion). For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin: Citaat.</p> <p>Phenotypic analysis of PRR deletion involves complex interaction between cell types of epidermis and dermis and the molecular relays are not well established so far and therefore can be determined only in vivo. We have a collaboration with the department of Dermatology of our institution to translate our mouse data to human conditions by using skin cryosections of human skin.</p>

Verminderen	
	<p>3.4.3.1 Collection of skin from embryos at stages E13.5, E14.5, E15.5 and E18.5 (K5-Cre driven deletion). For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin: Citaat.</p> <p>The minimum number of mice required to get statistically significant results has been anticipated based on our previous experiments and statistical analyses. To reduce the number of mice, back skin including that of the head of the embryos will be used.</p>
	<p>3.4.3.2 Collection of skin from control and mutant mice at different time points of skin defect development (5-8 days, 15 days, 30 days post tamoxifen injection) (K14-Cre ESR1 driven deletion). For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin: Citaat.</p> <p>The minimum number of mice required to get significant result has been anticipated based on our previous experiment and statistical analyses. To reduce the number of mice used, only male littermates will be used as a first step.</p> <p>Skin samples will be collected and used for the different analyses.</p>
Verfijnen	
	<p>3.4.3.1 Collection of skin from embryos at stages E13.5, E14.5, E15.5 and E18.5 (K5-Cre driven deletion). For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin: Citaat.</p> <p>The procedure used is dedicated to the collection of biological material. Experiments will be performed by staff that are highly skilled and experienced with animal handling. As a result, all procedures with the animals will be performed with the greatest care and minimal animal distress will be ensured.</p>
	<p>3.4.3.2 Collection of skin from control and mutant mice at different time points of skin defect development (5-8 days, 15 days, 30 days post tamoxifen injection) (K14-Cre ESR1 driven deletion). For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin: Citaat.</p> <p>Endpoints have been defined to allow humane sacrificed of animals. Experiments will be performed by staff that are highly skilled and experienced with animal handling. As a result, all procedures with the animals will be performed with the greatest care and minimal animal distress will be ensured.</p>

Hergebruik	Er is geen sprake van hergebruik van dieren.
-------------------	--

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.3.1 Collection of skin from embryos at stages E13.5, E14.5, E15.5 and E18.5 (K5-Cre driven deletion). For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.3.2 Collection of skin from control and mutant mice at different time points of skin defect development (5-8 days, 15 days, 30 days post tamoxifen injection) (K14-Cre ESR1 driven deletion). For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin	Ja	volgens de richtlijn.

Naam proef		
-------------------	--	--

<p>3.4.3.1 Collection of skin from embryos at stages E13.5, E14.5, E15.5 and E18.5 (K5-Cre driven deletion). For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin</p>	<p>HEP: Worden niet verwacht</p>	
<p>Muizen (Mus musculus)</p>	<p>Ongerief: 100,0% Licht</p>	<p>Een aanzienlijk deel van de embryo's zal door de genetische modificatie in atp6ap2 komen te overlijden voor E18,5. 5.2 lid1 zou het model voor proteotoxische stress in embryo's op basis van richtlijn 2010/63/EU en het zorgvuldigheidsprincipe als ernstig ongerief moeten worden ingeschaald.</p>
<p>3.4.3.2 Collection of skin from control and mutant mice at different time points of skin defect development (5-8 days, 15 days, 30 days post tamoxifen injection) (K14-Cre ESR1 driven deletion). For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin</p>	<p>HEP: 1%</p>	<p>Citaat. Mice will be observed in a daily basis starting at Day 15 post-tamoxifen injection and will be humanely sacrificed in case the following define end points are reached: visible pain (abnormal posture and/or movement), significant weight loss (> 10 %), abnormal behavior (isolation) as well as if 50% of their body surface exhibits erythema or if they constantly scratch or if they have a wound greater than 0.5 cm in length.</p>

Muizen (Mus musculus)	Ongerief: 13,1% Matig 86,9% Licht	
-----------------------	---	--

5 Samenvatting

Het project is een voortzetting van AVD [5.1 lid2h](#), hierin heeft men een atp6ap2fl/fl muismodel opgezet waarbij geen The (pro)renin receptor (PRR) op de opperhuid wordt aangemaakt. Zie pagina 2 van het projectvoorstel voor de opbrengsten van dit project. In navolging van dit project wil men in de huidige aanvraag proteotoxische stress (pathologie door beschadigde of verkeerd gevouwen eiwitten) nauwkeuriger karakteriseren, de cellulaire en moleculaire mechanismen ontrafelen die leiden tot proteotoxische stress en de moleculaire cascade ontrafelen die volgt op de proteotoxische stress en de TH2 type immuunrespons induceert. De TH2 immuunrespons resulteert in chronische huidontsteking die histologisch en immunologisch veel overeenkomsten vertoont met atopische dermatitis bij de mens. Dat maakt dat de onderzoekers dit (PRR deletie) muismodel willen inzetten voor pathogenese onderzoek van atopische dermatitis.

Waar mogelijk willen de onderzoekers manipulaties (genetisch/compounds) toepassen, als verificatie en validatie van de onderliggende moleculaire mechanismen, die de cascade van pathologische veranderingen kunnen blokkeren, voorkomen of zelfs kunnen terugdraaien, m.a.w. regeneratie van pathofysiologische veranderingen.

5.2 lid1

De DEC geeft een positief advies met een op basis van een meerderheidsstandpunt. Eén lid geeft een negatief advies op basis van twijfels over de translationele waarde van het model voor humane atopische dermatitis en omdat het atp6ap2fl/fl model met embryosterfte als uitkomstparameter ethisch zeer onwenselijk zou zijn is gezien het grote aantal benodigde embryo's, waarvan slecht een beperkt aantal geanalyseerd wordt en de onduidelijke mate van ongerief dat deze embryo's, waarvan een deel ver ontwikkeld zal zijn, zullen ondergaan. Tot slot vindt dit DEC lid dat de benodigde aantallen go/no-go momenten onvoldoende de helder zijn. Het

5.2 lid1

[5.2 lid1](#) is onvoldoende toegelicht waarom het atp6ap2fl/fl een geschikt model is voor het onderzoeken van proteotoxische stress in algemene zin. [5.2 lid1](#) onvoldoende

toegelicht wat de mogelijke translationele waarde is van het model voor atopische dermatitis in mensen.

De strategie is onvoldoende inzichtelijk. Het is niet duidelijk hoe restoratieve (genetische of farmacologische) behandelingen zullen worden geselecteerd en uitgevoerd, wat er in pilotexperimenten (bijlage 1) zal worden onderzocht en welke uitkomstparameters zullen worden gebruikt om het restoratieve effect van een behandeling vast te stellen (bijlage 2) en wanneer dit tot een go/no-go zal leiden.

Het is niet te beoordelen is of de aanvraag voldoet aan de vereisten omtrent de 3V's. Er wordt in bijlage 1 gesproken over mogelijke bijwerkingen van behandelingen, maar er zijn geen humane eindpunten geformuleerd ten aanzien van deze mogelijke bijwerkingen. In bijlage 2 zullen dieren huidinflammatie ontwikkelen, maar wordt niet ingegaan op de mogelijkheid om analgesie toe te passen. In beide bijlagen zullen nog onbepaalde behandelingen worden geselecteerd, maar wordt niet beschreven hoe de potentiële effectiviteit zal worden getoetst voorafgaand aan de in vivo experimenten.

Het ongerief voor de embryo's in bijlage 1 is een belangrijke factor in de ethische afweging. 5.2 lid1 is het ongerief voor deze dieren te licht ingeschat. Een aanzienlijk deel van de embryo's zal door de genetische modificatie in atp6ap2 komen te overlijden tussen E15,5 (30%) en E18,5 (90%). 5.2 lid1 niet vast te stellen of deze dieren licht ongerief zullen ondergaan, het zorgvuldigheidsprincipe zou daarom moeten worden toegepast. In bijlage VIII van richtlijn 2010/63/EU geeft de volgende voorbeelden van ernstig ongerief:

- Toxiciteitstests met de dood als eindpunt, dan wel met naar verwachting sterfgevallen en de opwekking van ernstige pathopsychologische toestanden.
- Modellen voor de inductie van tumoren, of met spontane tumoren, waarbij naar verwachting een dodelijke voortschrijdende ziekte optreedt, gepaard met een langdurige matige vorm van pijn, angst of lijden.
- Het fokken van dieren met genetische afwijkingen die naar verwachting de algemene toestand van het dier ernstig en permanent zullen hinderen.

Op basis van de raakvlakken van deze voorbeelden met het model voor proteotoxische stress, moet het ongerief van de embryo's die in bijlage 3.4.3.1 komen te overlijden waarschijnlijk ingedeeld worden in de categorie ernstig. Het ongerief bij ongeboren dieren is moeilijk objectief vast te stellen, maar 5.2 lid1 dat het zorgvuldigheidsprincipe leidend moet zijn. Embryo's in het derde deel van de zwangerschap worden door de Wod als proefdier geclassificeerd en er bestaan bij weten 5.2 lid1 geen aparte ongeriefkaders voor ongeboren dieren. 5.2 lid1

zorgvuldigheidsprincipe uitgegaan moeten worden van ernstig ongerief voor deze embryo's. 5.2 lid1

6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning

5.2 lid1

5.2 lid1

De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.

Van: info@zbo-ccd.nl
Verzonden: vrijdag 25 november 2022 16:58
Aan: 5.1 lid2e
CC: 5.1 lid2e 5.1 lid2h
Onderwerp: Aanhouden AVD 5.1 lid2h 202216092

Geachte 5.1 lid2e ,

Op 01-06-2022 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Role of the (Pro) renin receptor (PRR) in skin development and homeostasis. Towards deciphering inflammation induced by proteotoxic-stress." met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 02216092. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

Wij hebben de volgende informatie van u nodig om uw aanvraag verder te kunnen beoordelen:

Niet technische samenvatting

- De titel van de NTS bevat termen die voor de gemiddelde Nederlander lastig navolgbaar zijn. Kunt u de titel herschrijven op een manier die beter navolgbaar is voor het algemeen publiek?
- In de NTS hebt u 'Instandhouding kolonies' als doelstelling aangevinkt, terwijl dit niet het geval is in de projectaanvraag zelf. Kunt u deze doelcategorie uit de NTS verwijderen?
- Onder verfijning schrijft u dat de dieren worden 'geëuthanaseerd'. De CCD vindt dat het woord 'doden' een beter beeld geeft bij wat er met de dieren gebeurt. Kunt u euthanaseren aanpassen in doden?
- Kunt u de NTS in het officiële Excel format aanleveren? Dit format is te downloaden op de website van de CCD.

Onduidelijkheden

- Uit het projectvoorstel blijkt onvoldoende wat het atp6ap2fl/fl model geschikt maakt voor voor het onderzoeken van proteotoxische stress in algemene zin, aangezien dieren met deze specifieke afwijking niet levensvatbaar lijken te zijn. Ook is onvoldoende toegelicht wat de translationele waarde is van het model ten aanzien van atopische dermatitis in mensen en hoe de voorgestelde proeven hier inzicht in kunnen verschaffen. Deze informatie is van belang voor het maken van een schade-baten analyse en een morele afweging over uw project. Wij verzoeken u daarom deze punten zorgvuldig toe te lichten.
- Kunt u toelichten Of ook bij de mens een relatie is aangetoond tussen PRR en huidproblemen en welke gelijkenissen de geïnitieerde immuunrespons in muizen vertoont met humane atopische dermatitis?
- Muizen ontwikkelen niet spontaan atopie dermatitis. Ook is de muizenhuid op een aantal punten anders samengesteld dan die van de mens. Wat betekent dit voor de transleerbaarheid van de uiteindelijke resultaten naar de mens?
- De algehele onderzoeksstrategie in uw projectaanvraag is onvoldoende inzichtelijk om tot een oordeel te komen. Het is niet duidelijk hoe restoratieve (genetische of farmacologische) behandelingen zullen worden geselecteerd en uitgevoerd. Ook is onvoldoende helder beschreven wat er tijdens de pilotexperimenten in bijlage 3.4.3.1 zal worden onderzocht en welke uitkomstparameters zullen worden gebruikt om het restoratieve effect van behandelingen vast te stellen in bijlage 3.4.3.2 en wat in deze bijlage de go/no-go criteria zijn voor verdere experimenten. Wij verzoeken u om de strategie op deze punten verder toe te lichten.

- Aangezien PRR ook betrokken is bij de werking van andere organen, o.a. via Wnt pathways, hoe kunnen effecten op bijvoorbeeld TH2 immuunresponse in uw studie toegewezen worden aan de mutatie in huidcellen?
 - Het is bekend dat Tamoxifen ook (bij-)effecten op de huid heeft. Op welke manier zullen deze effecten in uw studie worden uitgesloten of gedissecteed?
 - In beide bijlagen is niet helder op welke manier de potentiële effectiviteit van de, nog te selecteren, behandelingen zal worden onderzocht. Kunt u toelichten welke manier geborgd wordt dat bij de selectie en inzet van deze behandelingen voldaan zal worden aan de vereisten omtrent vervanging, vermindering en verfijning?
 - In het 5.1 lid2h worden 3D-huidmodellen en huid-op-een-chip toegepast voor onderzoek naar, onder andere, atopisch eczeem. Ook zijn verschillende in-vitro modellen beschreven voor het bestuderen van de pathogenese van atopische dermatitis en de beoordeling van nieuwe behandelingen. Kunt u toelichten of u het gebruik van deze modellen hebt overwogen als alternatief voor (delen van) dierstudies en waarom deze modellen al dan niet geschikt voor uw studie?
 - In bijlage 3.4.3.1 stelt u dat (nog onbekende) behandelingen bijwerkingen kunnen veroorzaken. U hebt echter kaders gesteld voor het mogelijke ongerief van deze bijwerkingen. Ook zijn in deze bijlagen geen humane eindpunten geformuleerd die het ongerief van eventuele bijwerkingen kunnen inperken. Kunt u de bijlage op deze punten aanvullen?
 - In bijlage 3.4.3.2 zal een deel van de dieren (huid)inflammatie ontwikkelen. Het is echter niet duidelijk welke mogelijkheden tot pijnstilling voor deze dieren zijn overwogen en waarom pijnstilling niet wordt toegepast. Kunt u uw overwegingen omtrent pijnstilling toelichten?
 - Ten aanzien van de embryo's in bijlage 3.4.3.1 stelt u dat deze licht ongerief zullen ondergaan. Een aanzienlijk deel van deze embryo's zal echter in een vergevorderd stadium van de dracht komen te overlijden aan de gevolgen van hun genetische modificatie. In bijlage VIII van richtlijn 2010/63/EU geeft de volgende voorbeelden van ernstig ongerief: - Toxiciteitstests met de dood als eindpunt, dan wel met naar verwachting sterfgevallen en de opwekking van ernstige pathopsychologische toestanden.
 - Modellen voor de inductie van tumoren, of met spontane tumoren, waarbij naar verwachting een dodelijke voortschrijdende ziekte optreedt, gepaard met een langdurige matige vorm van pijn, angst of lijden.
 - Het fokken van dieren met genetische afwijkingen die naar verwachting de algemene toestand van het dier ernstig en permanent zullen hinderen.
- Voor ongeboren dieren is moeilijk vast te stellen in welke mate de dieren daadwerkelijk pijn kunnen ervaren. Daarom zou in onze ogen het zorgvuldigheidsprincipe hier op zijn plaats zijn. Op basis van de raakvlakken van het atp6ap2 model met de bovengenoemde voorbeelden is ernstig ongerief in onze ogen niet uitgesloten. Kunt u onderbouwen waarom u van oordeel bent dat deze dieren slechts licht ongerief zullen ervaren ondergaan of het ongerief voor deze dieren aanpassen naar een niveau dat in lijn is met de voorbeelden in de richtlijn?
- Wij verzoeken u om na te gaan of de beantwoording van bovenstaande vragen ook leidt tot aanpassingen in de NTS.

Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

Opsturen binnen veertien dagen

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

Wanneer een beslissing

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

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

5.1 lid2e

www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag
.....

T: 0800 789 0789

E: info@zbo-ccd.nl

Dear Committee members,

Please, find below the answers to your questions (in blue) as well as the corrected NTS in the official excel format.

I hope they will convince you on the interest of our basic research project which, in my opinion, should unravel a potential important factor involved in the pathogenesis of atopic dermatitis (AD), namely proteotoxic stress.

AD is a highly prevalent, non-communicable, chronic skin disease with no cure, but it can be controlled with treatments for periods of time before recurs. It is a complex disease which is not associated with a single genetic mutation but rather results from a combination of different factors (genetic background, environmental factors, etc). Therefore, developing an *in vitro* or *in vivo* model that recapitulates all aspects of the disease is complex. We do not claim that our mouse models fully reflect all aspect of AD pathogenesis in human. Instead, they represent a tool for a proof of concept that proteotoxic stress contributes to AD pathogenesis. In human, among the different factors involved in the pathogenesis of AD, the contribution of proteotoxic stress will most likely be more subtle compared to our mouse models. Nevertheless, such findings may open novel therapeutic option by targeting proteostasis pathways instead of the immune response and tackling different aspects of the disease when it recurs.

We also have added documentation and references on how the pain system develops in mice. Pain transmission and modulation develop after birth strongly suggesting that discomfort of embryos in our experimental settings is mild.

Finally, we would like to bring to your attention the fact that we have developed *in vitro* model by generating a keratinocyte cell line carrying our mutation. This model has two strong limitations: i) it does not contain the immune component and ii) the mutant keratinocytes have a very limited lifespan, most probably due to cell toxicity, which is not observed *in vivo*, in a more dynamic system, where the balance between proliferation and differentiation is changed by the immune response.

Do not hesitate if you have additional questions.

Kind Regards,

5.1 lid2e

5.1 lid2h

Geachte 5.1 lid2e,

Op 01-06-2022 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Role of the (Pro) renin receptor (PRR) in skin development and homeostasis. Towards deciphering inflammation induced by proteotoxic-stress." met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202216092. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

We received your application for an animal testing project permit on 01-06-2022. It concerns your project "Role of the (Pro)renin receptor (PRR) in skin development and homeostasis. Towards deciphering inflammation induced by proteotoxic-stress." with application number AVD 5.1 lid2h 202216092. There are still some ambiguities in your application for us. In this message you can read what we still need and when you can expect a decision.

Welke informatie nog nodig

Wij hebben de volgende informatie van u nodig om uw aanvraag verder te kunnen beoordelen:

What information is still needed

We need the following information from you in order to further assess your application:

Niet technische samenvatting

- De titel van de NTS bevat termen die voor de gemiddelde Nederlander lastig navolgbaar zijn. Kunt u de titel herschrijven op een manier die beter navolgbaar is voor het algemeen publiek?

Non technical summary

- The title of the NTS contains terms that are difficult for the average Dutch person to follow. Can you rewrite the title in a way that is more relatable to the general public?

We have corrected the NTS according to your recommendations.

- In de NTS hebt u 'Instandhouding kolonies' als doelstelling aangevinkt, terwijl dit niet het geval is in de projectaanvraag zelf. Kunt u deze doelcategorie uit de NTS verwijderen?

- In the NTS you have checked 'Maintaining colonies' as an objective, while this is not the case in the project application itself. Can you remove this target category from the NTS?

We have corrected the NTS according to your recommendations.

- Onder verfijning schrijft u dat de dieren worden 'geëuthanaseerd'. De CCD vindt dat het woord 'doden' een beter beeld geeft bij wat er met de dieren gebeurt. Kunt u euthanaseren aanpassen in doden?

- Under refinement you write that the animals are 'euthanased'. The CCD believes that the word 'kill' gives a better picture of what happens to the animals. Can you adapt euthanasia to kill?

We have corrected the NTS according to your recommendations.

- Kunt u de NTS in het officiële Excel format aanleveren? Dit format is te downloaden op de website van de CCD.

- Can you provide the NTS in the official Excel format? This format can be downloaded from the CCD website.

We provide the NTS in the official excel format.

Onduidelijkheden

- Uit het projectvoorstel blijkt onvoldoende wat het atp6ap2fl/fl model geschikt maakt voor voor het onderzoeken van proteotoxische stress in algemene zin, aangezien dieren met deze specifieke afwijking niet levensvatbaar lijken te zijn. Ook is onvoldoende toegelicht wat de translationele waarde is van het model ten aanzien van atopische dermatitis in mensen en hoe de voorgestelde proeven hier inzicht in kunnen verschaffen. Deze informatie is van belang voor het maken van een schade-baten analyse en een morele afweging over uw project. Wij verzoeken u daarom deze punten zorgvuldig toe te lichten.

Uncertainties

- The project proposal does not sufficiently show what makes the atp6ap2fl/fl model suitable for investigating proteotoxic stress in a general sense, since animals with this specific abnormality do not appear to be viable. It is also insufficiently explained what the translational value of the model is with regard to atopic dermatitis in humans and how the proposed tests can provide insight into this. This information is important for making a harm-benefit analysis and a moral assessment of your project. We therefore ask you to carefully explain these points.

AD is a highly prevalent chronic skin disease with no cure, but it can be controlled with treatments for periods of time before recurs. It is a complex disease which is not associated with a single genetic mutation but rather results from a combination of different factors (genetic background, environmental factors, etc). Therefore, developing an *in vitro* or *in vivo* model that recapitulates all aspects of the disease is complex. We do not claim that our mouse models fully reflect all aspect of AD pathogenesis in human. Instead, we think they represent a tool for proof of concept that proteotoxic stress contributes to the pathogenesis of AD, therefore we have classified our project as a 'basic research' project.

Gene set enrichment analysis of the bulk RNAseq experiment we performed indicates that the skin of mutant embryos at E15.5 (just before death) is statistically highly enriched in ER/proteotoxic stress associated genes as well as in genes of the immune/inflammatory response (Th2 type), compared to control skin. These results are striking considering that i) the immune system is not fully developed at E15.5 and that ii) our adult model shows chronic inflammation. Mechanistically, our **working model** is as follows: lack of *Atp6ap2* in the epidermis results in impaired protein degradation/autophagy pathways and ER/proteotoxic stress. To cope with this constant stress, epidermal cells secrete alarmins which recruit and activate immune cells, which in a long-term lead to chronic inflammation that resemble atopic dermatitis (**AD**) at the histopathological and immunological levels. This working model still needs to be validated.

Single Cell RNAseq analysis will help decipher the pathogenesis of the disease at the different stages (from embryo to early recruitment of immune cells in early adult stage and chronic inflammation in later stages). This approach will provide information on the specific defects of the keratinocytes as well as on the chronology of the recruitment of the different populations of immune cells. Further validation of our working model will come from functional restoration of the phenotypes with compounds/genetic alterations that interfere with the ER/proteotoxic stress as well as with the immune response, i.e. antibodies against IL-4, which are successfully used to treat AD patients.

In human, among the various factors involved in the pathogenesis of AD, the contribution of proteotoxic stress will most likely be more subtle compared to our mouse models. Forcing this aspect in mouse models makes it possible to identify molecular players strongly affected in response to stress and gives the opportunity to access them in biopsies of human skin (healthy and AD donors), which represent a limited source of material. Such findings may open a new therapeutic option by targeting proteostasis pathways instead of the immune response and tackling different aspects of the disease when it recurs.

- Kunt u toelichten Of ook bij de mens een relatie is aangetoond tussen PRR en huidproblemen en welke gelijkenissen de geïnitieerde immuunrespons in muizen vertoont met humane atopische dermatitis?

Can you explain whether a relationship has also been demonstrated in humans between PRR and skin problems and what similarities the initiated immune response in mice shows with human atopic dermatitis?

One should realize that in human, most mutations are germline mutations and affect all tissues of the body at the same time. Therefore, in human, loss-of-function mutations in *atp6ap2*, which codes for the (Pro)renin receptor (PRR), are embryonic lethal and most likely lead to early miscarriage. Therefore, the potential function of *Atp6ap2* in the skin cannot be studied in this context. However, a missense mutation in *atp6ap2* has been described in human to cause autophagic defects associated with defects in the skin connective tissue (Rujano et al., JEM, 2017).

In terms of immune response, our model shows type 2 immunity, which involves Th2 and Tc2 cells, eosinophil, basophils and mast cells that produce type 2 cytokines i.e., IL-4 and IL-5. We also observe a strong expression of IL-33 and IgE reactivity. These features are reminiscent of those observed in human with lesional AD.

- Muizen ontwikkelen niet spontaan atopic dermatitis. Ook is de muizenhuid op een aantal punten anders samengesteld dan die van de mens. Wat betekent dit voor de transleerbaarheid van de uiteindelijke resultaten naar de mens?

- Mice do not spontaneously develop atopic dermatitis. The mouse skin is also composed differently from that of humans in a number of respects. What does this mean for the translatability of the final results to humans?

Mouse skin mainly differs from human skin in that it is thinner, hairier, does not contain rete ridges, and has slight differences in the composition/location of certain immune cell populations. Nevertheless, the whole picture shows strong similarities. We do not claim that our mouse models directly reflect all aspects of what happens in human. They are used as a tool to access the contribution of proteotoxic stress to AD pathogenesis, which will most probably show a more subtle contribution in human compared to our model. Immunolabelling of human skin biopsies isolated from AD and healthy donors, which represent a limited source of material, will be used to confirm the results observed in our mouse study. These findings may open a new treatment option

by targeting proteostasis instead of the immune response, providing independent therapeutical strategies when the disease recurs.

- De algehele onderzoeksstrategie in uw projectaanvraag is onvoldoende inzichtelijk om tot een oordeel te komen. Het is niet duidelijk hoe restoratieve (genetische of farmacologische) behandelingen zullen worden geselecteerd en uitgevoerd. Ook is onvoldoende helder beschreven wat er tijdens de pilotexperimenten in bijlage 3.4.3.1 zal worden onderzocht en welke uitkomstparameters zullen worden gebruikt om het restoratieve effect van behandelingen vast te stellen in bijlage 3.4.3.2 en wat in deze bijlage de go/no-go criteria zijn voor verdere experimenten. Wij verzoeken u om de strategie op deze punten verder toe te lichten.

- The overall research strategy in your project application is insufficiently clear to reach a judgment. It is not clear how restorative (genetic or pharmacological) treatments will be selected and implemented. It is also not sufficiently described in appendix 3.4.3.1 what will be investigated during the pilot experiments and what outcome parameters will be used to determine the restorative effect of treatments in appendix 3.4.3.2 and what the go/no-go criteria are in this appendix. are for further experiments. We request you to further explain the strategy on these points.

Genetic or pharmacological treatments will have two main objectives, e.g., prove that:

- ER/proteotoxic stress is involved in pathogenesis of the chronic inflammation (by using compounds/gene alteration that interfere with the ER/proteotoxic stress)

- developed chronic inflammation shares aspects observed in patients with AD (by using compounds that show efficacy in AD patients, i.e., IL-4 blocking antibodies).

Regarding the restorative treatments:

-For the embryo model, restoration of viability will be evaluated at E18.5. A minimum of 50% of difference between groups (i.e. from 10% viability of mutant embryos without treatment to ~60% viability with treatment) will be considered efficient (a go-moment) for further analysis. Pilot experiment will be used to define the regiment (2 frequencies and/or 2 doses will be performed/compound). Each condition tested in the pilot requires 5 litters to access the effect unequivocally: from < 1 mutant embryo alive/5 litters without treatment to ~ 4.5 mutant embryo alive/ 5 litters with treatment). If no restoration is observed at the different conditions tested in the pilot experiment, it will be a no-Go moment. If a minimum of 50% of difference between groups is observed (go-moment), 3 litters will be used/stage to access the kinetics of restoration (cell populations identity i.e, immune cells recruited compared to control) by Single cell RNAseq. Finally, optimal stage (most probably E18.5 but may differ based on the kinetics) will be studied in deep, and validations of molecular mechanisms associated will be performed (compare RNA and protein levels by Q-RT-PCR and immunoblotting/immunolabelling, in the treated and non-treated conditions).

-For the adult model, the restoration of the macroscopic phenotype at \sim day 15 (scaly plaques in the less hairy regions of the body, i.e., ears, paw and tail start to be visible at day 15 in mutant) will be evaluated in a pilot experiment by comparing the phenotype of treated and non-treated (vehicle-treated) knock-out males. Absence of scaly plaques development when compared to vehicle-treated mice will be a go-moment. Initial dose used will be the highest dose in the range described by the literature. If there is no beneficial effect, frequency of administration may be changed with a daily administration of the substance. A maximum of two doses and frequencies will be tested/compound (4 conditions). If no restoration is observed in the pilot experiment, that will be a no-Go moment. If restoration is observed in the pilot, long-term restoration will be evaluated at day 30. Single Cell RNAseq approach will be used to show restoration at the cellular and molecular levels (loss of inflammatory cells, reduced ER/proteotoxic stress in keratinocytes). Validations of molecular mechanisms associated will be performed by comparing RNA and protein levels of gene candidates found differentially regulated by Q-RT-PCR and immunoblotting/immunolabelling, in the treated and non-treated conditions).

- Aangezien PRR ook betrokken is bij de werking van andere organen, o.a. via Wnt pathways, hoe kunnen effecten op bijvoorbeeld TH2 immuunresponse in uw studie toegewezen worden aan de mutatie in huidcellen ?

- Since PRR is also involved in the functioning of other organs, e.g. via Wnt pathways, how can effects on e.g. TH2 immune response be assigned to the mutation in skin cells in your study?

The beauty of our models lies in having the ability to delete a specific gene (*atp6ap2*, here), in a specific organ (the epidermis of the skin, here) and to access the subsequent specific effects (conditional deletion of *atp6ap2* in the epidermis of the skin). The rest of the animal's body is, genetically normal. Our model illustrates how genetic alteration of skin epidermis cells has distant effects, here by recruiting immune cells and initiating an immune response. The only genetically modified cells in our model are those of the epidermis, which are therefore at the origin of the defects that we have observed.

- Het is bekend dat Tamoxifen ook (bij-)effecten op de huid heeft. Op welke manier zullen deze effecten in uw studie worden uitgesloten of gedissecteerd?

- It is known that Tamoxifen also has (side) effects on the skin. How will these effects be excluded or dissected in your study?

To rule out potential effects of tamoxifen on animal skin, each group of mice is injected with the same dose of tamoxifen.

The strategy consists in comparing mice carrying *atp6ap2* conditional allele(s) in the presence or absence of the transgene allowing the epidermis-specific expression of the Cre recombinase:

- mice *atp6ap2*^{Flox/+ or Y}; K5 or K14ERT-Cre/+, where tamoxifen injection leads to epidermis-specific expression of the Cre-recombinase and therefore to the deletion of the floxed *atp6ap2* allele (mutant mice).

- mice *atp6ap2*^{Flox/+ or Y}; +/+, where tamoxifen injection does not lead to expression of the Cre-recombinase and therefore the floxed *atp6ap2* allele is not deleted (control mice).

The injection of tamoxifen is performed in both control and mutant groups, thus making it possible to rule out any potential effect of tamoxifen in our study.

- In beide bijlagen is niet helder op welke manier de potentiële effectiviteit van de, nog te selecteren, behandelingen zal worden onderzocht. Kunt u toelichten welke manier geborgd wordt dat bij de selectie en inzet van deze behandelingen voldaan zal worden aan de vereisten omtrent vervanging, vermindering en verfijning?

- In both appendices it is not clear how the potential effectiveness of the treatments that have yet to be selected will be investigated. Can you explain how it is ensured that the requirements regarding replacement, reduction and refinement will be met in the selection and use of these treatments?

Genetic or pharmacological treatments will have two main objectives, i.e., prove that:

- ER/proteotoxic stress is involved in pathogenesis of the chronic inflammation (by using compounds that interfere with the ER/proteotoxic stress)

- developed chronic inflammation shares aspects observed in patients with AD (by using compounds that show efficacy in AD patients, i.e., IL-4 blocking antibodies).

These mechanisms involve different cell types and in particular immune cells. Such complexity cannot be recapitulated by *in vitro* models, which therefore cannot be used as a replacement.

In terms of refinement, compounds that should have the broadest effect will be selected for the first restoration attempt. When possible, compounds that have showed efficacy in human will be used.

In terms of reduction, one effective restoration will be performed per targeted signaling pathway, just as a proof of principle that the presumed mechanism is the one occurring.

- In het [5.1 lid2h](#) worden 3D-huidmodellen en huid-op-een-chip toegepast voor onderzoek naar, onder andere, atopisch eczeem. Ook zijn verschillende in-vitro modellen beschreven voor het bestuderen van de pathogenese van atopische dermatitis en de beoordeling van nieuwe behandelingen. Kunt u toelichten of u het gebruik van deze modellen hebt overwogen als alternatief voor (delen van) dierstudies en waarom deze modellen al dan niet geschikt voor uw studie?

- At the [5.1 lid2h](#), 3D skin models and skin-on-a-chip are used for research into, among other things, atopic eczema. Several in vitro models have also been described for studying the pathogenesis of atopic dermatitis and assessing new treatments. Can you explain whether you have considered using these models as an alternative to (parts of) animal studies and why these models are or are not suitable for your study?

I believe I am one of the specialists in *in vitro* 3D skin models at [5.1 lid2h](#) as illustrated by a recent publication (Ramovs et al., Stem Cell Reports, 2022). A major limitation of *in vitro* skin models is the absence of the immune

component, which is currently too complex to model. It represents a real issue for the study of the pathogenesis of chronic inflammatory diseases.

We generated, from our mice, a cell line of keratinocytes carrying the *atp6ap2* mutation. By delivering Cre-recombinase, we can delete *atp6ap2* in these cells and compare them to isogenic control cells. We have previously found that mutant keratinocytes show accumulation of intracellular vesicle and limited lifespan, with is not what we observe *in vivo*, in a more dynamic system, where the balance between proliferation and differentiation is changed by the immune response. Therefore, this model is too simple to mimic the cellular complexity observed *in vivo*.

- In bijlage 3.4.3.1 stelt u dat (nog onbekende) behandelingen bijwerkingen kunnen veroorzaken. U hebt echter kaders gesteld voor het mogelijke ongerief van deze bijwerkingen. Ook zijn in deze bijlagen geen humane eindpunten geformuleerd die het ongerief van eventuele bijwerkingen kunnen inperken. Kunt u de bijlage op deze punten aanvullen?

- In appendix 3.4.3.1 you state that (as yet unknown) treatments can cause side effects. However, you have set limits for the potential discomfort of these side effects. These appendices also do not formulate humane endpoints that can limit the discomfort of possible side effects. Can you supplement the appendix on these points?

Assessing embryo discomfort as well as implementing humane endpoint for embryos is not possible. However, it seems that the pain system fully develops after birth (Keeler et al., Nat. Science, 2022 ; <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198515616.003.0009>). An additional phenotype of mutant embryos (reduced size...) may be observed (at the end of the experiment) or alternatively, control mice may begin to show a phenotype if adverse effects are induced by the compound. If such adverse effects are observed with the highest dose of the compound described in literature, one lower dose (the lowest described by the literature) will be tested since compounds often have biphasic effects. The mothers will be carefully monitored upon treatment.

- In bijlage 3.4.3.2 zal een deel van de dieren (huid)inflammatie ontwikkelen. Het is echter niet duidelijk welke mogelijkheden tot pijnstilling voor deze dieren zijn overwogen en waarom pijnstilling niet wordt toegepast. Kunt u uw overwegingen omtrent pijnstilling toelichten?

- In appendix 3.4.3.2, some of the animals will develop (skin) inflammation. However, it is not clear what options for pain relief have been considered for these animals and why pain relief is not used. Can you explain your considerations regarding pain relief?

Adult patients with AD report skin pain, but the relationship with disease severity, anatomical location and use of pain medication is unclear. Overall, the use of pain medication was not increased in patients with AD (<https://doi.org/10.1111/bjd.18557>). Pain signaling mechanisms are highly conserved across mammalian species. Based on human data, considering that administration of analgesic drugs to rodents is associated with stress due to handling/administration, which should be frequent due to the short half-life of drugs ([10.30802/AALAS-CM-19-000048](https://doi.org/10.30802/AALAS-CM-19-000048)) and that analgesic may have adverse effect and interfere with the experiment/treatment, the benefit-risk ratio is not in favor of pain medication administration. Instead, the duration of the experiment has been shortened to the minimal time that allows to unambiguously conclude on treatment efficacy. Human endpoints have been defined. Mice will be observed every other day and will be humanely sacrificed in case the following define end points are reached: visible pain (abnormal posture and/or movement), significant weight loss (>10%), abnormal behaviour (isolation).

- Ten aanzien van de embryo's in bijlage 3.4.3.1 stelt u dat deze licht ongerief zullen ondergaan. Een aanzienlijk deel van deze embryo's zal echter in een vergevorderd stadium van de dracht komen te overlijden aan de gevolgen van hun genetische modificatie. In bijlage VIII van richtlijn 2010/63/EU geeft de volgende voorbeelden van ernstig ongerief: - Toxiciteitstests met de dood als eindpunt, dan wel met naar verwachting sterfgevallen en de opwekking van ernstige pathopsychologische toestanden.

- Het fokken van dieren met genetische afwijkingen die naar verwachting de algemene toestand van het dier ernstig en permanent zullen hinderen. Voor ongeboren dieren is moeilijk vast te stellen in welke mate de dieren daadwerkelijk pijn kunnen ervaren. Daarom zou in onze ogen het zorgvuldigheidsprincipe hier op zijn plaats zijn. Op basis van de raakvlakken van het *atp6ap2* model met de bovengenoemde voorbeelden is ernstig ongerief in onze ogen niet uitgesloten. Kunt u onderbouwen

waarom u van oordeel bent dat deze dieren slechts licht ongerief zullen ervaren ondergaan of het ongerief voor deze dieren aanpassen naar een niveau dat in lijn is met de voorbeelden in de richtlijn?

- With regard to the embryos in appendix 3.4.3.1, you state that they will undergo minor discomfort. However, a significant proportion of these embryos will die at an advanced stage of pregnancy as a result of their genetic modification. Annex VIII of Directive 2010/63/EU gives the following examples of severe distress: - Toxicity tests with death as the end point, or with deaths expected and the induction of serious pathopsychological states.

- Breeding animals with genetic defects that are expected to seriously and permanently affect the general condition of the animal.

For unborn animals it is difficult to determine to what extent the animals can actually experience pain. Therefore, in our view, the principle of due care would be appropriate here. Based on the interfaces of the atp6ap2 model with the above examples, serious distress cannot be ruled out in our view. Can you substantiate why you believe that these animals will experience only mild distress or adjust the distress for these animals to a level that is in line with the examples in the guideline?

In this model, we have previously characterized that 90% of mutant embryo die at ~E15.5. It is due to the formation of veino lymphatic shunt followed by heart failure in the following minute. The 10% of embryos that survive do not show veino-lymphatic shunts and they die at the peri-natal stage due to skin barrier defect and dehydration. However, latest end point set in this project is E18.5. Although the outcome of our 'restoration experiments' is not certain, the aim is to block the formation of the veino-lymphatic shunts and to have mutant embryo surviving till E18.5. If non expected adverse effect happens due to the restoration approach, then the embryos will die even before the stage E15.5.

In terms of procedure, the pregnant female is sacrificed and embryos that are not dead *in utero* due to the mutation will experience:

- oxygen deprivation and die in the following minute, at stage E15.5. Their back skin is collected upon decapitation (in case they would still be alive).
- decapitation prior to skin collection, at stage E18.5.

In all conditions, I think that the time between the cause of the death (formation of veino-lymphatic shunts or oxygen deprivation) and the death is short (within a minute).

I understand that it is difficult to be certain that our knowledge is complete, however the full development of the pain system seems to be post-natal, when pain transmission and modulation is becoming organized (Keeler et al., Nat. Science, 2022 ; <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198515616.003.0009>).

Together these data indicate that the procedure employed should be classified as "Mild" in terms of procedure severity, as defined by Annex VIII of Directive 2010/63/EU: 'Procedures on animals as a result of which the animals are likely to experience short-term mild pain, suffering or distress, as well as procedures with no significant impairment of the well-being or general condition of the animals shall be classified as 'mild'.'

In my point of view, our embryos, if they experience pain, 'are likely to experience short-term mild pain, suffering or distress'.

- Wij verzoeken u om na te gaan of de beantwoording van bovenstaande vragen ook leidt tot aanpassingen in de NTS.

- We request that you check whether answering the above questions will also lead to changes in the NTS.

Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

Without this additional information, the decision may be unfavorable to you because the data is incomplete or unclear.

Opsturen binnen veertien dagen

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

Send within fourteen days

Please submit the missing information within fourteen days of the date of this notice. You can deliver this via NetFTP.

Wanneer een beslissing

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

When a decision

The processing of your request will be suspended until we have received the additional information. If you get approval on your application, you can then start the project.

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.
If you have any questions, you can of course contact us.

Met vriendelijke groet,
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

5.1 lid2e

www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag
.....

T: 0800 789 0789

E: info@zbo-ccd.nl

Naam van het project	De rol van de (pro)renine receptor (PRR) in de ontwikkeling en het evenwicht van de huid en de chronische ontstekingen die hier ontstaan.
NTS-identificatiecode	NTS-NL-463334 v.1
Nationale identificatiecode van de NTS <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Land	Nederland
Taal	nl
Indiening bij EU <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	ja
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	60
Trefwoorden	Huid Stress Immuunrespons Ontwikkeling Ontsteking
Doel(en) van het project	Fundamenteel onderzoek: Zintuigorganen (huid, ogen en oren)

DOELSTELLINGEN EN VERWACHTE VOORDELEN VAN HET PROJECT

<p>Beschrijf de doelstellingen van het project (bijvoorbeeld het aanpakken van bepaalde wetenschappelijke onduidelijkheden, of wetenschappelijke of klinische behoeften).</p>	<p>In dit project doen we onderzoek naar proteotoxische stress. Proteotoxische stress is een proces wat zich afspeelt in cellen. Door verschillende externe factoren kunnen de eiwitten in deze cellen van vorm gaan veranderen en samenklonteren. Doordat deze eiwitten een abnormaal uiterlijk hebben, kunnen ze ook hun functie niet correct uitvoeren. Dit kan zorgen voor verschillende problemen in de cel, waaronder chronische ontstekingen. In dit onderzoek ligt de focus op chronische ontstekingen in de huid, in het bijzonder op eczeem.</p> <p>Het doel van het project is dan ook het ontrafelen van de onderliggende mechanismen die de oorzaak zijn van proteotoxische stress-geassocieerde ziekten. Het is reeds onderzocht dat in eczeem aanhoudende proteotoxische stress kan leiden tot chronische ontstekingen, wat samenhangt met een constante aanwezigheid van immuuncellen.</p> <p>Om dit alles te onderzoeken hebben we speciale muismodellen ontwikkeld. Deze muizen missen een belangrijk molecuul op de buitenkant van hun cellen: de (pro)renine receptor (hierna PRR genoemd). Door de afwezigheid hiervan ontstaat er proteotoxische stress in hun cellen. Deze muizen kunnen hierdoor gebruikt worden om:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) De mechanismen te bestuderen die leiden tot proteotoxische stress en de immuunrespons die hiermee samenhangt. 2) Te onderzoeken hoe continue proteotoxische stress kan leiden tot chronische ontstekingen. <p>Uiteindelijk zullen we ook verschillende stoffen evalueren die kunnen voorkomen dat er chronische ontstekingen ontstaan. Op deze manier kunnen we het proces rond proteotoxische stress beter begrijpen, waardoor er op den duur ook nieuwe aangrijpingspunten voor therapieën tegen chronische huidziekten gevonden kunnen worden.</p>
<p>Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen,</p>	<p>Met dit project verwachten wij meer te weten te komen over de chronische ontsteking die voortkomen uit proteotoxische stress.</p> <p>Verder willen wij een goed model te ontwikkelen dat menselijk eczeem accuraat nabootst. Dit model</p>

dieren of het milieu uiteindelijk voordeel kunnen hebben bij het project. Maak, waar van toepassing, een onderscheid tussen voordelen op korte termijn (binnen de looptijd van het project) en voordelen op lange termijn (die mogelijk pas worden bereikt nadat het project is afgerond).

kan vervolgens gebruikt worden om medicijnen op te testen waardoor er uiteindelijk nieuwe behandelingen voor eczeem uitgedacht kunnen worden.

Omdat er nog niet veel bekend is over proteotoxische stress en de ontstekingen die hieruit voortkomen, kan er door dit model daarnaast ook een basis worden gelegd voor onderzoek naar andere proteotoxische stress-geassocieerde ziekten.

VOORSPELDE SCHADE

<p>In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.</p>	<p>In dit onderzoek gebruiken wij muizen die een genetische aanpassing hebben ondergaan (de verwijdering van de PRR op de buitenkant van hun cellen). Deze muizen zullen hierdoor chronische ontstekingen in de huid ontwikkelen. De dieren zullen de volgende handelingen ondergaan:</p> <p>(1) De huid van deze aangepaste (en onaangepaste) muizen zal verzameld worden. Dit wordt gedaan op verschillende tijdstippen vóór de geboorte van de muizen. Daarnaast zullen deze dieren (via de moeder) stoffen toegediend krijgen die de chronische ontstekingen kunnen voorkomen of behandelen.</p> <p>(2) De huid van aangepaste (en onaangepaste) muizen wordt ook verzameld na de geboorte. Dit wordt gedaan op verschillende tijdstippen van ontwikkeling van huiddefecten (5-8 dagen, 15 dagen, 90 dagen). Dieren zullen soms behandeld worden met stoffen die chronische ontstekingen kunnen voorkomen of behandelen.</p> <p>Handeling (1) en (2) zijn onafhankelijke procedures waarbij dieren van verschillende genetische achtergronden betrokken zijn.</p>																
<p>Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren, bijvoorbeeld pijn, gewichtsverlies, inactiviteit/verminderde mobiliteit, stress, abnormaal gedrag, en wat is de duur van die effecten?</p>	<p>We verwachten alleen negatieve gevolgen in de muizen waar het PRR-gen ontbreekt. Deze muizen kunnen na het verwijderen van het PRR-gen veranderingen van de huid vertonen. De verschijnselen die worden gezien zijn o.a. haaruitval en jeuk. Vanwege dit lijden worden de muizen zo kort mogelijk na het verschijnen van deze huidveranderingen onderzocht.</p> <p>In sommige experimenten worden vrouwelijke muizen bevrucht en vervolgens gedood om de embryo's in verschillende ontwikkelingsstadia te verkrijgen. In andere experimenten worden dieren behandeld met een stof doormiddel van injectie. Bij sommige muizen kunnen hierdoor ontstekingen in de huid ontstaan, wat kan zorgen voor pijn en jeuk bij de dieren. Alle dieren worden gedood na afloop van de experimenten.</p> <p>Het ongerief dat de dieren ondervinden kan als volgt worden ingedeeld: Licht ongerief: 96,6 % Matig ongerief: 3,4 %</p>																
<p>Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th rowspan="2">Totaal aantal</th> <th colspan="4">Geraamde aantallen naar ernstgraad</th> </tr> <tr> <th>Terminaal</th> <th>Licht</th> <th>Matig</th> <th>Ernstig</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Muizen (<i>Mus musculus</i>)</td> <td>4240</td> <td>0</td> <td>4096</td> <td>144</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Totaal aantal	Geraamde aantallen naar ernstgraad				Terminaal	Licht	Matig	Ernstig	Muizen (<i>Mus musculus</i>)	4240	0	4096	144	0
Soort:	Totaal aantal			Geraamde aantallen naar ernstgraad													
		Terminaal	Licht	Matig	Ernstig												
Muizen (<i>Mus musculus</i>)	4240	0	4096	144	0												
<p>Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th colspan="3">Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren</th> </tr> <tr> <th>Hergebruikt</th> <th>Teruggeplaatst</th> <th>Geadopteerd</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren			Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd									
Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren																
	Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd														
<p>Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.</p>	<p>De muizen zullen worden gedood om de huid te verzamelen en er verdere experimenten mee uit te voeren. Daarnaast worden bij het verkrijgen van de muizenembryo's ook de moeders gedood.</p>																

TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

<p>1. Vervanging Beschrijf welke diervrije alternatieven op dit gebied voorhanden zijn en waarom zij niet voor het project kunnen worden gebruikt.</p>	<p>Waar mogelijk gebruiken wij menselijke huid (die met toestemming verkregen is), voor experimenten in het laboratorium. Deze methode is echter niet uitgebreid genoeg. Het mechanisme wat in ons onderzoek bestudeerd wordt omvat namelijk veel verschillende celtypes (waaronder meerdere soorten huid- en immuuncellen) die in nauw contact staan en op elkaar reageren. Dit complexe systeem kan het beste onderzocht worden in een levend organisme. Een kweekbakje met cellen voldoet hierom niet. Daarnaast kan in een levend organisme onderzocht worden of de stoffen die toegediend worden, ook effect hebben op normale cellen.</p>
<p>2. Vermindering Leg uit hoe de aantallen dieren voor dit project zijn bepaald. Beschrijf de stappen die zijn genomen om het aantal te gebruiken dieren te verminderen en de beginselen die zijn gebruikt bij het opzetten van de studies. Beschrijf, waar van toepassing, de praktijken die gedurende het hele project zullen worden toegepast om het aantal dieren die in overeenstemming met de wetenschappelijke doelstellingen werden gebruikt, tot een minimum te beperken. Deze praktijken kunnen bijvoorbeeld bestaan uit proefprojecten, computermodellen, het delen van weefsel en hergebruik.</p>	<p>Voordat er onderzoek wordt gedaan op muizen, zal het effect van de afwezigheid van de PRR en de toegediende stoffen eerst worden onderzocht op cellen in een kweekschaal. Ter vermindering van het aantal proefdieren hebben we statistisch berekend hoeveel dieren er minimaal nodig zijn. Ten slotte wordt er zoveel mogelijk van de huid van elke muis gebruikt. Deze wordt vervolgens gebruikt voor verschillende soorten experimenten, zodat er niks verloren gaat</p>
<p>3. Verfijning Geef voorbeelden van de specifieke maatregelen (bv. verscherpte monitoring, postoperatieve behandeling, pijnbestrijding, training van dieren) die in verband met de procedures moeten worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken. Beschrijf de mechanismen om gedurende de looptijd van het project nieuwe verfijningstechnieken in gebruik te nemen.</p>	<p>Tijdens het onderzoek worden de muizen uitvoerig in de gaten gehouden. Zodra de muizen huidveranderingen vertonen worden ze zo snel mogelijk onderzocht. De muizen krijgen daarnaast huisvesting volgens vaste richtlijnen.</p> <p>Van tevoren wordt een humaan eindpunt bepaald. Om te voorkomen dat het dier te veel ongerief ondergaan zullen zij gedood worden wanneer dit eindpunt behaald wordt. Dit zal naar verwachting echter bijna nooit voorkomen.</p>
<p>Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe</p>	<p>De muis wordt gebruikt omdat deze makkelijk genetisch gemodificeerd kan worden. Daarnaast is het voor dit onderzoek essentieel om een dier met een huid te gebruiken. Hierdoor zijn minder complexe organismen zoals insecten of vissen niet geschikt voor dit onderzoek. Wij bouwen voort op de ruime kennis die wij hebben van muizen, de huid en het immuunsysteem en hebben hierdoor dit model kunnen ontwikkelen.</p>

VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT

Project geselecteerd voor BA?	nee
Termijn voor BA	
Reden voor de beoordeling achteraf	
Bevat ernstige procedures	
Maakt gebruik van niet-menselijke primaten	
Andere reden	
Toelichting van de andere reden voor de beoordeling achteraf	

AANVULLENDE VELDEN

Nationaal veld 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 4 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 5 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Startdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Einddatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Goedkeuringsdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Link naar de eerdere versie van de NTS buiten het EC-systeem	



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 93118
2509 AC Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

Datum 06 januari 2022

Betreft Aanvullende adviesnota AVD202216092

Project: Role of the (Pro)renin receptor (PRR) in skin development and homeostasis. Towards deciphering inflammation induced by proteotoxic-stress

heeft opmaaktoegepast: Nederlands(standaard)

Proces

In de CCD vergadering van 25 november 2022 is deze aanvraag besproken (zie map 'originele aanvraag'). Het Secretariaat heeft dit toen als dilemma ingebracht en had om deze reden nog geen vragen gesteld aan de aanvrager. Destijds miste echter nog essentiële informatie voor de inhoudelijke beoordeling van de aanvraag. Er is tijdens de vergadering besloten de aanvraag aan te houden. Het Secretariaat heeft na de vergadering de aanvrager hierover vragen gesteld en heeft een reactie van de aanvrager ontvangen.

Het Secretariaat had de aanvrager onderstaande vragen gesteld:

- 1) Uit het projectvoorstel blijkt onvoldoende wat het atp6ap2fl/fl model geschikt maakt voor ~~voor~~ het onderzoeken van proteotoxische stress in algemene zin, aangezien dieren met deze specifieke afwijking niet levensvatbaar lijken te zijn. Ook is onvoldoende toegelicht wat de translationele waarde is van het model ten aanzien van atopische dermatitis in mensen en hoe de voorgestelde proeven hier inzicht in kunnen verschaffen. Deze informatie is van belang voor het maken van een schade-baten analyse en een morele afweging over uw project. Wij verzoeken u daarom deze punten zorgvuldig toe te lichten.
- 2) Kunt u toelichten ~~of~~ ook bij de mens een relatie is aangetoond tussen PRR en huidproblemen en welke gelijkenissen de geïnitieerde immunrespons in muizen vertoont met humane atopische dermatitis?
- 3) Muizen ontwikkelen niet spontaan atopische dermatitis. Ook is de muizenhuid op een aantal punten anders samengesteld dan die van de mens. Wat betekent dit voor de translateerbaarheid van de uiteindelijke resultaten naar de mens?
- 4) De algehele onderzoeksstrategie in uw projectaanvraag is onvoldoende inzichtelijk om tot een oordeel te komen. Het is niet duidelijk hoe restoratieve (genetische of farmacologische) behandelingen zullen worden geselecteerd en uitgevoerd. Ook is onvoldoende helder beschreven wat er tijdens de pilotexperimenten in bijlage 3.4.3.1 zal worden onderzocht en welke uitkomstparameters zullen worden gebruikt om het restoratieve effect van behandelingen vast te stellen in bijlage 3.4.3.2 en wat in deze bijlage de go/no-go criteria zijn voor verdere experimenten. Wij verzoeken u om de strategie op deze punten verder toe te lichten.

Vertrouwelijk

- 5) Aangezien PRR ook betrokken is bij de werking van andere organen, o.a. via Wnt pathways, hoe kunnen effecten op bijvoorbeeld TH2 immuunresponse in uw studie Toegewezen-toegewezen worden aan de mutatie in huidcellen?
- 6) Het is bekend dat Tamoxifen ook (bij-)effecten op de huid heeft. Op welke manier zullen deze effecten in uw studie worden uitgesloten of gedissecteed?
- 7) In beide bijlagen is niet helder op welke manier de potentiële effectiviteit van de, nog te selecteren, behandelingen zal worden onderzocht. Kunt u toelichten welke manier geborgd wordt dat bij de selectie en inzet van deze behandelingen voldaan zal worden aan de vereisten omtrent vervanging, vermindering en verfijning?
- 8) In het 5.1 lid 2h worden 3D-huidmodellen en huid-op-een-chip toegepast voor onderzoek naar, onder andere, atopisch eczeem. Ook zijn verschillende in-vitro modellen beschreven voor het bestuderen van de pathogenese van atopische dermatitis en de beoordeling van nieuwe behandelingen. Kunt u toelichten of u het gebruik van deze modellen hebt overwogen als alternatief voor (delen van) dierstudies en waarom deze modellen al dan niet geschikt voor uw studie?
- 9) In bijlage 3.4.3.1 stelt u dat (nog onbekende) behandelingen bijwerkingen kunnen veroorzaken. U hebt echter kaders gesteld voor het mogelijke ongerief van deze bijwerkingen. Ook zijn in deze bijlagen geen humane eindpunten geformuleerd die het ongerief van eventuele bijwerkingen kunnen inperken. Kunt u de bijlage op deze punten aanvullen?
- 10) In bijlage 3.4.3.2 zal een deel van de dieren (huid)inflammatie ontwikkelen. Het is echter niet duidelijk welke mogelijkheden tot pijnstilling voor deze dieren zijn overwogen en waarom pijnstilling niet wordt toegepast. Kunt u uw overwegingen omtrent pijnstilling toelichten?
- 11) Ten aanzien van de embryo's in bijlage 3.4.3.1 stelt u dat deze licht ongerief zullen ondergaan. Een aanzienlijk deel van deze embryo's zal echter in een vergevorderd stadium van de dracht komen te overlijden aan de gevolgen van hun genetische modificatie. In bijlage VIII van richtlijn 2010/63/EU geeft de volgende voorbeelden van ernstig ongerief:
 - Toxiciteitstests met de dood als eindpunt, dan wel met naar verwachting sterfgevallen en de opwekking van ernstige pathopsychologische toestanden.
 - Modellen voor de inductie van tumoren, of met spontane tumoren, waarbij naar verwachting een dodelijke voortschrijdende ziekte optreedt, gepaard met een langdurige matige vorm van pijn, angst of lijden.
 - Het fokken van dieren met genetische afwijkingen die naar verwachting de algemene toestand van het dier ernstig en permanent zullen hinderen.
 Voor ongeboren dieren is moeilijk vast te stellen in welke mate de dieren daadwerkelijk pijn kunnen ervaren. Daarom zou in onze ogen het zorgvuldigheidsprincipe hier op zijn plaats zijn. Op basis van de raakvlakken van het atp6ap2 model met de bovengenoemde voorbeelden is ernstig ongerief in onze ogen niet uitgesloten. Kunt u onderbouwen waarom u van oordeel bent dat deze

dieren slechts licht ongerief zullen ervaren of het ongerief voor deze dieren aanpassen naar een niveau dat in lijn is met de voorbeelden in de richtlijn?

12) Verschillende vragen over de NTS.

Vanwege de aard van de ontbrekende informatie is besloten de aanvraag aan te houden en pas in de vergadering te behandelen nadat alle vragen zijn beantwoord.

Reactie aanvrager

Zie stukken AVD202216092a (NTS) en g (letter to CCD).

Voorstel Secretariaat

5.2 lid1 heeft de aanvrager de openstaande vragen naar tevredenheid beantwoord. Daarmee bevat het projectvoorstel nu 5.2 lid1 voldoende informatie over het belang van het onderzoek, de strategie, de 3V's, het ongerief en de humane eindpunten om tot een oordeel te kunnen komen. Het DEC-advies kan als grondslag dienen voor het besluit.

Gezien het fundamentele karakter van de projectaanvraag is 5.2 lid1 het valideren van het atp6ap2fl/fl model tot inzichten kan leiden die als aanknopingspunt kunnen dienen voor verder onderzoek naar onderliggende mechanismen van atopie dermatitis en uiteindelijk kunnen bijdragen aan nieuwe behandelmethoden.

De strategie (inclusief go/no-go parameters) aangaande de selectie van genetische of farmacologische behandelingen en de opzet/uitkomstparameters van de pilotstudies zijn helder geformuleerd in de reactie van de aanvrager. Ook de vragen omtrent potentiële co-fouders (i.e. huideffecten Tamoxifen en effecten PRR manipulatie op andere organen dan de huid) zijn nu voldoende geadresseerd in de beschreven strategie.

De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat alternatieven, zoals in vitro 3D skin modellen, niet geschikt zijn voor het beantwoorden van de onderzoeksvragen.

De aanvrager heeft aannemelijk gemaakt dat het toepassen van analgesie kan interfereren met de experimentele opzet en dat aan de vereisten omtrent verfijning zal worden voldaan ~~dmvd.m.v.~~ het tijdig implementeren van -humane eindpunten.

De aanvrager heeft een samenhangende onderbouwing gegeven door de inschatting van het ongerief voor embryo's die tijdens het derde deel van de zwangerschap komen te overlijden. Gezien ~~de snelle intrede~~ het snelle intreden / de snelle intreding van de dood (minuten) en het feit dat het pijn perceptie systeem van de muis zich pas volledig ontwikkelt na de geboorte 5.2 lid1

De NTS is aangepast en voldoet nu aan de gestelde eisen.

5.2 lid1

Vertrouwelijk



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 93118
2509 AC Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

Datum 06 januari 2022

Betreft Aanvullende adviesnota AVD202216092

Project: Role of the (Pro)renin receptor (PRR) in skin development and homeostasis. Towards deciphering inflammation induced by proteotoxic-stress

Proces

In de CCD vergadering van 25 november 2022 is deze aanvraag besproken (zie map 'originele aanvraag'). Het Secretariaat heeft dit toen als dilemma ingebracht en had om deze reden nog geen vragen gesteld aan de aanvrager. Destijds ontbrak nog essentiële informatie voor de inhoudelijke beoordeling van de aanvraag. Er is tijdens de vergadering besloten de aanvraag aan te houden. Het Secretariaat heeft de aanvrager na de vergadering vragen gesteld en heeft inmiddels een reactie van de aanvrager ontvangen.

Het Secretariaat had de aanvrager onderstaande vragen gesteld:

- 1) Uit het projectvoorstel blijkt onvoldoende wat het atp6ap2fl/fl model geschikt maakt voor het onderzoeken van proteotoxische stress in algemene zin, aangezien dieren met deze specifieke afwijking niet levensvatbaar lijken te zijn. Ook is onvoldoende toegelicht wat de translationele waarde is van het model ten aanzien van atopische dermatitis in mensen en hoe de voorgestelde proeven hier inzicht in kunnen verschaffen. Deze informatie is van belang voor het maken van een schade-baten analyse en een morele afweging over uw project. Wij verzoeken u daarom deze punten zorgvuldig toe te lichten.
- 2) Kunt u toelichten of ook bij de mens een relatie is aangetoond tussen PRR en huidproblemen en welke gelijkenissen de geïnitieerde immuunrespons in muizen vertoont met humane atopische dermatitis?
- 3) Muizen ontwikkelen niet spontaan atopic dermatitis. Ook is de muizenhuid op een aantal punten anders samengesteld dan die van de mens. Wat betekent dit voor de transleerbaarheid van de uiteindelijke resultaten naar de mens?
- 4) De algehele onderzoeksstrategie in uw projectaanvraag is onvoldoende inzichtelijk om tot een oordeel te komen. Het is niet duidelijk hoe restoratieve (genetische of farmacologische) behandelingen zullen worden geselecteerd en uitgevoerd. Ook is onvoldoende helder beschreven wat er tijdens de pilotexperimenten in bijlage 3.4.3.1 zal worden onderzocht en welke uitkomstparameters zullen worden gebruikt om het restoratieve effect van behandelingen vast te stellen in bijlage 3.4.3.2 en wat in deze bijlage de go/no-go criteria zijn voor verdere experimenten. Wij verzoeken u om de strategie op deze punten verder toe te lichten.

Vertrouwelijk

- 5) Aangezien PRR ook betrokken is bij de werking van andere organen, o.a. via Wnt pathways, hoe kunnen effecten op bijvoorbeeld TH2 immuunresponse in uw studie toegewezen worden aan de mutatie in huidcellen?
 - 6) Het is bekend dat Tamoxifen ook (bij-)effecten op de huid heeft. Op welke manier zullen deze effecten in uw studie worden uitgesloten of gedissecteed?
 - 7) In beide bijlagen is niet helder op welke manier de potentiële effectiviteit van de, nog te selecteren, behandelingen zal worden onderzocht. Kunt u toelichten welke manier geborgd wordt dat bij de selectie en inzet van deze behandelingen voldaan zal worden aan de vereisten omtrent vervanging, vermindering en verfijning?
 - 8) In het [5.1 lid2n](#) worden 3D-huidmodellen en huid-op-een-chip toegepast voor onderzoek naar, onder andere, atopisch eczeem. Ook zijn verschillende in-vitro modellen beschreven voor het bestuderen van de pathogenese van atopische dermatitis en de beoordeling van nieuwe behandelingen. Kunt u toelichten of u het gebruik van deze modellen hebt overwogen als alternatief voor (delen van) dierstudies en waarom deze modellen al dan niet geschikt voor uw studie?
 - 9) In bijlage 3.4.3.1 stelt u dat (nog onbekende) behandelingen bijwerkingen kunnen veroorzaken. U hebt echter kaders gesteld voor het mogelijke ongerief van deze bijwerkingen. Ook zijn in deze bijlagen geen humane eindpunten geformuleerd die het ongerief van eventuele bijwerkingen kunnen inperken. Kunt u de bijlage op deze punten aanvullen?
 - 10) In bijlage 3.4.3.2 zal een deel van de dieren (huid)inflammatie ontwikkelen. Het is echter niet duidelijk welke mogelijkheden tot pijnstilling voor deze dieren zijn overwogen en waarom pijnstilling niet wordt toegepast. Kunt u uw overwegingen omtrent pijnstilling toelichten?
 - 11) Ten aanzien van de embryo's in bijlage 3.4.3.1 stelt u dat deze licht ongerief zullen ondergaan. Een aanzienlijk deel van deze embryo's zal echter in een vergevorderd stadium van de dracht komen te overlijden aan de gevolgen van hun genetische modificatie. In bijlage VIII van richtlijn 2010/63/EU geeft de volgende voorbeelden van ernstig ongerief:
 - Toxiciteitstests met de dood als eindpunt, dan wel met naar verwachting sterfgevallen en de opwekking van ernstige pathopsychologische toestanden.
 - Modellen voor de inductie van tumoren, of met spontane tumoren, waarbij naar verwachting een dodelijke voortschrijdende ziekte optreedt, gepaard met een langdurige matige vorm van pijn, angst of lijden.
 - Het fokken van dieren met genetische afwijkingen die naar verwachting de algemene toestand van het dier ernstig en permanent zullen hinderen.
 Voor ongebooren dieren is moeilijk vast te stellen in welke mate de dieren daadwerkelijk pijn kunnen ervaren.
- Daarom zou in onze ogen het zorgvuldigheidsprincipe hier op zijn plaats zijn. Op basis van de raakvlakken van het atp6ap2 model met de bovengenoemde voorbeelden is ernstig ongerief in onze ogen niet uitgesloten. Kunt u onderbouwen waarom u van oordeel bent dat deze

dieren slechts licht ongerief zullen ervaren of het ongerief voor deze dieren aanpassen naar een niveau dat in lijn is met de voorbeelden in de richtlijn?

12) Verschillende vragen over de NTS.

Vanwege de aard van de ontbrekende informatie is besloten de aanvraag aan te houden en pas in de vergadering te behandelen nadat alle vragen zijn beantwoord.

Reactie aanvrager

Zie stukken AVD202216092a (NTS) en g (letter to CCD).

Voorstel Secretariaat

5.2 lid1 heeft de aanvrager de openstaande vragen naar tevredenheid beantwoord. Daarmee bevat het projectvoorstel 5.2 lid1 voldoende informatie over het belang van het onderzoek, de strategie, de 3V's, het ongerief en de humane eindpunten om tot een oordeel te kunnen komen. Het DEC-advies kan als grondslag dienen voor het besluit.

Gezien het fundamentele karakter van de projectaanvraag is 5.2 lid1 dat het valideren van het atp6ap2fl/fl model tot inzichten kan leiden die als aanknopingspunt kunnen dienen voor verder onderzoek naar onderliggende mechanismen van atopie dermatitis en uiteindelijk kunnen bijdragen aan nieuwe behandelmethoden.

De strategie (inclusief go/no-go parameters) aangaande de selectie van genetische of farmacologische behandelingen en de opzet/uitkomstparameters van de pilotstudies zijn helder geformuleerd in de reactie van de aanvrager. Ook de vragen omtrent potentiële co-fouders (i.e. huideffecten Tamoxifen en effecten PRR manipulatie op andere organen dan de huid) zijn nu voldoende geadresseerd in de beschreven strategie.

De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat alternatieven, zoals in vitro 3D skin modellen, niet geschikt zijn voor het beantwoorden van de onderzoeksvragen.

De aanvrager heeft aannemelijk gemaakt dat het toepassen van analgesie kan interfereren met de experimentele opzet en dat aan de vereisten omtrent verfijning zal worden voldaan d.m.v. het tijdig implementeren van humane eindpunten.

De aanvrager heeft een samenhangende onderbouwing gegeven door de inschatting van het ongerief voor embryo's die tijdens het derde deel van de zwangerschap komen te overlijden. Gezien het snelle intreden van de dood (minuten) en het feit dat het pijn perceptie systeem van de muis zich pas volledig ontwikkelt na de geboorte 5.2 lid1

De NTS is aangepast en voldoet nu aan de gestelde eisen.

5.2 lid1



Advies aan CCD

B

Datum 09 januari 2023
Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202216092

Instelling: art. 5.1 lid 2 sub h
Onderzoeker: art. 5.1 lid 2 sub e
Project: Role of the (Pro) renin receptor (PRR) in skin development and homeostasis. Towards deciphering inflammation induced by proteotoxic-stress.
Aanvraagnummer: AVD202216092
Betreft: Nieuwe aanvraag
Categorieën: Fundamenteel onderzoek

1 Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's

Proces	<p>Het Secretariaat heeft nog geen vragen gesteld, maar stelt voor om de volgende vragen te stellen, indien de commissie zich hierin kan vinden:</p> <ul style="list-style-type: none">- Uit het projectvoorstel blijkt onvoldoende wat het atp6ap2fl/fl model geschikt maakt voor voor het onderzoeken van proteotoxische stress in algemene zin, aangezien dieren met deze specifieke afwijking niet levensvatbaar lijken te zijn. Ook is onvoldoende toegelicht wat de translationele waarde is van het model ten aanzien van atopische dermatitis in mensen en hoe de voorgestelde proeven hier inzicht in kunnen verschaffen. Deze informatie is van belang voor het maken van een schade-baten analyse van het project. Wij verzoeken u deze punten verder toe te lichten.- De algehele onderzoeksstrategie in uw projectaanvraag is onvoldoende inzichtelijk. Het is niet duidelijk hoe restoratieve (genetische of farmacologische) behandelingen zullen worden geselecteerd en uitgevoerd. Ook is onvoldoende helder beschreven wat er tijdens de pilotexperimenten in bijlage 3.4.3.1 zal worden onderzocht en welke uitkomstparameters zullen worden gebruikt om het restoratieve effect van behandelingen vast te stellen in bijlage 3.4.3.2 en wat in deze bijlage de go/no-go criteria zijn voor verdere experimenten. Wij verzoeken u om de strategie op deze punten verder toe te lichten.- In beide bijlagen is niet helder op welke manier de potentiële effectiviteit van de, nog te selecteren, behandelingen zal worden onderzocht. Kunt u toelichten welke manier geborgd wordt dat bij de selectie en inzet van deze behandelingen voldaan zal worden aan de vereisten omtrent vervanging, vermindering en verfijning?
---------------	---

- In bijlage 3.4.3.1 stelt u dat (nog onbekende) behandelingen bijwerkingen kunnen veroorzaken. U hebt echter kaders gesteld voor het mogelijke ongerief van deze bijwerkingen. Ook zijn in deze bijlagen geen humane eindpunten geformuleerd die het ongerief van eventuele bijwerkingen kunnen inperken. Kunt u de bijlage op deze punten aanvullen?

- In bijlage 3.4.3.2 zal een deel van de dieren (huid)inflammatie ontwikkelen. Het is echter niet duidelijk welke mogelijkheden tot pijnstilling voor deze dieren zijn overwogen en waarom pijnstilling niet wordt toegepast. Kunt u uw overwegingen omtrent pijnstilling toelichten?

- Ten aanzien van de embryo's in bijlage 3.4.3.1 stelt u dat deze licht ongerief zullen ondergaan. Een aanzienlijk deel van deze embryo's zal echter in een vergevorderd stadium van de dracht komen te overlijden aan de gevolgen van hun genetische modificatie. In bijlage VIII van richtlijn 2010/63/EU geeft de volgende voorbeelden van ernstig ongerief:

- Toxiciteitstests met de dood als eindpunt, dan wel met naar verwachting sterfgevallen en de opwekking van ernstige pathopsychologische toestanden.

- Modellen voor de inductie van tumoren, of met spontane tumoren, waarbij naar verwachting een dodelijke voortschrijdende ziekte optreedt, gepaard met een langdurige matige vorm van pijn, angst of lijden.

- Het fokken van dieren met genetische afwijkingen die naar verwachting de algemene toestand van het dier ernstig en permanent zullen hinderen. Op basis van de raakvlakken van het atp6ap2 model met de bovengenoemde voorbeelden is in onze ogen ernstig ongerief niet uit te sluiten. Voor ongeboorte dieren is moeilijk vast te stellen in welke mate de dieren daadwerkelijk pijn kunnen ervaren. Daarom zou in onze ogen het zorgvuldigheidsprincipe hier op zijn plaats zijn. Kunt u onderbouwen waarom u van oordeel bent dat deze dieren slechts licht ongerief zullen ervaren ondergaan of het ongerief voor deze dieren aanpassen naar een niveau dat in lijn is met de voorbeelden in de richtlijn?

- Wij verzoeken u om na te gaan of de beantwoording van bovenstaande vragen ook leidt tot aanpassingen in de NTS.

Vragen NTS:

- De titel van de NTS bevat termen die voor de gemiddelde Nederlander lastig navolgbaar zijn. Kunt u de titel herschrijven op een manier die beter navolgbaar is voor het algemeen publiek?

- In de NTS hebt u 'Instandhouding kolonies' als doelstelling aangevinkt,

	<p>terwijl dit niet het geval is in de projectaanvraag zelf. Kunt u deze doelcategorie uit de NTS verwijderen?</p> <p>- Onder verfijning schrijft u dat de dieren worden 'geëthanaseerd'. De CCD vindt dat het woord 'doden' een beter beeld geeft bij wat er met de dieren gebeurt. Kunt u euthanaseren aanpassen in doden?</p> <p>- Kunt u de NTS in het officiële Excel format aanleveren? Dit format is te downloaden op de website van de CCD.</p>			
Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
<p>3.4.3.1 Collection of skin from embryos at stages E13.5, E14.5, E15.5 and E18.5 (K5-Cre driven deletion). For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin</p>				

	Muizen (<i>Mus musculus</i>)	Primiparous > 8-week-old, atp6ap2 Flox/Flox of atp6ap2 Flox/Flox in combination with gain or loss of function in candidate gene; E13.5/E14.5/E15.5/E18.5, Epidermal-specific deletion of atp6ap2 and control littermates in combination with gain or loss of function in candidate gene	7.490	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn
--	--------------------------------	---	-------	---------------------------------------

3.4.3.2 Collection of skin from control and mutant mice at different time points of skin defect development (5-8 days, 15 days, 30 days post tamoxifen injection) (K14-Cre ESR1 driven deletion). For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin

	Muizen (Mus musculus)	Epidermal-specific deletion of atp6ap2 sometimes in combination with gain or loss of function in candidate gene, and control littermates	974	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn
--	-----------------------	--	-----	---------------------------------------

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

3.4.3.1 Collection of skin from embryos at stages E13.5, E14.5, E15.5 and E18.5 (K5-Cre driven deletion). For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin

Muizen (Mus musculus) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt. Citaat. Pregnant females required; gender of embryos defined retrospectively.

3.4.3.2 Collection of skin from control and mutant mice at different time points of skin defect development (5-8 days, 15 days, 30 days post tamoxifen injection) (K14-Cre ESR1 driven deletion). For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin

Muizen (Mus musculus) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt. Citaat. Knock-out males as first steps, heterozygous females if go moment

Locatie uitvoering experimenten	- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
--	--

2 DEC advies

DEC-advies	Citaat C18. Voor de experimenten in bijlage 1 zullen zowel mannelijke als vrouwelijke dieren worden gebruikt. Voor bijlage 2 zullen de meeste experimenten eerst worden uitgevoerd met alleen controle- en knock-out mannelijke muizen. Afhankelijk van de bevindingen en hoe relevant het opnemen van vrouwelijke muizen is, zal er een Go no-Go moment zijn om te beslissen of vrouwtjes moeten worden opgenomen in aanvullende experimenten. Dit is naar inziens van de DEC voldoende wetenschappelijk onderbouwd
-------------------	---

Ethische afweging van de DEC:

Citaat.

1. Rechtvaardigt het onderzoek dat gericht is op het ontrafelen van de moleculaire en cellulaire mechanismen van intracellulaire proteotoxische stress alsook de mechanismen van het induceren van een immunologische door proteotoxische stress de inzet van 6420 muizen, waarvan 6420 embryo's (>13.5) die allemaal mild ongerief zullen ondervinden en 2044 volwassen muizen waarvan 98,5% mild ongerief zullen ondervinden en 1,5% cumulatief matig ongerief?

2. De belangrijkste belanghebbenden in dit project dat gericht is op het ontrafelen van de moleculaire en cellulaire mechanismen van intracellulaire proteotoxische stress alsook de mechanismen van het induceren van een immunologische door proteotoxische stress zijn de proefdieren de betrokken onderzoekers, de patiënten en de samenleving. Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: een nadeel. De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de genetische modificatie en de muizen zullen licht (98,5% van de dieren) tot matig (1,5%) ongerief ondervinden.

Waarden die voor de onderzoekers bevorderd worden: mogelijk voordeel. Er zijn al veelbelovende resultaten behaald in voorgaande onderzoeken en de voorgestelde studies kunnen leiden tot enerzijds meer kennis over fundamentele pathogenetische aspecten van AD maar ook omtrent de validatie van het PRR deletie muizenmodel als onderzoeksmodel voor AD. Hierdoor zullen de wetenschappers nieuwe kennis verkrijgen wat kan uitmonden in publicaties waardoor hun carrière mogelijkheden kunnen verbeteren.

Waarden die de patiënten bevorderd kunnen worden: mogelijk voordeel door de beschikbaarheid van nieuwe kennis omtrent de pathogenese van AD kan er nieuw perspectief ontstaan op nieuwe behandelingsstrategieën waardoor de individuele ziektelast zal afnemen en de kwaliteit van leven toenemen.

Waarden die voor de samenleving bevorderd kunnen worden: een mogelijk voordeel: effectievere behandeling van AD patiënten zal resulteren in daling van de zorgkosten en verzuimkosten.

De DEC leden zijn van mening dat het projectvoorstel en de antwoorden op de gestelde vragen nog onvoldoende duidelijkheid hebben opgeleverd over met name de berekeningen van het aantal dieren, de toepassing van compounds en de overeenkomst tussen het muismodel met PRR deletie en AD bij de mens. Om die reden is de aanvrager gevraagd om een mondelinge toelichting te geven tijdens de DEC vergadering. De toelichting en de daarop volgende discussie heeft ertoe geleid dat DEC leden wel hun individuele ethische afweging konden maken. De DEC leden zijn niet unaniem maar wel in meerderheid van mening dat de

belangen van de AD patiënten, de samenleving en de onderzoekers groter dan die van de proefdieren.

3. Het belang van PRR receptoren voor een normale ontwikkeling van de huid en voor het behoud van huidhomeostase is in voorgaande studies vastgesteld. De pathologische huidveranderingen die optreden bij afwezigheid van PRR vertonen, histologisch en immunologisch, overeenkomst met de veranderingen in de huid bij Atopische dermatitis (AD) patiënten. Door het vergaren van fundamentele kennis over de cascade van pathofysiologische processen die optreden in de huid van het PRR deletie muismodel hoopt men meer kennis te verkrijgen over de pathogenese van AD. Nieuwe kennis over de pathogenese van AD biedt wellicht mogelijkheden om nieuwe behandelingsstrategieën te ontdekken. Volgens huidartsen is AD niet alleen een veel voorkomende maar ook een ondermijnende huidaandoening waar nog onvoldoende behandelingen voor beschikbaar zijn, m.a.w. er is behoefte aan verdieping van kennis over de pathogenese en aan aanknopingspunten voor mogelijk nieuwe behandelingen. Dit rechtvaardigt volgens de meerderheid van de DEC leden vervolgonderzoek in PRR deletie muismodellen. Deze DEC leden zijn overtuigd van het maatschappelijk – en wetenschappelijk belang van het beschreven onderzoek. De ethische afweging door DEC leden levert geen consensus op, de meeste DEC leden zijn van mening dat de belangen van de patiënten, de samenleving en de onderzoekers zwaarder wegen dan de belangen van de proefdieren; deze DEC leden geven een positief advies.

Deze DEC leden zijn overtuigd van het belang van de doelstellingen van dit project. Naar inziens van deze DEC leden beschrijft de aanvraag belangrijk onderzoek, dat zowel maatschappelijk als ook wetenschappelijk zeer relevant is. Deze DEC leden zijn van mening dat:

- de waarden die voor de patiënten, de samenleving en de onderzoekers bevorderd kunnen worden zwaarder wegen dan de waarden die voor de proefdieren in het geding zijn.
- de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstelling en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.
- dat de onderzoeksgroep voldoende kennis en ervaring heeft om met de gekozen onderzoeksstrategie en met de voorgestelde dierproeven de doelstelling te behalen en dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om het ongerief van de dieren te beperken.
- de doelstelling niet zonder het gebruik van proefdieren behaald kan worden en acht het gebruik van proefdieren en het daarmee samenhangende ongerief bij de dieren ethisch gerechtvaardigd.

De DEC heeft extern advies ingewonnen bij

- de aanvrager is om aanvullingen gevraagd
Citaat A8 (horen van de aanvrager).

De DEC heeft bij de aanvrager aanvullende informatie ingewonnen met betrekking tot de keuze voor het model, het ongerief van de embryo's, de humane eindpunten voor de dieren met een huidfenotype en de 3 replicaten.

Citaat A9 (Correspondentie met de aanvrager).

De DEC heeft bij de aanvrager aanvullende informatie ingewonnen met betrekking tot de focus van het onderzoek, het type compounds dat gebruikt wordt, de go/no-go momenten, de selectiecriteria voor de te gebruiken compounds, de berekening van het aantal benodigde nestjes/dieren, de toedieningsroute en frequentie, het ongerief van de embryo's, het ongerief als gevolg van de toediening van compounds en de humane eindpunten. Daarnaast heeft de DEC verzocht de NTS aan te passen.

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus.

Citaat E2.

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt in de DEC.

Eén van de DEC leden komt tot een negatief advies: "Hieronder geef ik mijn inschatting van het wetenschappelijke en maatschappelijke belang van het voorgestelde onderzoek en formuleer ik de twee belangrijkste bezwaren die ik tegen het onderzoek heb, en die mijn negatieve advies motiveren.

Het belang van het onderzoek schat ik als gemiddeld in. Het wetenschappelijk belang is dat dit onderzoek kan bijdragen aan meer begrip van de mechanismen achter huidaandoeningen, in het bijzonder atopische dermatitis (AD) maar ook psoriasis en wellicht huidaandoeningen meer in het algemeen. Dit wetenschappelijke belang zie ik echter niet los van het maatschappelijke belang van dit onderzoek. De verwachte wetenschappelijke opbrengst van dit onderzoek heeft in mijn optiek waarde voor zover het (in combinatie met andere studies in dit domein) uiteindelijk bijdraagt aan de ontwikkeling van meer effectieve

therapieën voor huidaandoeningen – ik zie geen grote waarde in de wetenschappelijke opbrengst in zichzelf, los van een eventuele vertaling naar therapieën. Het ontwikkelen van meer effectieve therapieën voor huidaandoeningen dient zeker een relevant maatschappelijk belang. Volgens een systematische review en meta-analyse (Birdi et al. 2020) heeft AD een significante invloed op de kwaliteit van leven (QoL) van patiënten, met name door symptomen als jeuk, ontsteking en slapeloosheid; deze symptomen zijn meer van invloed dan de impact op het uiterlijk. Volgens hetzelfde onderzoek is er ook een significante negatieve relatie tussen de ernst van de aandoening en QoL, maar lopen de scores in verschillende onderzoeken nogal uiteen – hoe zwaar ernstigere vormen van AD precies op de QoL drukken en in welke mate bestaande therapieën effectief zijn wordt (mij) dan ook niet helemaal duidelijk. Desondanks accepteer ik dat het ontwikkelen van therapieën een relevant maatschappelijk belang dient, vooral ook gezien door de hoge prevalentie van huidaandoeningen zoals atopische dermatitis. Dit belang is denk ik niet zo groot als voor aandoeningen met een eveneens hoge prevalentie en een ernstiger ziekteverloop, maar toch substantieel. Ik heb echter bezwaar tegen, ten eerste, het model waarvan dit onderzoek gebruik wil maken. Zoals ik het begrijp is het plan genetisch aangepaste muizen te ontwikkelen die al als embryo een aandoening ontwikkelen die qua symptomen op AD lijkt. In de eerste fase van het onderzoek zou worden gekeken hoe de aandoening zich in verschillende fasen in de embryo's manifesteert (met uiteenlopende uitleesparameters) en in de tweede fase of er stoffen toegediend kunnen worden die de ontwikkeling van de aandoening kunnen stoppen of remmen. Zoals ook in onze DEC vergaderingen over deze aanvraag besproken, is dit wetenschappelijk gezien een ingewikkeld model: de aandoening ontwikkelt zich op een heel andere manier in de muizen, waar de aandoening door specifieke genetisch aanpassingen geïnduceerd wordt, dan bij mensen, waar niet zo een duidelijke genetische oorzaak voor AD te vinden is. In de latere stadia zouden de mechanismen tussen mens en muismodel op elkaar moeten lijken, maar wetenschappelijk gezien is het model in elk geval niet straightforward. Bovendien roept het model in mijn optiek ethische bezwaren op. Naar verwachting zullen 10% van de embryo's van 13,5 dag oud, 30% van de embryo's van 15,5 dag oud, en 90% van de embryo's van 18,5 dag oud door de aandoening komen te overlijden. Op de overleden embryo's kunnen als ik het goed begrijp niet altijd wetenschappelijke experimenten uitgevoerd worden: zeker als het jongere embryo's betreft zijn ze vaak niet meer terug te vinden. Daarom moeten er méér embryo's 'gegeneerd' worden voor de wetenschappelijke doelstelling van het onderzoek en is de relatieve hoeveelheid (niet-)overleden embryo's een belangrijke uitkomstmaat om de effectiviteit van therapeutische stoffen te bepalen. Dit zie ik als een zeer

onsubtiele en onwenselijke aanpak om de bedoelde huidaandoeningen te onderzoeken, die bij mensen immers hele andere en minder dodelijke uitkomsten hebben. Bovendien is – volgens het antwoord van de onderzoeker zelf op mijn vraag hierover – niet duidelijk in welke mate de embryo's ongerief van hun fenotype en overlijden ondervinden. De onderzoeker stelt dat dit moeilijk te bepalen is en verder dat de meeste embryo's al relatief jong overlijden (rond 15,5 dag oud). Een muizenembryo ontwikkelt zich echter in ongeveer 21 dagen, en muizen van 15,5 dag zijn dus naar mijn idee relatief ver ontwikkeld; daarnaast overlijdt 30% van de embryo's tussen de 15,5e en 18,5e dag. Daarom kan mijns inziens niet worden aangenomen dat de embryo's geen ongerief zullen ervaren. Dat de mate waarin embryo's zullen lijden zo onduidelijk is, zie ik als belangrijk probleem van deze onderzoeksopzet. Wellicht is er wetenschappelijk gezien op dit moment geen beter model – daar kan ik niet over oordelen – maar dat betekent niet dat de nadelen van dit model dus geaccepteerd moeten worden.

Een tweede bezwaar tegen dit onderzoek is dat de berekeningen van de aantallen benodigde dieren en de go/no-go momenten onduidelijk zijn gebleven. Hoewel de DEC algemeen de indruk had dat de onderzoekers goed over de onderzoeksopzet hadden nagedacht en op basis daarvan aannam dat de berekeningen en go/no-go momenten ook wel in orde (zij het onduidelijk) zouden zijn, vind ik dat onvoldoende. Eén van de taken van de DEC is om te controleren of aan de 3 V's voldaan is, maar wat mij betreft heeft de DEC niet kunnen vaststellen dat er inderdaad geen mogelijkheden tot vermindering zijn. Dit bezwaar weegt voor mij minder zwaar dan het vorige maar telt wel mee in mijn negatieve advies."

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies

Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen, maar de beantwoording van beoordelingsvragen sluit in onze ogen niet op alle punten aan bij de inhoud van de projectaanvraag. Ten aanzien van de projectaanvraag in de staat zoals aangeleverd in 28-10-2022 kunnen wij ons vinden in het minderheidsstandpunt, omdat de aanvraag in onze ogen te kort schoot op de volgende punten:

- Uit het projectvoorstel bleek onvoldoende wat het atp6ap2fl/fl model geschikt maakt voor voor het onderzoeken van proteotoxische stress in algemene zin. Dieren met deze specifieke afwijking lijken immers niet levensvatbaar te zijn. Ook was onvoldoende toegelicht wat de translationele waarde is van het model ten aanzien van atopische dermatitis in mensen en hoe de voorgestelde proeven hier inzicht in kunnen verschaffen. Deze informatie is van belang voor het maken van de schade/baten analyse van het project.

- De algehele onderzoeksstrategie in de projectaanvraag was nog onvoldoende inzichtelijk. Zo was niet duidelijk hoe restoratieve (genetische of farmacologische) behandelingen zullen worden geselecteerd en uitgevoerd. Ook was onvoldoende helder beschreven wat er tijdens de pilotexperimenten in bijlage 1 zal worden onderzocht, welke uitkomstparameters zullen worden gebruikt om het restoratieve effect van behandelingen vast te stellen in bijlage 2 en wat in deze bijlage de go/no-go criteria zijn voor verdere experimenten.

- Het ongerief en de 3V's waren onvoldoende toegelicht. In beide bijlagen was niet helder beschreven op welke manier de potentiële effectiviteit van de, nog te selecteren, behandelingen zal worden onderzocht. Zodoende is niet navolgbaar of bij de selectie en inzet van deze behandelingen voldaan zal worden aan de vereisten omtrent vervanging, vermindering en verfijning. Ook werd in bijlage 1 door de aanvrager verwezen naar bijwerkingen van behandelingen, maar werden deze niet nader gespecificeerd in termen van ongerief of ingekaderd door middel van humane eindpunten. Tot slot zullen dieren in bijlage 3.4.3.2 (huid)inflammatie ontwikkelen. Het is echter niet duidelijk welke mogelijkheden tot pijnstilling voor deze dieren zijn overwogen en waarom pijnstilling niet wordt toegepast.

- Voor het embryomodel in bijlage 1 was niet toegelicht hoe men tot de ongeriefinschatting licht is gekomen. Dit was niet vanzelfsprekend, omdat een aanzienlijk deel van deze embryo's in een vergevorderd stadium van de dracht zal komen te overlijden aan de gevolgen van hun genetische modificatie.

Wij hebben de aanvrager verzocht om de projectaanvraag op de bovenstaande punten te verduidelijken en de aanvullingen van de aanvrager hebben voldoende helderheid verschaft om tot een besluit te komen.

4 Inhoudelijke beoordeling

Belangen- verstrengeling	5.1 lid2e
Doelstelling Doelstelling	<p>Citaat.</p> <p>In this context, the project's immediate goal is to decipher the molecular and cellular mechanisms leading to proteotoxic stress associated disorders. We have developed unique mouse models that represent early and late stages of the immune reaction due to intracellular stress and they will be used to:</p> <ul style="list-style-type: none">- Goal 1: define the molecular and cellular mechanisms leading to the proteotoxic stress and the early immune response associated (mouse model 1, PRR deletion during embryogenesis, see 3.4.1). Single cell (Sc) RNAseq analysis of the skin of the PRR mutant and control mice will be compared at different stages of disease development and dysregulated pathways will be confirmed at the protein level (Goal 1.1). When possible, functional restoration approaches will be used to validate major findings by an independent approach (Goal 1.2).- Goal 2: define how this continuous proteotoxic stress leads to chronic inflammation and what are the mediators of the immune response (mouse model 2, post-natal deletion of PRR, see 3.4.1). Sc RNAseq analysis will be performed upon cell isolation at early and later time points and dysregulated pathways will be confirmed at the protein level (Goal 1.1). When possible, functional restoration approaches will be used to validate the findings by an independent approach and to evaluate potential compounds that can reduce inflammation. We will define if this mouse model is relevant to study atopic dermatitis, a human skin disorder associated with TH2 type of immune response (Goal 2.2). <p>The ultimate goal of this project is to get knowledge on the chronic inflammation in response to intracellular stress and on how relevant it is for the pathogenesis of atopic dermatitis, which is a prerequisite for clinical management. We hope to validate our mouse model as a preclinical model of human atopic dermatitis. In addition, this project should give insight on how different immune cells are recruited to the skin during embryonic development, which show quite discrepancies in literature.</p>

Wetenschappelijk en maatschappelijk belang	<p>Citaat.</p> <p>The scientific relevance of the project is to provide:</p> <p>(1) knowledge on PRR function during skin morphogenesis: first demonstration that PRR controls the epidermal progenitor fate, and that the epidermis controls dermal lymphatic remodelling during development. This communication between epidermis and dermal lymphatic vessels represents a novel area of research, that seems to be associated to an immune reaction as early as at E15.5.</p> <p>(2) knowledge on PRR function in post-natal skin: in particular, on skin inflammation, which is a feature of most of skin conditions. These models will allow deciphering how chronic inflammation is induced and maintained in response to intracellular stress. We hope to develop a good model of atopic dermatitis that integrates the different aspects of the pathology (crosstalk of epidermis and dermis involving immune cells).</p> <p>The social relevance of these findings is to assess the contribution of proteotoxic stress to various skin disorders associated with chronic inflammation. Disorders such as atopic dermatitis, psoriasis, although associated with TH2 and TH1 type of immune response respectively, are both associated with chronic inflammation, which is due to multiple factors of unknown origin. We believe that proteotoxic stress contributes to this inflammation and we hope to characterize the early stages of the response in mice to find markers to access these questions within samples of human origin. If our hypothesis is true, the development of inhibitors of such stress (to be applied topically) could be beneficial for patients with such chronic disorders.</p>
Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang	Het belang is voldoende uitgewerkt.

<p>Wetenschappelijke kwaliteit Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek</p>	<p>Citaat DEC advies C7. Naar overtuiging van de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen (budget en capaciteit) om de projectdoelstelling met de gekozen strategie binnen de gevraagde termijn te kunnen realiseren. Dit projectvoorstel voor proefdieronderzoek is gebaseerd op eerder behaalde onderzoeksresultaten. 5.1 lid2h</p> <p>[Redacted]</p> <p>Daarnaast heeft de vakgroep unieke muismodellen ontwikkeld waarmee de functie van epidermale PRR tijdens de embryonale ontwikkeling en in het behoud van postnatale huidhomeostase kan worden bestudeerd.</p> <p>Het Secretariaat heeft geen reden te twifelen aan de kwaliteit van de aanvragers en het onderzoek.</p>
---	--

3V's

Vervanging	<p>3.4.3.1 Collection of skin from embryos at stages E13.5, E14.5, E15.5 and E18.5 (K5-Cre driven deletion). For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin: Citaat.</p> <p>The molecular mechanisms downstream of PRR deletion can be deciphered only in vivo as they involve interactions between cell types of epidermis and dermis. The 3D skin models currently available show reduced barrier properties and do not reflect the complexity of the skin. They show stratified epidermis, but composition of the dermis is reduced to fibroblasts and does not show vessels or immune cells. Discovering early markers of proteotoxic stress in mice will allow accessing if this process is generally found in human disorders. We have a collaboration with the Dermatology department of our institute and have access to human skin cryosections.</p>
	<p>3.4.3.2 Collection of skin from control and mutant mice at different time points of skin defect development (5-8 days, 15 days, 30 days post tamoxifen injection) (K14-Cre ESR1 driven deletion). For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin: Citaat.</p> <p>Phenotypic analysis of PRR deletion involves complex interaction between cell types of epidermis and dermis and the molecular relays are not well established so far and therefore can be determined only in vivo. We have a collaboration with the department of Dermatology of our institution to translate our mouse data to human conditions by using skin cryosections of human skin.</p>

Verminderen	
	<p>3.4.3.1 Collection of skin from embryos at stages E13.5, E14.5, E15.5 and E18.5 (K5-Cre driven deletion). For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin: Citaat.</p> <p>The minimum number of mice required to get statistically significant results has been anticipated based on our previous experiments and statistical analyses. To reduce the number of mice, back skin including that of the head of the embryos will be used.</p>
	<p>3.4.3.2 Collection of skin from control and mutant mice at different time points of skin defect development (5-8 days, 15 days, 30 days post tamoxifen injection) (K14-Cre ESR1 driven deletion). For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin: Citaat.</p> <p>The minimum number of mice required to get significant result has been anticipated based on our previous experiment and statistical analyses. To reduce the number of mice used, only male littermates will be used as a first step.</p> <p>Skin samples will be collected and used for the different analyses.</p>
Verfijnen	
	<p>3.4.3.1 Collection of skin from embryos at stages E13.5, E14.5, E15.5 and E18.5 (K5-Cre driven deletion). For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin: Citaat.</p> <p>The procedure used is dedicated to the collection of biological material. Experiments will be performed by staff that are highly skilled and experienced with animal handling. As a result, all procedures with the animals will be performed with the greatest care and minimal animal distress will be ensured.</p>
	<p>3.4.3.2 Collection of skin from control and mutant mice at different time points of skin defect development (5-8 days, 15 days, 30 days post tamoxifen injection) (K14-Cre ESR1 driven deletion). For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin: Citaat.</p> <p>Endpoints have been defined to allow humane sacrificed of animals. Experiments will be performed by staff that are highly skilled and experienced with animal handling. As a result, all procedures with the animals will be performed with the greatest care and minimal animal distress will be ensured.</p>

Hergebruik	Er is geen sprake van hergebruik van dieren.
-------------------	--

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.3.1 Collection of skin from embryos at stages E13.5, E14.5, E15.5 and E18.5 (K5-Cre driven deletion). For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.3.2 Collection of skin from control and mutant mice at different time points of skin defect development (5-8 days, 15 days, 30 days post tamoxifen injection) (K14-Cre ESR1 driven deletion). For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin	Ja	volgens de richtlijn.

Naam proef		
3.4.3.1 Collection of skin from embryos at stages E13.5, E14.5, E15.5 and E18.5 (K5-Cre driven deletion). For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin	HEP: Worden niet verwacht	
Muizen (Mus musculus)	Ongerief: 100,0% Licht	
3.4.3.2 Collection of skin from control and mutant mice at different time points of skin defect development (5-8 days, 15 days, 30 days post tamoxifen injection) (K14-Cre ESR1 driven deletion). For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin	HEP: 1%	Citaat. Mice will be observed in a daily basis starting at Day 15 post-tamoxifen injection and will be humanely sacrificed in case the following define end points are reached: visible pain (abnormal posture and/or movement), significant weight loss (> 10 %), abnormal behavior (isolation) as well as if 50% of their body surface exhibits erythema or if they constantly scratch or if they have a wound greater than 0.5 cm in length.
Muizen (Mus musculus)	Ongerief: 13,1% Matig 86,9% Licht	

5 Samenvatting

Het project is een voortzetting van AVD **5.1 lid2h** hierin heeft men een atp6ap2fl/fl muismodel opgezet waarbij geen The (pro)renin receptor (PRR) op de opperhuid wordt aangemaakt. Zie pagina 2 van het projectvoorstel voor de opbrengsten van dit project. In navolging van dit project wil men in de huidige aanvraag proteotoxische stress (pathologie door beschadigde of verkeerd gevouwen eiwitten) nauwkeuriger karakteriseren, de cellulaire en moleculaire mechanismen ontrafelen die leiden tot proteotoxische stress en de moleculaire cascade ontrafelen die volgt op de proteotoxische stress en de TH2 type immuunrespons induceert. De TH2 immuunrespons resulteert in chronische huidontsteking die histologisch en immunologisch veel overeenkomsten vertoont met atopische dermatitis bij de mens. Dat maakt dat de onderzoekers dit (PRR deletie) muismodel willen inzetten voor pathogenese onderzoek van atopische dermatitis.

Waar mogelijk willen de onderzoekers manipulaties (genetisch/compounds) toepassen, als verificatie en validatie van de onderliggende moleculaire mechanismen, die de cascade van pathologische veranderingen kunnen blokkeren, voorkomen of zelfs kunnen terugdraaien, m.a.w. regeneratie van pathofysiologische veranderingen.

5.2 lid1

De DEC geeft een positief advies met een op basis van een meerderheidsstandpunt. Eén lid geeft een negatief advies op basis van twijfels over de translationele waarde van het model voor humane atopische dermatitis en omdat het atp6ap2fl/fl model met embryosterfte als uitkomstparameter ethisch zeer onwenselijk zou zijn is gezien het grote aantal benodigde embryo's, waarvan slechts een beperkt aantal geanalyseerd wordt en de onduidelijke mate van ongerief dat deze embryo's, waarvan een deel ver ontwikkeld zal zijn, zullen ondergaan. Tot slot vindt dit DEC lid dat de benodigde aantallen go/no-go momenten onvoldoende de helder zijn. **5.2 lid1**

5.2 lid1 is onvoldoende toegelicht waarom het atp6ap2fl/fl een geschikt model is voor het onderzoeken van proteotoxische stress in algemene zin. **5.2 lid1** onvoldoende toegelicht wat de mogelijke translationele waarde is van het model voor atopische dermatitis in mensen.

De strategie is onvoldoende inzichtelijk. Het is niet duidelijk hoe restoratieve

(genetische of farmacologische) behandelingen zullen worden geselecteerd en uitgevoerd, wat er in pilotexperimenten (bijlage 1) zal worden onderzocht en welke uitkomstparameters zullen worden gebruikt om het restoratieve effect van een behandeling vast te stellen (bijlage 2) en wanneer dit tot een go/no-go zal leiden.

Het is niet te beoordelen is of de aanvraag voldoet aan de vereisten omtrent de 3V's. Er wordt in bijlage 1 gesproken over mogelijke bijwerkingen van behandelingen, maar er zijn geen humane eindpunten geformuleerd ten aanzien van deze mogelijke bijwerkingen. In bijlage 2 zullen dieren huidinflammatie ontwikkelen, maar wordt niet ingegaan op de mogelijkheid om analgesie toe te passen. In beide bijlagen zullen nog onbepaalde behandelingen worden geselecteerd, maar wordt niet beschreven hoe de potentiële effectiviteit zal worden getoetst voorafgaand aan de in vivo experimenten.

Het ongerief voor de embryo's in bijlage 1 is een belangrijke factor in de ethische afweging. 5.2 lid1 is het ongerief voor deze dieren te licht ingeschat. Een aanzienlijk deel van de embryo's zal door de genetische modificatie in atp6ap2 komen te overlijden tussen E15,5 (30%) en E18,5 (90%). 5.2 lid1 niet vast te stellen of deze dieren licht ongerief zullen ondergaan, het zorgvuldigheidsprincipe zou daarom moeten worden toegepast. In bijlage VIII van richtlijn 2010/63/EU geeft de volgende voorbeelden van ernstig ongerief:

- Toxiciteitstests met de dood als eindpunt, dan wel met naar verwachting sterfgevallen en de opwekking van ernstige pathopsychologische toestanden.
- Modellen voor de inductie van tumoren, of met spontane tumoren, waarbij naar verwachting een dodelijke voortschrijdende ziekte optreedt, gepaard met een langdurige matige vorm van pijn, angst of lijden.
- Het fokken van dieren met genetische afwijkingen die naar verwachting de algemene toestand van het dier ernstig en permanent zullen hinderen.

Op basis van de raakvlakken van deze voorbeelden met het model voor proteotoxische stress, moet het ongerief van de embryo's die in bijlage 3.4.3.1 komen te overlijden waarschijnlijk ingedeeld worden in de categorie ernstig. Het ongerief bij ongeboren dieren is moeilijk objectief vast te stellen, maar 5.2 lid1 dat het zorgvuldigheidsprincipe leidend moet zijn. Embryo's in het derde deel van de zwangerschap worden door de Wod als proefdier geclassificeerd en er bestaan bij weten van het Secretariaat geen aparte ongeriefkaders voor ongeboren dieren. Het Secretariaat is daarom van oordeel dat vanuit het zorgvuldigheidsprincipe uitgegaan moeten worden van ernstig ongerief voor deze embryo's. Als de commissie zich in het oordeel van het Secretariaat kan vinden betekent dit dat het DEC advies niet als grondslag kan dienen voor het besluit.

6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning

5.2 lid1

A large rectangular area of the document is redacted with a solid grey fill, obscuring the text underneath.

De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.

7 Concept beschikking voor akkoord CCD

Naam van het project	De rol van de (pro)renine receptor (PRR) in de ontwikkeling en het evenwicht van de huid en de chronische ontstekingen die hier ontstaan.
NTS-identificatiecode	NTS-NL-788328 v.1
Nationale identificatiecode van de NTS <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	NTS202216092
Land	Nederland
Taal	nl
Indiening bij EU <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	ja
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	60
Trefwoorden	Huid Stress Immuunrespons Ontwikkeling Ontsteking
Doel(en) van het project	Fundamenteel onderzoek: Zintuigorganen (huid, ogen en oren)

DOELSTELLINGEN EN VERWACHTE VOORDELEN VAN HET PROJECT

<p>Beschrijf de doelstellingen van het project (bijvoorbeeld het aanpakken van bepaalde wetenschappelijke onduidelijkheden, of wetenschappelijke of klinische behoeften).</p>	<p>In dit project doen we onderzoek naar proteotoxische stress. Proteotoxische stress is een proces wat zich afspeelt in cellen. Door verschillende externe factoren kunnen de eiwitten in deze cellen van vorm gaan veranderen en samenklonteren. Doordat deze eiwitten een abnormaal uiterlijk hebben, kunnen ze ook hun functie niet correct uitvoeren. Dit kan zorgen voor verschillende problemen in de cel, waaronder chronische ontstekingen. In dit onderzoek ligt de focus op chronische ontstekingen in de huid, in het bijzonder op eczeem.</p> <p>Het doel van het project is dan ook het ontrafelen van de onderliggende mechanismen die de oorzaak zijn van proteotoxische stress-geassocieerde ziekten. Het is reeds onderzocht dat in eczeem aanhoudende proteotoxische stress kan leiden tot chronische ontstekingen, wat samenhangt met een constante aanwezigheid van immuuncellen.</p> <p>Om dit alles te onderzoeken hebben we speciale muismodellen ontwikkeld. Deze muizen missen een belangrijk molecuul op de buitenkant van hun cellen: de (pro)renine receptor (hierna PRR genoemd). Door de afwezigheid hiervan ontstaat er proteotoxische stress in hun cellen. Deze muizen kunnen hierdoor gebruikt worden om:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) De mechanismen te bestuderen die leiden tot proteotoxische stress en de immuunrespons die hiermee samenhangt. 2) Te onderzoeken hoe continue proteotoxische stress kan leiden tot chronische ontstekingen. <p>Uiteindelijk zullen we ook verschillende stoffen evalueren die kunnen voorkomen dat er chronische ontstekingen ontstaan. Op deze manier kunnen we het proces rond proteotoxische stress beter begrijpen, waardoor er op den duur ook nieuwe aangrijpingspunten voor therapieën tegen chronische huidziekten gevonden kunnen worden.</p>
---	--

<p>Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen, dieren of het milieu uiteindelijk</p>	<p>Met dit project verwachten wij meer te weten te komen over de chronische ontsteking die voortkomen uit proteotoxische stress.</p> <p>Verder willen wij een goed model te ontwikkelen dat menselijk eczeem accuraat nabootst. Dit model kan vervolgens gebruikt worden om medicijnen op te testen waardoor er uiteindelijk nieuwe</p>
---	---

voordeel kunnen hebben bij het project. Maak, waar van toepassing, een onderscheid tussen voordelen op korte termijn (binnen de looptijd van het project) en voordelen op lange termijn (die mogelijk pas worden bereikt nadat het project is afgerond).

behandelingen voor eczeem uitgedacht kunnen worden.

Omdat er nog niet veel bekend is over proteotoxische stress en de ontstekingen die hieruit voortkomen, kan er door dit model daarnaast ook een basis worden gelegd voor onderzoek naar andere proteotoxische stress-geassocieerde ziekten.

VOORSPELDE SCHADE

<p>In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.</p>	<p>In dit onderzoek gebruiken wij muizen die een genetische aanpassing hebben ondergaan (de verwijdering van de PRR op de buitenkant van hun cellen). Deze muizen zullen hierdoor chronische ontstekingen in de huid ontwikkelen. De dieren zullen de volgende handelingen ondergaan:</p> <p>(1) De huid van deze aangepaste (en onaangepaste) muizen zal verzameld worden. Dit wordt gedaan op verschillende tijdstippen vóór de geboorte van de muizen. Daarnaast zullen deze dieren (via de moeder) stoffen toegediend krijgen die de chronische ontstekingen kunnen voorkomen of behandelen.</p> <p>(2) De huid van aangepaste (en onaangepaste) muizen wordt ook verzameld na de geboorte. Dit wordt gedaan op verschillende tijdstippen van ontwikkeling van huiddefecten (5-8 dagen, 15 dagen, 90 dagen). Dieren zullen soms behandeld worden met stoffen die chronische ontstekingen kunnen voorkomen of behandelen.</p> <p>Handeling (1) en (2) zijn onafhankelijke procedures waarbij dieren van verschillende genetische achtergronden betrokken zijn.</p>																
<p>Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren, bijvoorbeeld pijn, gewichtsverlies, inactiviteit/verminderde mobiliteit, stress, abnormaal gedrag, en wat is de duur van die effecten?</p>	<p>We verwachten alleen negatieve gevolgen in de muizen waar het PRR-gen ontbreekt. Deze muizen kunnen na het verwijderen van het PRR-gen veranderingen van de huid vertonen. De verschijnselen die worden gezien zijn o.a. haaruitval en jeuk. Vanwege dit lijden worden de muizen zo kort mogelijk na het verschijnen van deze huidveranderingen onderzocht.</p> <p>In sommige experimenten worden vrouwelijke muizen bevrucht en vervolgens gedood om de embryo's in verschillende ontwikkelingsstadia te verkrijgen. In andere experimenten worden dieren behandeld met een stof doormiddel van injectie. Bij sommige muizen kunnen hierdoor ontstekingen in de huid ontstaan, wat kan zorgen voor pijn en jeuk bij de dieren. Alle dieren worden gedood na afloop van de experimenten.</p> <p>Het ongerief dat de dieren ondervinden kan als volgt worden ingedeeld: Licht ongerief: 96,6 % Matig ongerief: 3,4 %</p>																
<p>Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th rowspan="2">Totaal aantal</th> <th colspan="4">Geraamde aantallen naar ernstgraad</th> </tr> <tr> <th>Terminaal</th> <th>Licht</th> <th>Matig</th> <th>Ernstig</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Muizen (<i>Mus musculus</i>)</td> <td>4240</td> <td>0</td> <td>4096</td> <td>144</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Totaal aantal	Geraamde aantallen naar ernstgraad				Terminaal	Licht	Matig	Ernstig	Muizen (<i>Mus musculus</i>)	4240	0	4096	144	0
Soort:	Totaal aantal			Geraamde aantallen naar ernstgraad													
		Terminaal	Licht	Matig	Ernstig												
Muizen (<i>Mus musculus</i>)	4240	0	4096	144	0												
<p>Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th colspan="3">Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren</th> </tr> <tr> <th>Hergebruikt</th> <th>Teruggeplaatst</th> <th>Geadopteerd</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren			Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd									
Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren																
	Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd														
<p>Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.</p>	<p>De muizen zullen worden gedood om de huid te verzamelen en er verdere experimenten mee uit te voeren. Daarnaast worden bij het verkrijgen van de muizenembryo's ook de moeders gedood.</p>																

TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

<p>1. Vervanging Beschrijf welke diervrije alternatieven op dit gebied voorhanden zijn en waarom zij niet voor het project kunnen worden gebruikt.</p>	<p>Waar mogelijk gebruiken wij menselijke huid (die met toestemming verkregen is), voor experimenten in het laboratorium. Deze methode is echter niet uitgebreid genoeg. Het mechanisme wat in ons onderzoek bestudeerd wordt omvat namelijk veel verschillende celtypes (waaronder meerdere soorten huid- en immuuncellen) die in nauw contact staan en op elkaar reageren. Dit complexe systeem kan het beste onderzocht worden in een levend organisme. Een kweekbakje met cellen voldoet hierom niet. Daarnaast kan in een levend organisme onderzocht worden of de stoffen die toegediend worden, ook effect hebben op normale cellen.</p>
<p>2. Vermindering Leg uit hoe de aantallen dieren voor dit project zijn bepaald. Beschrijf de stappen die zijn genomen om het aantal te gebruiken dieren te verminderen en de beginselen die zijn gebruikt bij het opzetten van de studies. Beschrijf, waar van toepassing, de praktijken die gedurende het hele project zullen worden toegepast om het aantal dieren die in overeenstemming met de wetenschappelijke doelstellingen werden gebruikt, tot een minimum te beperken. Deze praktijken kunnen bijvoorbeeld bestaan uit proefprojecten, computermodellen, het delen van weefsel en hergebruik.</p>	<p>Voordat er onderzoek wordt gedaan op muizen, zal het effect van de afwezigheid van de PRR en de toegediende stoffen eerst worden onderzocht op cellen in een kweekschaal. Ter vermindering van het aantal proefdieren hebben we statistisch berekend hoeveel dieren er minimaal nodig zijn. Ten slotte wordt er zoveel mogelijk van de huid van elke muis gebruikt. Deze wordt vervolgens gebruikt voor verschillende soorten experimenten, zodat er niks verloren gaat</p>
<p>3. Verfijning Geef voorbeelden van de specifieke maatregelen (bv. verscherpte monitoring, postoperatieve behandeling, pijnbestrijding, training van dieren) die in verband met de procedures moeten worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken. Beschrijf de mechanismen om gedurende de looptijd van het project nieuwe verfijningstechnieken in gebruik te nemen.</p>	<p>Tijdens het onderzoek worden de muizen uitvoerig in de gaten gehouden. Zodra de muizen huidveranderingen vertonen worden ze zo snel mogelijk onderzocht. De muizen krijgen daarnaast huisvesting volgens vaste richtlijnen.</p> <p>Van tevoren wordt een humaan eindpunt bepaald. Om te voorkomen dat het dier te veel ongerief ondergaan zullen zij gedood worden wanneer dit eindpunt behaald wordt. Dit zal naar verwachting echter bijna nooit voorkomen.</p>
<p>Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe</p>	<p>De muis wordt gebruikt omdat deze makkelijk genetisch gemodificeerd kan worden. Daarnaast is het voor dit onderzoek essentieel om een dier met een huid te gebruiken. Hierdoor zijn minder complexe organismen zoals insecten of vissen niet geschikt voor dit onderzoek. Wij bouwen voort op de ruime kennis die wij hebben van muizen, de huid en het immuunsysteem en hebben hierdoor dit model kunnen ontwikkelen.</p>

VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT

Project geselecteerd voor BA?	nee
Termijn voor BA	
Reden voor de beoordeling achteraf	
Bevat ernstige procedures	
Maakt gebruik van niet-menselijke primaten	
Andere reden	
Toelichting van de andere reden voor de beoordeling achteraf	

AANVULLENDE VELDEN

Nationaal veld 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 4 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 5 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Startdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Einddatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Goedkeuringsdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Link naar de eerdere versie van de NTS buiten het EC-systeem	



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

5.1 lid2h

5.1 lid2e

5.1 lid2h



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0800 789 0789
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD 5.1 lid2h 02216092

Bijlagen

3

Datum 9 januari 2023

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 5.1 lid2e ,

Op 1 juni 2022 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Role of the (Pro) renin receptor (PRR) in skin development and homeostasis. Towards deciphering inflammation induced by proteotoxic-stress." met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202216092. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het is toegestaan om uw project uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. Deze vergunning wordt afgegeven voor de periode van 9 januari 2023 tot en met 1 september 2027.

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

Procedure

Advies dierexperimentencommissie

Wij hebben advies gevraagd bij 5.1 lid2h (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 28 oktober 2022. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

Nadere vragen aanvrager

Op 25 november 2022 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op de NTS, het diemodel, de strategie, de onderzoeksopzet, transleerbaarheid van de bevindingen, het ongerief en overwegingen omtrent de 3V's. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Datum:

9 januari 2023

Aanvraagnummer:AVD  202216092**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.

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: 0800 789 0789.

Datum:

9 januari 2023

Aanvraagnummer:AVD **5.1 lid2h** 202216092

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

5.1 lid2h

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:

Adres:

Postcode en plaats:

Deelnemersnummer:

5.1 lid2h

deze projectvergunning voor het tijdvak 9 januari 2023 tot en met 1 september 2027, voor het project "Role of the (Pro) renin receptor (PRR) in skin development and homeostasis. Towards deciphering inflammation induced by proteotoxic-stress." met aanvraagnummer AVD^{5.1 lid2h} 202216092, na advies van ^{5.1 lid2h}. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is ^{5.1 lid2h}

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

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 1 juni 2022
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 28 oktober 2022;
 - b Bijlagen dierproeven
 - 3.4.3.1 Collection of skin from embryos at stages E13.5, E14.5, E15.5 and E18.5 (K5-Cre driven deletion). For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin, zoals ontvangen op 28 oktober 2022;
 - 3.4.3.2 Collection of skin from control and mutant mice at different time points of skin defect development (5-8 days, 15 days, 30 days post tamoxifen injection) (K14-Cre ESR1 driven deletion). For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin, zoals ontvangen op 28 oktober 2022;
 - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 28 oktober 2022;
 - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 28 oktober 2022
 - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 16 december 2022.

Aanvraagnummer: AVD **5.1 lid 2b** 202216092

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
3.4.3.1 Collection of skin from embryos at stages E13.5, E14.5, E15.5 and E18.5 (K5-Cre driven deletion). For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin			
	Muizen (Mus musculus) / C57BL/6, genetisch gemodificeerd (atp6ap2)	7.490	100,0% Licht
3.4.3.2 Collection of skin from control and mutant mice at different time points of skin defect development (5-8 days, 15 days, 30 days post tamoxifen injection) (K14-Cre ESR1 driven deletion). For functional restoration with compounds: administration of appropriate dose of compounds through adequate route prior to collection of the skin			
	Muizen (Mus musculus) / C57BL/6, genetisch gemodificeerd (atp6ap2)	974	13,1% Matig 86,9% Licht

Geldende voorschriften

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

AVD^{5.1 lid2n}202216092

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:AVD 5.1 lid 2f 202216092

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.

Van: info@zbo-ccd.nl
Verzonden: woensdag 10 mei 2023 16:10
Aan: 5.1 lid2h
Onderwerp: Terugkoppeling over projectvergunningaanvraag AVD 5.1 lid2h 202216092

Geachte 5.1 lid2h

Op 01-06-2022 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'Role of the (Pro) renin receptor (PRR) in skin development and homeostasis. Towards deciphering inflammation induced by proteotoxic-stress.' met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202216092.

De CCD heeft de aanvrager aanvullende vragen gesteld. De aanvullingen hadden betrekking op de NTS, het diermodel, de strategie, de onderzoeksopzet, transleerbaarheid van de bevindingen, het ongerief en overwegingen omtrent de 3V's.

De CCD heeft besloten de vergunning toe te wijzen. De aanvrager en verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht. De beschikking is verstuurd op 9-1-2023.

Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen, maar de beantwoording van beoordelingsvragen sluit in onze ogen niet op alle punten aan bij de inhoud van de projectaanvraag. Ten aanzien van de projectaanvraag in de staat zoals aangeleverd in 28-10-2022 kunnen wij ons vinden in het minderheidsstandpunt, omdat de aanvraag in onze ogen te kort schoot op de volgende punten:

- Uit het projectvoorstel bleek onvoldoende wat het atp6ap2fl/fl model geschikt maakt voor voor het onderzoeken van proteotoxische stress in algemene zin. Dieren met deze specifieke afwijking blijken immers niet levensvatbaar te zijn. Ook was onvoldoende toegelicht wat de translationele waarde is van het model ten aanzien van atopische dermatitis in mensen en hoe de voorgestelde proeven hier inzicht in kunnen verschaffen. Deze informatie is van belang voor het maken van de schade/baten analyse, omdat deze inzicht geeft in de haalbaarheid en potentiële opbrengsten van het project.

- De algehele onderzoeksstrategie in de projectaanvraag was nog onvoldoende inzichtelijk. Zo was niet duidelijk hoe restoratieve (genetische of farmacologische) behandelingen zullen worden geselecteerd en uitgevoerd. Ook was onvoldoende helder beschreven wat er tijdens de pilotexperimenten in bijlage 1 zou worden onderzocht, welke uitkomstparameters zouden worden gebruikt om het restoratieve effect van behandelingen vast te stellen in bijlage 2 en wat in deze bijlage de go/no-go criteria waren voor verdere experimenten.

- Het ongerief en de 3V's waren nog onvoldoende toegelicht. In beide bijlagen was niet helder beschreven op welke manier de potentiële effectiviteit van de, nog te selecteren, behandelingen zou worden onderzocht. Zodoende was niet navolgbaar of bij de selectie en inzet van deze behandelingen voldaan zou worden aan de vereisten omtrent vervanging, vermindering en verfijning. Ook werd in bijlage 1 door de aanvrager verwezen naar bijwerkingen van behandelingen, maar werden deze niet nader gespecificeerd in termen van ongerief of ingekaderd door middel van humane eindpunten. Tot slot zullen dieren in bijlage 3.4.3.2 (huid)inflammatie ontwikkelen, maar was niet beschreven welke pijnstillingsmogelijkheden voor deze dieren zijn overwogen en waarom pijnstilling niet wordt toegepast.

- Voor het embryomodel in bijlage 1 was niet navolgbaar hoe men tot de ongeriefinschatting 'licht' is gekomen. Dit was niet vanzelfsprekend, omdat een aanzienlijk deel van deze embryo's in een vergevorderd stadium van de dracht zal komen te overlijden aan de gevolgen van hun genetische modificatie.

Wij hebben de aanvrager verzocht om de projectaanvraag op de bovenstaande punten te verduidelijken. De aanvullingen van de aanvrager hebben vervolgens voldoende inzicht gegeven om tot het besluit te komen om de aanvraag toe te wijzen.

Mocht u vragen hebben over onze beslissing, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

5.1 lid2e

www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag
.....

T: 0800 789 0789

E: info@zbo-ccd.nl