

	Inventaris Wob-verzoek W16-10S								
		wordt verstrekt			weigeringsgronden				
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2015286								
1	Aanvraagformulier				x		x		
2	Projectvoorstel oud				x		x	x	
3	Niet-technische samenvatting oud			x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1 oud				x			x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2 oud			x					
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3 oud			x					
7	DEC-advies				x		x		
8	Ontvangstbevestiging				x		x		
9	Verzoek aanvulling aanvraag 1				x		x		
10	Reactie aanvulling aanvraag 1				x		x	x	
11	Verzoek aanvulling aanvraag 2				x		x		
12	Reactie aanvulling aanvraag 2				x		x		
13	Aanvullende informatie DEC				x		x		
14	Projectvoorstel herzien				x		x	x	
15	Bijlage beschrijving dierproeven 2 oud 2			x					
16	Bijlage beschrijving dierproeven 1 herzien				x			x	
17	Bijlage beschrijving dierproeven 2 herzien			x					
18	Niet-technische samenvatting herzien	x		x					
19	Advies CCD		x						x
20	Beschikking en vergunning				x		x		

19 OKT. 2015

Centrale Commissie Dierproeven

**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.zbo-ccd.nl of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

1 Gegevens aanvrager

- 1.1 Heeft u een deelnemernummer van de NVWA?
Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.

☒ Ja > Vul uw deelnemernummer in 10500 2015 286
☐ Nee > U kunt geen aanvraag doen

- 1.2 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.

Naam instelling of organisatie	Rijksuniversiteit Groningen
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]
KvK-nummer	1179037
Straat en huisnummer	A.Deusinglaan 1, [Redacted]
Postbus	[Redacted]
Postcode en plaats	9713AV Groningen
IBAN	NL80ABNA0446049352
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Rijksuniversiteit Groningen

- 1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	☒ Dhr. ☐ Mw.
Functie	[Redacted]	
Afdeling	[Redacted]	
Telefoonnummer	[Redacted]	
E-mailadres	[Redacted]	

- 1.5 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	☐ Dhr. ☒ Mw.
Functie	[Redacted]	
Afdeling	[Redacted]	
Telefoonnummer	[Redacted]	
E-mailadres	[Redacted]	

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.

(Titel) Naam en voorletters

☐ Dhr. ☐ Mw.

Functie

Afdeling

Telefoonnummer

E-mailadres

- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?

☐ Ja > Stuur dan het Ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag

☒ Nee

2 Over uw aanvraag

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?

☒ Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3

☐ Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Vul uw vergunde projectnummer

in en ga verder met vraag 2.2

☐ Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Vul uw vergunde projectnummer

in en ga verder met vraag 2.3

- 2.2 Is dit een *wijziging* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?

☐ Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier

☐ Nee > Ga verder met vraag 3

- 2.3 Is dit een *melding* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?

☐ Nee > Ga verder met vraag 3

☐ Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?

Startdatum 1 - 10 - 2015

Einddatum 30 - 9 - 2020

- 3.2 Wat is de titel van het project?

Regulering van differentiatie en zelfvernieuwing van hematopoietische stamcellen

- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?

Regulering van differentiatie en zelfvernieuwing van hematopoietische stamcellen

- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?

Naam DEC DEC-RuG

Postadres Antonius Deusinglaan 1, 9713AV Groningen

E-mailadres secrdec.umcg@umcg.nl

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- ☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741 Lege
- ☐ Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- ☐ Via een eenmalige incasso
- ☒ Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

5 Checklist bijlagen

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

6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
 - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
 - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
 - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
 - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam 

Functie 

Plaats Groningen

Datum 15-10-2015

Handtekening 



Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed.
- For more information on the project proposal, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- 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'. 10500
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. University of Groningen
- 1.3 Provide the title of the project. Regulering van differentiatie en zelfvernieuwing van hematopoietische stamcellen

2 Categories

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

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

Hematopoietic stem cells. Most, if not all, tissues in our body contain a small population of stem cells that are essential to remain cellular homeostasis. The frequency and functional activity of these tissue-resident stem cells varies substantially from tissue to tissue. Arguably the best-characterized adult stem

cells are hematopoietic stem cells (HSC) that are normally located in the bone marrow and play an essential role in replenishing all the differentiated blood cell compartments. Although the various mature blood cell types, which include erythrocytes, granulocytes, platelets, macrophages and B- and T-lymphocytes, are morphologically and functionally highly distinct, they are all produced by the same population of HSCs. Seminal experimental transplantation studies in mice have proven that a single HSC is able to restore all blood cell types. The first experimental bone marrow transplantations were carried out in the mid 1950's, and the existence of HSCs was formally proven in the early 1960's. As such, it is safe to consider that HSCs are the founding fathers, or rather mothers, of the field of adult stem cell biology.

Clinical relevance of hematopoietic stem cells. After HSCs were first discovered, it did not take very long to realize their potential clinical relevance, and indeed the first bone marrow transplantations in patients with leukemia were carried out in the 1960's, leading to the Nobel Prize for E. Donnall Thomas in 1990. The clinical use of HSCs has been on the increase ever since. Beyond "classical" bone marrow transplantations, HSCs can now be isolated from cord blood and can be used as carriers for transgenes to treat various genetic deficiencies. Multiple exciting research programs are underway to assess whether it will be possible to generate, in vitro, functional mature blood cells (erythrocytes, platelets) from HSCs, to be used for transfusion/infusion purposes. In addition, lymphoid progeny of HSCs can possibly be used in immune therapy protocols. One very recent avenue of HSC research explores whether it may be possible to generate transplantable HSCs from non-stem cells. Therefore, although the field of HSC biology started in the mid 1950's, the full potential of using and manipulating these rare cells has been far from reached.

Stem cell ageing. Hematopoietic stem cells, as all adult, tissue-resident stem cells, ensure lifelong homeostasis. HSCs replenish blood cells that are lost as a result of trauma/bleeding, but more typically as a result of their age. The lifespan of individual blood cells ranges from several days (granulocytes) to months (erythrocytes) or years (memory B- cells), and mature blood cell compartments must therefore be constantly replenished from more primitive stem- and progenitor cell compartments. Therefore, stem cells can be considered as nature's (or the organism's) own anti-ageing agents; without the continuous, lifelong activity of stem cells, tissues would rapidly and prematurely degenerate. The converse corollary implies that protecting stem cells from the deleterious effects of ageing could contribute to an increased potential to maintain tissue homeostasis during the lifespan of an organism.

As pointed out above, HSCs are arguably the best understood stem cells, and consequently, of all adult stem cell types we have learned most about stem cell ageing in the field of hematology. From a clinical perspective, most patients with hematological conditions are elderly subjects. This holds true for patients suffering from a shortage of blood cells types (anemias, neutropenias, thrombopenias) as well as patients suffering from an excess of blood cells (myeloproliferative syndromes, chronic and acute leukemias). The increased incidence of hematological conditions with advanced age suggests that they may be originating from dysfunctional HSCs, in which the balance between selfrenewal and differentiation has become impaired.

Early serial transplantation studies in the field of HSC ageing have shown that the functional lifespan of HSCs exceeds the lifespan of the original donor mouse. Multiple studies, including our own, documented that, counter-intuitively, with age hematopoietic stem cells increase in number in the mouse. However, we showed that the functional activity of aged HSCs decreases substantially compared to their young counterparts (1). This is evident from single cell transplantation studies, but we also showed, using virally barcoded HSCs, that the clone size of aged HSCs is much smaller than that of young HSCs (2). Serial transplantation studies have documented that aged HSCs have reduced selfrenewal capacity, and display a preference for producing myeloid cells at the expense of lymphoid cells (aged HSCs become myeloid-biased or rather lymphoid-deficient) (reviewed in 3). Several lines of evidence indicate that in elderly humans fewer HSC clones contribute to hematopoiesis compared to young adults, suggesting exhaustion of many HSCs, and clonal dominance of some. Interestingly, very recent data indicate that such clonal dominance may arise from mutations in important 'selfrenewing' genes that confer a proliferative advantage to these cells. These potentially preleukemic cells may then in a time frame of many years, if not decades, accumulate additional mutations before they fully derail and become acutely leukemic. Interestingly, from large-scale sequencing efforts it is now evident that common preleukemic events very often involve genes that can be considered as epigenetic modifiers. Examples include DNMT3a, ID2, ASXL, and EZH2. In fact, my lab was the first to show that Ezh2 plays an important role in murine HSCs selfrenewal, and extends their functional lifespan (4). At the same time, however, it should also be realized that the (stem cell) ageing process is under genetic control. Whereas in experimental

hematology studies C57BL/6 mice are used in >95% of all cases (simply because many transgenic-, reporter-, and congenic strains exist in this background) it is very clear that hematopoiesis in other regular inbred strains of mice is often very different (5,6). Obviously, the same holds true for humans, where the genetic variation is even more diverse than in laboratory mouse strains. The natural genetic variation that is present in the many regular inbred strains that are available underlies impressive, but largely underexplored, physiological variability.

Although it is evident that hematopoietic stem cells lose functional activity during the ageing process, at present, the molecular mechanisms that contribute to hematopoietic stem cell ageing remain poorly understood.

References (from own work):

[REDACTED]

3.2 Purpose

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

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

The overall objective of this project is to identify and understand the molecular and cellular mechanisms that underly normal hematopoietic stem cell aging and its transformation towards leukemia. For this purpose we have established the following aims which we will address in the upcoming 5 years:

1. what are the genetic and epigenetic changes that occur in hematopoietic stem cells as they age?
2. can functioning of young, but particularly aged hematopoietic stem- and progenitor cells be improved by genetic or chemical interference?
3. how do hematopoietic stem cells from distinct mouse genotypes (strains) age differently, and can we identify genetic loci and indeed genes, associated with stem cell ageing?
4. how many stem cells contribute to blood cell formation during the lifespan of an organism?
5. how many stem cells contribute to leukemia, and are different leukemic stem cells differentially sensitive to drugs?

Our lab has 20+ years experience in experimental hematology, and has invested very substantially in the various technical approaches that are required to complete this research project. These include purification protocols of mouse hematopoietic stem cells (ref), single cell transplantations (ref), genetic (retro- or lentiviral) transductions of stem cells (ref), expansion of hematopoietic stem cells (ref), xenotransplantation of human normal and leukemic stem cells in immune-deficient recipients (ref), and transcriptome and epigenome profiling of limited numbers of stem cells (ref). Collectively, the availability

of this methodology ensures feasibility of the proposed studies.

3.3 Relevance

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

The population in many parts of the world, including the Netherlands, is gradually aging. Life expectancy has increased by ~40 years in the last 150 years, and all evidence suggests that a further increase will take place. Maintaining optimal stem cell functioning by preventing decline in their functioning, and may be even restoring stem cell potential in aged cells, will be of significant interest to combat and prevent age-related diseases. As most patients with hematopoietic failures are 65 years or older, the demographic changes in the developed world will lead to a very substantial increase in hematological patients seen in the Hospital. Understanding why hematopoietic stem cells decline in functionality in individuals with advanced age is essential to initiate efforts to design interventions aimed to improve stem cell functioning. Such interventions will consist of efforts to improve tissue homeostasis during ageing, prevent stem cell decline, and using stem cell therapies. The current research proposal aims to identify the molecular machinery that impacts on stem cell aging. Only if we understand how stem cells age, can we hope to begin designing anti-ageing intervention strategies.

3.4 Research strategy

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

The various subaims as specified in paragraph 3.2 will be pursued in parallel and not sequential subprojects, each carried out by different PhD students and postdocs, and supported by a permanent team of experienced research technicians. The research projects will be financed by different funding bodies, and are therefore relatively independent. Yet, the data obtained in the various subprojects are all addressing the fundamental question as to what makes hematopoietic stem cells age, and therefore methodology and results originating from one subproject will feed into other projects.

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

This proposal concerns 5 research questions, detailed below. The animal procedures, which are explained in detail in Appendix 1, 2, and 3, will be employed in all 5 research questions.

1. *what are the genetic and epigenetic changes that occur in hematopoietic stem cells as they age?*

In this project we will isolate hematopoietic stem and progenitor cells from differentially aged mice, from distinct mouse strains. These cells will be characterized molecularly (RNA-Seq and Epi-Seq), and will be tested functionally in in vitro and in vivo experiments. To obtain stem and progenitor cells, donor mice will be aged and sacrificed at various timepoints. For functional testing, isolated cells will be transplanted in syngeneic or immune-deficient recipients, as explained in detail in Appendix 2. Often, these recipient mice will need to be properly conditioned by whole body irradiation. The fate of transplanted cells will then be monitored by assessing chimerism levels in blood, and at time of sacrifice in bone marrow, spleen, and thymus.

2. *can functioning of young, but particularly aged hematopoietic stem and progenitor cells be improved by genetic or chemical interference?* In this project we will overexpress or repress/disrupt, candidate genes which we predict to alter hematopoietic stem cell behavior and assess the effect of such a genetic perturbation on stem cell functioning. In addition, we will culture stem cells in the presence of compounds predicted to alter their functioning and test this in appropriate in vitro and in vivo assays. Animal procedures in this project will include isolating stem cells from donor mice or human cord blood, genetically altering mice or cells using various genome-editing tools, transplanting genetically altered stem cells in recipient mice and monitoring chimerism levels in multiple tissues. Further details of the required animal procedures are explained in Appendix 2 and 3.

3. *how do hematopoietic stem cells from distinct mouse genotypes (strains) age differently, and can we identify genetic loci and indeed genes, associated with stem cell ageing?* In this project we will age mice from multiple distinct genotypes/strains, perform classical lifespan studies, and at specified timepoints

sacrifice otherwise unperturbed donor mice to collect stem cells, used for phenotyping at a molecular and functional level. Animal procedures are explained in Appendix 1, and will involve lifespan studies, and, as outlined above, hematopoietic stem cell transplantation.

4. how many stem cells contribute to blood cell formation during the lifespan of an organism? In this project we will assess how many stem cells contribute to blood cell formation after transplantation. For this purpose, hematopoietic stem cells will be isolated from donor mice or human cord blood, these cells will be lenti- or retrovirally transduced using vectors that are DNA barcoded (and in addition may or may not contain sequences encoding for genes of interest), after which transduced stem cells will be (xeno-) transplanted in properly conditioned recipients. Blood cell chimerism and barcode composition will be evaluated at various time points after transplant (Appendix 2). Upon termination of the experiment, mice are sacrificed to document barcode contribution in different cell types in various hematopoietic organs.

5. how many stem cells contribute to leukemia, and are different leukemic stem cells differentially sensitive to drugs? Similar to the question as to how many stem cells contribute to normal blood cell development, we are also very much interested in how many leukemic stem cells maintain a tumor, ie how clonally diverse are cancer cells in one individual? In these studies we will barcode murine stem cells with a gene of interest, and similar as explained above, assess barcode composition upon transplanting modified cells in syngenic recipients. In addition, we will lentivirally barcode tumor cells from patients, and transplant these xenogeneically in immune deficient recipients. In all recipients chimerism levels will be assessed in blood at repeated time intervals, and at sacrifice in multiple hematopoietic organs (see Appendix 2 for more details).

These various subprojects will be pursued in parallel, and not sequentially. They will all include the same set of animal procedures (Appendix 1, 2, and 3), but the milestones for each project is separate, and milestones are not contingent upon each other. Yet, all projects contribute to the overall aim of the current application, namely to improve our understanding of what makes hematopoietic stem cells age.

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

All projects revolve around the central question as to how blood cell production is regulated and which are the genes that play a central role in this process. If we have found candidate stem cell genes, can we perturb/enhance functioning of hematopoietic stem cells by repressing or overexpressing these genes? Although the coherence between the various projects is therefore obvious, they will not be executed in a predetermined order.

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

Serial number	Type of animal procedure
1	Lifespan studies
2	Stem cell transplantation
3	Genereren nieuwe transgene muizenstammen
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Format

Niet-technische samenvatting

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

1 Algemene gegevens

- | | |
|------------------------------|--|
| 1.1 Titel van het project | Regulering van differentiatie en zelfvernieuwing van hematopoietische stamcellen |
| 1.2 Looptijd van het project | 5 jaar |
| 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) | bloedvormende stamcellen, veroudering, leukemie, stamceltransplantatie |

2 Categorie van het project

- | | |
|--|---|
| 2.1 In welke categorie valt het project.

<i>U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.</i> | ☒ Fundamenteel onderzoek |
| | ☐ Translationeel of toegepast onderzoek |
| | ☐ Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie |
| | ☐ Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier |
| | ☐ Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort |
| | ☐ Hoger onderwijs of opleiding |
| | ☐ Forensisch onderzoek |
| | ☐ Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven |

3 Projectbeschrijving

3.1	Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	Bloedvormende (hematopoietische) stamcellen zorgen er voor dat gedurende ons leven alle verschillende typen bloedcellen in voldoende mate worden aangemaakt. Zij doen dit door zichzelf te vernieuwen en door uit te rijpen tot rode- of witte bloedcel of bloedplaatjes. Hoe het moleculaire proces van uitrijping en zelfvernieuwing van stamcellen verloopt is slechts zeer beperkt begrepen. Ontsporingen van dit proces kunnen leiden tot een tekort aan bloedcellen, hetgeen zich kan manifesteren als bloedarmoede of afgenomen afweer, of juist tot een overschot aan bloedcellen, culminerend in leukemie. Het doel van dit project is om te begrijpen hoe stamcellen op moleculair nivo de juiste keuzen maken om zich zelf te vernieuwen dan wel uit te rijpen, en hoe gedurende veroudering dit proces moeizamer verloopt.
3.2	Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?	Een beter begrip in de mechanismen die ten grondslag liggen aan bloedcelvorming zal leiden tot een beter begrip omtrent het ontstaan van leukemieën, zal kunnen leiden tot methoden om stamcellen buiten het lichaam om te vermeerderen, zal kunnen leiden tot strategieën om stamcelveroudering te voorkomen of zelf om te keren, en maakt het mogelijk om verschillende typen uitgerijpte bloedcellen buiten het lichaam om te genereren. Gezamenlijk zal deze kennis patiënten die bloedziekten ontwikkelen ten goede komen.
3.3	Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?	Voor dit onderzoek worden muizen gebruikt. Op grond van de omvang van onze onderzoeksactiviteiten in de afgelopen 5 jaar, verwachten wij in de komende 5 jaar ~1500 muizen per jaar te gebruiken. Het totaal aantal dieren zal dan 7500 zijn in de periode 2015-2020
3.4	Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?	De meeste proefdieren zullen worden gebruikt als stamceldonor of stamcelontvanger. De eerste categorie dieren wordt, op verschillende leeftijden, getermineerd zonder enige verdere behandeling. De negatieve gevolgen voor het welzijn van deze stamceldonoren blijft derhalve erg beperkt. Stamcelontvangende proefdieren worden geconditioneerd met chemotherapie of bestraling om hun eigen bloedvormende systeem te vernietigen of te verzwakken. De negatieve gevolgen voor deze, vaak bestraalde, muizen zijn derhalve een tijdelijk verlies van lichaamsgewicht en een toegenomen ontvankelijkheid voor infectie (kort na bestraling, voortkomend uit tijdelijke verminderde bloedcelproductie). In sommige experimenten zullen stamcellen worden getransplanteerd waarin door middel van genetische manipulatie genen worden geactiveerd of juist onderdrukt. In voorkomende gevallen kan dit leiden tot leukievorming. De negatieve gevolgen voor het welzijn van getransplanteerde dieren is over het algemeen gering tot matig, tenzij leukemie optreedt.
3.5	Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?	Muizen: Gering 25%, matig 74%, ernstig 1%. Deze inschatting is gemaakt op grond van gegevens uit de afgelopen 5 jaar. Aangezien de aard van de in deze aanvraag voorgestelde experimenten niet wezenlijk afwijkt van die van de voorgaande jaren voorzien wij geen verschuiving in deze verdeling.
3.6	Wat is de bestemming van de dieren na afloop?	dieren worden gedood in het kader/na afloop van de proef

4 Drie V's

4.1 Vervanging Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdier vrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.	De functie van bloedvormende stamcellen kan slechts worden vastgesteld door deze te transplanteren in dieren waarin de eigen bloedcelvorming is verstoord. Hoewel uitgebreide in vitro en andere moleculaire analyses ook zullen worden gebruikt ter nadere karakterisatie, kan slechts het uitlezen van het vermogen van getransplanteerde stamcellen tot bloedcelvorming na vivo transplantatie de functie van de testen stamcellen definitief bepalen. Ook voor in vitro experimenten zullen eerst primaire stamcellen van stamceldonoren moeten worden geïsoleerd. Hoewel wij in ons lab ook geregeld gebruik maken van cellijnen, zijn juist in cellijnen het zelfvernieuwings- en differentiatieproces verstoord, en zijn deze dus beperkt toepasbaar.
4.2 Vermindering Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.	Voor iedere proef zal een inschatting worden gemaakt van de grootte van het te verwachten in vivo effect, en op grond daarvan zal het aantal benodigde dieren worden bepaald. Het is van belang om op te merken dat ons lab een meer dan 20-jarige ervaring heeft in het uitvoeren van experimenteel hematologische studies en beenmergtransplantaties, zodat in het algemeen een zeer goede inschatting gemaakt kan worden van het aantal benodigde dieren. Tevens zal, voordat over gegaan wordt tot in vivo stamceltransplantaties, eerst uitgebreid in vitro onderzoek plaats vinden met de gemanipuleerde test stamcellen, zodat ook op grond hiervan een inschatting kan worden gemaakt van het te verwachten effect.
4.3 Verfijning Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diersoort(en) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.	De muis is in het veld van de experimentele hematologie het enige proefdiermodel dat gebruikt wordt. Onze eigen groep heeft 20+ jaar ervaring met dergelijke studies. Bloedcelvorming in de muis vertoont grote gelijkenissen met die van de mens.
Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen	Dieren die gebruikt zullen worden als stamceldonor zullen weinig tot geen ongerief ervaren. De dieren die als stamcelontvanger worden gebruikt ontvangen voorafgaand en gedurende enige tijd na bestraling profylactisch antibiotica. Na transplantatie worden dieren dagelijks gemonitord, waarbij vooral gelet wordt op gewichtsafname, lichaamshouding en gedrag. Pijnbestrijding is niet noodzakelijk. Dieren die gedurende 2 weken progressief gewichtsverlies vertonen zullen, als ook

[

voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.

andere signalen duiden op ongerief (gedrag/houding) worden getermineerd. Er zal extra worden gelet op de ontwikkeling van leukemieën, door middel van herhaaldelijk bloedafname.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10500	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Rijks Universiteit Groningen	
1.3	List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
		1	Lifespan studies

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

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

Lifespan studies. The primary outcome parameter of these experiments is to record lifespan measurements of different strains of mice. Secondary outcome parameters of these experiments are the correlation these lifespan statistics with functioning of the hematopoietic stem and progenitor cell pool. We will test the hypothesis that long-lived mouse strains have superior stem cell functioning compared to short-lived strains. Studies will start with cohorts of (recombinant) inbred strains of mice, from which at selected intervals a small number of mice will be terminated to evaluate changes in frequencies and

functioning of the hematopoietic stem cell pool.

In order to obtain hematopoietic stem and progenitor cells from mice of different ages, mice will be aged without further intervention. At selected timepoints animals will be sacrificed and cells and tissues will be isolated.

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

Animals will be aged without any intervention. Cohorts of mice will be sacrificed between 4-6 months of age, 12-14 months of age, and 22-26 months of age.

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

For each strain we will start an aging cohort of approximately 40 individual mice. At the three timepoints indicated above 5 mice will be removed from the cohort. We will need 5 mice per strain and timepoint in order to be able to obtain a sufficient number of hematopoietic stem cells. We are typically able to purify by flowcytometry ~ 10,000 hematopoietic stem cell from an individual mouse. To perform biochemical, genetic, and functional studies we need (at current) at the very least ~50,000 stem cells. From the cohort of 40 mice, 25 mice will remain to collect lifespan measurements. Typical lifespan studies in the literature use somewhat higher numbers of mice per cohort (ranging between 30-50 mice per experiment). However, in addition to wildtype C57BL/6 and DBA/2 mice, we plan to age so-called recombinant inbred BXD mice. The use of these mice allows for particular statistical considerations, explained below.

B. The animals

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

We plan to use female C57BL/6 and DBA/2 mice, and a large panel of so-called BXD recombinant inbred mice. The family of BXD strains is commercially available and comprises of ~150 fully inbred strains in which just over 5.2 million maternal C57BL/6 and paternal DBA/2 common sequence variants (SNPs, indels, CNVs, inversions) segregate. As each of the 150 strains is fully inbred, the collective family constitutes a permanent genetic reference panel, of which each strain/genotype can be repeatedly phenotyped. As we propose to embark on ageing studies, the BXD family enable us to age entire cohorts of genetically identical individuals—impossible with more classical F2 generation progeny, where each individual mouse is unique and no mean lifespan studies can be executed. All mice used will be either purchased from the Jackson Laboratory, or will be shared from collaborating scientists.

As pointed out above, we aim to establish cohorts of 40 mice from 100 strains selected from the available cohort of 150 strains. Five mice will be sacrificed at an age of 3-4 months, another 5 will be sacrificed at 12-14 months of age, 5 mice will be used at an age of 24-26 months, and the remaining (~25) mice will be used to establish lifespan/survival statistics. Some strains may not live to the age of 2 years, and those will be sacrificed when only 5 mice from the cohort remain. We plan to use female mice only. Although there is no reason to suspect that hematopoiesis is fundamentally different in males vs female mice, for logistical reasons (to avoid sex-mismatched stem cell transplants) we have historically only used female mice. There are sex-differences in lifespan, but there is no reason to assume that these are caused by differences in stem cell behavior.

The survival curves will be established with relatively few mice (on average 25 female mice/strain, but sometimes fewer). Although this is a lower number than used in studies where survival statistics for genetically modified mice are compared with wild type mice, in the BXD panel we will actually be able to compare for any of the 5.2 million genetic variants that segregate in all 100 strains whether and which the B6 or DBA allele is associated with differences in lifespan. Therefore, by pooling mice with identical haplotypes at a given locus we have ~ in total 50 strains and ~ 25 mice/genotype to test for lifespan effects, increasing the statistical power substantially, and allowing us to use 'only' 25 strains for lifespan measurements.

In total we estimate to use 4100 mice for these studies (100 BXD strains x 40 animals/strain = 4000 mice + 50 C57BL/6 + 50 DBA/2 parental strains)

C. Re-use

Will the animals be re-used?

☒ No, continue with question D.

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

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

☐ No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: We will not be able to replace in vivo stem cell functioning experiments with in vitro assays, as stem cell activity is defined by functioning of stem cells after transplant.

Reduction: The use of BXD mice, in which only 2 alleles segregate at any polymorphic locus, allows to perform lifespan studies with relatively few mice per strain. The BXD mice are a perfect genetic reference panel to perform the proposed studies. A small collection of these mice has been used by us before and has led to multiple high profile publications, documenting the power of the approach. We will use the minimal number of mice needed to obtain sufficient biological material (hematopoietic stem cells).

Refinement: By pooling mice with identical haplotypes at a given locus, we have ~ in total 50 strains and ~ 25 mice/genotype to test for lifespan effects, increasing the statistical power substantially, and allowing us to use 'only' 25 strains for lifespan measurements.

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

Animals will be housed in IVC racks without any intervention, so suffering will be minimal, and most often absent Mice will be carefully monitored using the monitoring system designed for aging mice in the Mouse Clinic for Cancer And Aging (MCCA) within our institute.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

We have established collaborations with the two labs that are also using the BXD mice [REDACTED]) to avoid pertinent duplication.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

☒ No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

☒ No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☐ No > Continue with question I.

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

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

Mice that develop discomfort in the course of the natural ageing process will be removed from the cohort

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Mice will be aged naturally, and are therefore expected to develop various age-related symptoms.

Explain why these effects may emerge.

Due to natural aging

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

Mice will be inspected thoroughly throughout their lifespan and overt diseased animals will be removed from the cohort.

J. Humane endpoints

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

☐ No > Continue with question K.

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

We will monitor persistent loss of weight at monthly intervals, and assess deviant behavior, cachexia and tumor development according to the system set up for MCCA.

Indicate the likely incidence.

For aged mice the incidence of age-associated pathology is (obviously) high. We will implement a careful monitoring routine, most notably towards the end of their natural lifespan. This will involve individual monitoring of deviant behavior, cachexia and tumor development. Mice with visible tumors, mice that display progressive weight loss, and mice which show aberrant motor behavior will be euthanized. These endpoint criteria are difficult to define quantitatively, as the normal aging process is associated with highly variable phenotypes, and require individual monitoring/decision making. We will consult very regularly with the veterinarian, which will allow us to sacrifice most animals prior to the onset of the humane endpoints

K. Classification of severity of procedures

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

mild and non-recovery

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No > Continue with Section 3: 'signatures'.

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

Harvesting viable bone marrow cells requires sacrificing of donor mice.

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

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

☒ Yes



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10500	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Rijks Universiteit Groningen	
1.3	List the serial number and type of animal procedure.	Serial number 2	Type of animal procedure Stem cell transplantation

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

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

Stem cell transplantation. The overall primary outcome of the animal procedures described in this Appendix is to assess the functionality of hematopoietic stem cells. This functionality essentially measures how well transplanted test stem cells contribute to blood cell formation. Assessing the functional activity of hematopoietic stem cells requires the transplantation of such cells into the bloodstream of a recipient animal. Pretreatment of the recipient can vary from untreated, mildly treated to heavily treated (lethally irradiated) depending on the research question of the experiment. In most case, recipients are used

whose endogenous hematopoietic system is (temporarily) defect such that infused stem cells have a competitive advantage over endogenous stem cells. Transplanted stem cells will lodge to the bone marrow and re-establish hematopoiesis in the recipient. Transplanted stem cells can be obtained from fetal liver, cord blood, bone marrow, spleen or peripheral blood, and can be freshly isolated, in vitro cultured, or genetically modified. Transplanted stem cells can originate from same strain donor mice (and thus transplanted syngeneically in properly conditioned recipient mice), can originate from different strains (and thus be transplanted in an allogeneic settings), or can originate from human samples (and then be xenogeneically transplanted in immune deficient recipients).

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

Stem cell harvest: Hematopoietic stem cells can be harvested from fetal liver, bone marrow, spleen, or peripheral blood. Harvesting of hematopoietic stem cells requires sacrificing donor mice (or in cases where stem cells are isolated from fetal livers, pregnant mothers) that are otherwise unperturbed. In some experiments hematopoietic stem cells will be (re-)isolated from mice that previously received a stem cell transplantation.

Stem cell transplantation:

Recipient mice will be prepared for stem cell transplantation using total body irradiation or chemotherapy. The dose of TBI or chemotherapy will depend on the genetic background of the recipient. In some experiments we will use immune deficient hosts, which typically are radiosensitive and will therefore receive a low dose of radiation. For regular strains of mice (we will most often use C57BL/6 mice) the radiation dose needs to be much higher to efficiently deplete endogenous stem cells. We will also (explore the) use of strains of mice that do not require any irradiation or other pretreatment. Irradiation is a very effective way of host conditioning and will be (and has been) the preferred method. However, in some instances it may be useful to avoid radiation and administer recipient mice with chemotherapy, such as busulfan, or cyclophosphamide. This is particularly relevant if we want to avoid radiation of non-hematopoietic organs, such as liver, brain, and intestine, which cannot be avoided during total body irradiation. The protocol to condition mice with these cytotoxic drugs is well established (for example: *Down JD, Boudewijn A, Dillingh JH, Fox BW, Ploemacher RE. Br J Cancer. 1994 Oct;70(4):611-6. Relationships between ablation of distinct haematopoietic cell subsets and the development of donor bone marrow engraftment following recipient pretreatment with different alkylating drugs*) Within 24 hrs after conditioning mice will receive a stem cell transplantation. This requires mice to be anesthetized and involves intravenous administration of a volume of ~100-200 µl, containing the stem cells. After transplantation mice will be prophylactically treated with antibiotics for a period of 2 weeks. After 2 weeks the hematopoietic system has typically recovered and antibiotic treatment can be suspended. In some cases it has been shown that transplantation directly into the bone marrow generates the best results, e.g. in the xenogeneic setting. To this end, a smaller volume (20 µl) will be injected directly into the femur of anaesthetized recipient mice.

To assess the functioning of the transplanted stem cells we will collect small volumes of peripheral blood at regular intervals, typically every 4-6 weeks. Mice will mostly be analyzed for at least 20 weeks, but some experiments may require longer periods of follow up with a maximum of one year. In some experiments bone marrow biopsies will be taken from previously transplanted recipients. This requires puncturing the femur and isolating a small volume of bone marrow cells (~50 µl) from a fully anesthetized mouse.

In some experiments mice will be transplanted with stem cells that have been genetically manipulated. In some instances such genetically manipulated stem cells originate from genetically modified donor mice. In most cases in which genetically altered stem cells will be transplanted to recipient mice the stem cells have been transduced with retro- or lentiviral vectors which encode for a gene of interest or carry a DNA tag (barcode) to allow for clonal analysis.

Administration of compounds: In some experiments the genes that were manipulated in transplanted stem cells may cause leukemia in the recipient. In other cases we will transplant leukemic cells, either from murine or from human origin. In these experiments recipient mice may be treated with compounds that affect disease progression. Typically, these compounds are drugs that may affect cell proliferation, either existing or novel. In addition, in some experiments mice may be treated with novel growth factors, cytokines, hormones, specific inhibitors or other biological compounds. The route of administration of compounds will vary from experiment to experiment, but may include subcutaneous, intraperitoneal, and intravenous administration. For

subcutaneous administration requiring a stable, permanent release of the compound, implantable osmotic mini-osmotic pumps may be used.

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

In most experiments we will be comparing 2 groups of mice that have received 'control' or 'test' stem cells. The size of the effect is impossible to predict in most experiments, at least when we carry out a specific experiment for the first time. Our approach has been and will be to perform first a pilot experiment in which we have 5 mice in each experimental group. Depending on the size of the effect we repeat the experiment at least twice and maximally 4 times, using completely independently isolated test stem cells. The number of recipient mice can then be calculated based upon the observed effect in the pilot. This strategy will allow us to early detect biologically relevant effects, while at the same time minimizing the number of mice used as recipients.

B. The animals

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

As recipients we will only use mice, albeit of multiple strains. These include wild type C57BL/6 mice, congenic C57BL/6.CD45.1 mice, C57BL/6 x C57BL/6.CD45.1 F1 mice, C-kit deficient W/W^v mice, C-kit deficient W/W^v.CD45.1 mice, immune deficient NSG mice, and potentially other immune deficient strains. Most mice will be purchased from commercial vendors, some strains will be bred in the local UMCG animal facility, and some strains will (at least initially) be obtained from collaborating labs.

Recipient mice will be young adults, typically between 10 weeks and 4 months old. We prefer to use female mice as we transplant donor stem cells in multiple recipient models, we want to avoid the confounding effects of sex-mismatch. However, at the same time we will make use of available mice most optimally, so if at instances only male mice are available, we will use these.

In the last 5 years we have carried out ~1000 stem cell transplantation per year, in which on average some 10 different genes or conditions were tested (ie 100 recipient mice are required to test the activity of one stem cell gene, compared to controls). Based upon the research objectives explained in the main project proposal form, we do expect that the collective research activities of our lab in the upcoming 5 years will be similar to what we have done in the last 5 years, and we therefore expect to evaluate some 50 different genes/conditions in a timeframe of 5 years. We typically transplant test stem cells in different concentrations and conditions to 80 primary or secondary recipient mice, and compare this with effects in 20 control mice. This results in the anticipated use of 100 recipient mice x 10 test conditions = 1000 recipient mice per year. Over a period of 5 years we anticipate therefore to use 5000 recipient mice.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

☒ No, continue with question D.

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

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

☐ No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: Functional studies in the field of experimental hematology rely essentially exclusively on mice, and this species is therefore the preferred model system.

Reduction: The overall number of animals is based on the track record of the lab in the last 5 years. Due to inherent biological variation we typically transplant ~5 mice per tested stem cell population. This number allows for detection of a biological meaningful effect in a single experiment.

Refinement: For the various transplantation scenarios we will need genetically distinct strains of mice. Most experiments will use congenic recipients, but in cases where human cells will be transplanted we will use immunodeficient hosts. Immunodeficient hosts may also be used for genetically diverse donors (BxD recombinant inbred) which need to be compared in a common recipient strain. Stem cell transplantations have been carried out by my lab for over 15 years; although each particular experiment is a little different, and the exact experimental protocol varies (for example, with respect to cell dose, whether competitor cells are cotransplanted etc), the basic procedure is routine and follows internationally acceptable strategies.

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

Transplanted mice that are pre-irradiated with a high dose, will be kept on antibiotic prophylaxis in the drinking water from one day before irradiation until 10-14 days after the transplant, during a time when the animals are susceptible to infections due to a low white blood cell count (as a result of the conditioning regime, ie total body irradiation or high dose chemotherapy). To refine these experiments further, recipient mice are housed in IVC cages until they have recovered from the irradiation and transplantation procedures and are also carefully monitored (weighed and observed for activity or other symptoms of illness). No other measurements are typically taken, nor are these necessary. The large majority of animals will not suffer from pain or fear. Mice that develop overt leukemia will be sacrificed, or will be treated with chemotoxic drugs in some experiments before they are expected to become sick. The administration of these compounds is typically well tolerated if the appropriate dosing is used, and is not associated with pain or fear.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

Obviously, we are very well aware of what sorts of experiments our competitors, elsewhere in the world, are performing. We will only embark on novel stem cell transplantations if, to the best of our knowledge, these or very similar experiments are not being carried out elsewhere.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

☒ No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

☒ No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☐ No > Continue with question I.

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

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

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

Anaesthesia, Isoflurane/air/oxygen is used for iv injections, blood draws and sacrifice by cervical dislocation.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

fatigue, increased susceptibility to infections, weight loss, diarrhea

Explain why these effects may emerge.

Shortly after total body irradiation mice will display low blood cell counts. If the transplanted stem cells do not function properly, or delayed, animals will present with low red blood cell counts and platelets, which may lead to further anemia. The reduction of white blood cell counts renders mice susceptible to infections. To refine these experiments, recipient mice are housed in IVC cages until they have recovered from the irradiation and transplantation procedures and are also carefully monitored. In some experiments mice may develop leukemia. Leukemia is also associated with a loss of functional mature blood cells, and the symptoms are therefore not different than described above. Mice will be kept for no longer than 12 months post-transplant.

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

A prophylactic administration of antibiotics typically is very effective in preventing infections. In our long history of stem cell transplantation we lose animals only very rarely. Mice that develop overt leukemia will be euthanized.

J. Humane endpoints

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

☐ No > Continue with question K.

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

cachexia, lethargic behavior

Indicate the likely incidence.

Less than 5% in experiments in which wild type stem cells are transplanted. In experiments in which genetically modified, or primary leukemic stem cells are transplanted, this incidence is obviously much higher, and can be up to 100%

K. Classification of severity of procedures

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

mild in 90% of the proposed experiments, moderate in the remaining 10%, donors will be in the category 'non-recovery'

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No > Continue with Section 3: 'signatures'.

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

Mice will not be killed after the stem cell transplantation as such, but at the end of the experiments we will also assess how the transplanted stem cells perform in the bone marrow, which requires sacrificing mice.

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



Bijlage

Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website www.zbo-ccd.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10500				
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Rijksuniversiteit Groningen				
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	<table><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr><tr><td>3</td><td>Genereren nieuwe transgene muizenstammen</td></tr></table>	Volgnummer	Type dierproef	3	Genereren nieuwe transgene muizenstammen
Volgnummer	Type dierproef					
3	Genereren nieuwe transgene muizenstammen					

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Als onderdeel van dit voorstel zullen we diverse nieuwe muizenstammen genereren en in voorkomende gevallen bestaande en nieuwe allelen combineren tot nieuwe transgene stammen. Het ligt in de verwachting dat in onze studies nieuwe kandidaat stamcelgenen zullen worden geïdentificeerd. In de meeste gevallen zal de expressie van dergelijke genen worden gestimuleerd of geremd door virale overexpressie/repressie. Echter, in voorkomende gevallen kan het noodzakelijk zijn om genetisch gemodificeerde muizen te genereren waarin geïnterfereerd wordt in de expressie of coding sequentie van dergelijke kandidaat stamcelgenen. Tevens kan het van belang zijn om nieuw ontwikkelde of reeds bestaande genetisch gemodificeerde muizen te kruisen met transgene dieren waarin bekende genen zijn gemanipuleerd, om zodoende nieuwe combinaties van allelen te bestuderen. Het genereren van nieuwe genetisch gemodificeerde

muizenstammen zal slechts worden uitgevoerd om de functionele relevantie van nieuw ontdekte stamcelgenen te onderzoeken. In de meeste gevallen zullen deze nieuwe genen voortkomen uit de studies beschreven in bijlage 1. Echter, in voorkomende gevallen kunnen ook andere kandidaatstamcelgenen, voortkomend uit studies van anderen, worden gemodificeerd.

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

In samenwerking met de UMCG Mouse Clinic zullen nieuwe genetisch gemodificeerde muizenstammen worden gegeneerd. In de overgrote meerderheid van de gevallen zullen de nakomelingen geen ongerief vertonen en na 2 generaties aangehouden worden als 'fok zonder ongerief'. Hematopoietische stamcellen van de gegeneerde dieren zullen worden geïsoleerd en getransplanteerd in wildtype ontvangers. In de meerderheid van de gevallen dienen de mutaties geïnduceerd te worden met drugs (docycycline, tamoxifen, PolyI/PolyC) en is er geen direct fenotype te verwachten in de nieuw te genereren stammen.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

Per genotype zetten we over het algemeen twee fokparen in, die we elk twee nestjes laten krijgen. Hiermee is een voldoende aantal dieren te krijgen om de juiste genotypes af te leiden en krijgen we voldoende dieren om met grote zekerheid vast te stellen dat de nakomelingen geen ongerief ondervinden. Per nieuw te genereren stam vragen we daarom 4 nesten (2 nesten per genotype, 2 generaties) nakomelingen met gemiddeld 12 pups, dus 48 dieren aan. Ongerief zal beoordeeld worden op vele niveaus, t.w. algemene conditie, groei, vacht, houding en activiteit, kleur, eventuele andere zichtbare afwijkingen (GA Rodent Welfare Assessment zoals in gebruik door de CDP).

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levenstadia. Onderbouw deze keuzes.

Alle experimenten zullen worden uitgevoerd op transgene muizen uit eigen fok; voor dit type dierproef zullen volwassen muizen gebruikt worden. Gedurende de komende 5 jaar verwachten we maximaal 10 nieuwe genotype combinaties te genereren. Per genotype hebben we 48 muizen nodig, we vragen dan hiervoor ook $10 \times 48 = 480$ dieren aan.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

☐ Nee

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging: Het gebruik van de muis zal in onze studies niet vervangen kunnen worden door in vitro proeven.

Vermindering: Voordat overgegaan zal worden tot het genereren van nieuwe transgene muizenstammen zal eerst uitgebreid onderzocht worden of een dergelijke mutante muizenlijn niet reeds eerder elders werd gemaakt. Slechts indien dit niet het geval is, of de reeds bestaande muizenlijn niet geleverd kan worden, zal overgegaan worden tot het genereren van nieuwe muizenlijnen.

Verfijning: Als muizenlijnen intrinsiek ongerief hebben, zullen we in de meeste gevallen ervoor kiezen deze lijn niet aan te houden (vermindering). Feitelijk zijn de 2 generaties van nieuwe genotypes 'pilots' om te bepalen of het zinvol is om een stam aan te houden. Verder leidt deze aanpak tot verfijning: als we ongerief constateren en het wetenschappelijk belang zwaarder weegt dan het ongerief in de stam, kunnen we er wel voor zorgen dat het ongerief tot een minimum beperkt blijft door verfijning toe te passen afhankelijk van het ongerief (aangepaste omgeving, andere kinetiek bij het fokken van de dieren, etc.)

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

Dieren zullen gedurende 2 generaties nauwgezet gevolgd worden op eventueel ongerief en we zullen verfijning toepassen, dan wel de foklijn stoppen bij eventueel ongerief.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

Deze proeven zullen nog niet eerder zijn uitgevoerd. Hiervoor voeren we een uitgebreide zoekopdracht op PubMed uit en daarnaast spreken we met onze diverse collega's die dit soort modellen ontwikkelen

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

☒ Nee

☐ Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

☐ Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

☒ Nee > Ga verder met vraag I.

☐ Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

☐ Ja

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Omdat het nieuwe genotypes betreft, kan er ongerief ontstaan. Onze muizenstammen hebben mutaties die leiden tot mogelijk verstoorde hematopoïese. Als er in de foklijnen ongerief zou optreden, dan zou dit komen uit het eventueel ontstaan van leukemie, of versnelde veroudering van het weefsel of degeneratie van het weefsel. In de meerderheid van de gevallen dienen de mutaties geïnduceerd te worden met drugs (docycycline, tamoxifen, PolyI/PolyC) en is er geen fenotype te verwachten in de nieuw te genereren stammen. Door onze voorgaande kennis kunnen we wel heel goed inschatten of een stam mogelijk ongerief zal ondervinden. In dergelijke gevallen zullen we dit ook van te voren bespreken met de IvD.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Mogelijk oorzaken zijn weefseldegeneratie en versnelde veroudering door stamcelverlies, of het ontstaan van leukemie.

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

In alle gevallen zullen 2 generaties van de nieuwe genotypes nauwgezet gevolgd worden voor ongeveer 3 maanden (generatietijd). In gevallen waar we op basis van voorgaande kennis ongerief verwachten, zullen we dit van te voren bespreken met de IvD.

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Het is niet geheel uit te sluiten dat sommige nieuw te genereren genotypes ernstige (ontwikkelings)defecten zullen laten zien. In geval dieren dergelijke afwijkingen laten zien, ernstige groeiachterstand hebben of ineens gewicht gaan verliezen, zullen dieren worden opgeofferd. Ongerief zal beoordeeld worden op vele niveaus, t.w. algemene conditie, groei, vacht, houding en activiteit, kleur, eventuele andere zichtbare afwijkingen (GA Rodent Welfare Assessment zoals in gebruik door de CDP). Verder zullen dieren worden opgeofferd indien lethargisch, of als ze ernstige vecht- bijt- of krabwonden hebben in overleg met

de biotechnici van de fokunits.

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

<5%. De meeste genetisch gemodificeerde muizen waarin de expressie van stamcelgenen is veranderd laten slechts een fenotype zien nadat stamcellen zijn getransplanteerd, en niet in een naïeve -ongetransplanteerde- toestand

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

Mild. In voorkomende gevallen zouden er uitschieters kunnen zijn naar 'matig'. Indien dat het geval is zal de fok worden gestopt

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

☐ Nee > Ga verder met de ondertekening.

☒ Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Dieren worden gedood om er primaire cellen/weefsels uit te isoleren.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

☒ Ja

Format DEC-advies

Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de bijbehorende toelichting, waarin elke stap in het beoordelingsproces wordt toegelicht

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: (Interne RuG code 8023)
2. Titel van het project Regulering van differentiatie en zelfvernieuwing van hematopoietische stamcellen
3. Titel van de NTS Regulering van differentiatie en zelfvernieuwing van hematopoietische stamcellen
4. Type aanvraag:
 - ☒ nieuwe aanvraag projectvergunning
 - ☐ wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam: DEC-RUG
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
[REDACTED]
 - mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ☐ ontvangen door DEC: 24-09-2015
 - ☐ aanvraag compleet: 24-09-2015
 - ☐ in vergadering besproken: 06-10-2015
 - ☐ anderszins behandeld: 02-10-2015, 08-10-2015
 - ☐ termijnonderbreking(en) van / tot: 02-10-2015 tot 05-10-2015
 - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: n.v.t
 - ☐ aanpassing aanvraag: 05-10-2015
 - ☐ advies aan CCD: 13-10-2015
7. Eventueel horen van aanvrager n.v.t.
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden

- Aanwezige (namens) aanvrager
- Strekking van de vraag / vragen
- Strekking van het (de) antwoord(en)
- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag

8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: 02-10-2015
- Strekking van de vraag / vragen
- *Vragen/opmerkingen t.a.v. projectbeschrijving*
-
- Punt 3.4.3 aanvraagformulier; hier staat een opmerking dat de mogelijkheid dit onderzoek te doen afhangt van het eventueel toekennen van beurzen om dit onderzoek te doen. Dit lijkt niet direct relevante informatie. Nergens wordt om een financiële dekking van de voorgestelde experimenten gevraagd.
- Ter ondersteuning van uw aanvraag is het raadzaam referenties van eigen werk te includeren in de aanvraag.
- Onduidelijk is of er een onderscheid gemaakt wordt tussen mannelijke of vrouwelijke dieren. Kunt u dit beter aangeven?
- Bij A. 'General design and primary outcome parameters' zijn de experimenten en uitkomstparameters niet erg gedetailleerd beschreven. Hierdoor is het aangevoerde benodigde dieren aantal moeilijk navolgbaar. Kunt u waar mogelijk hier meer experimenteel detail in aanbrengen?
- *Vragen t.a.v. Bijlage 1*
- Veroudering in muizen kan gepaard gaan met diverse problemen, derhalve zouden humane eindpunten helderder gedefinieerd moeten worden.
-
- *Vragen t.a.v. Bijlage 2*
- Dieraantallen is gebaseerd op aantallen transplantaties uitgevoerd in verleden. Een inschatting op grond van aantal te testen genen of stoffen is concreter. Kunt u, op grond van dit laatste, een onderbouwing geven voor de aantallen uit te voeren transplantaties?
- *Vragen t.a.v. Bijlage 3*
- Hier gaat het over het genereren van transgene dieren waarin nieuw geïdentificeerde stamcelgenen worden geïntroduceerd of gemuteerd. De te modificeren genen zijn niet erg concreet. Volgen de genen allemaal uit bijlage 1 of ook andere bronnen? Kunt u dit concreter maken?
- Datum antwoord: 05-10-2015
- Strekking van het (de) antwoord(en):

De gevraagde verduidelijkingen zijn aangebracht en verwerkt in de project beschrijving en bijlages. De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag

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

- Aard expertise
- Deskundigheid expert
- Datum verzoek
- Strekking van het verzoek
- Datum expert advies
- Expert advies

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet) Ja
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag
3. De DEC is competent om hierover te adviseren Ja
4. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering NVT

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:

X uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord

2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) is / zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling(en) JA
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een substantieel belang
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project JA
5. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. De keuze hiervoor is voldoende wetenschappelijk onderbouwd NVT
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd

Bijlage1-10: JA

7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen NEE
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat. De aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om, bij wettelijk vereist onderzoek, te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt

Per voorgestelde dierproef in de diverse bijlagen is het aantal dieren statistisch voldoende onderbouwd. Aangezien het doel van dit onderzoek het identificeren van genen is die betrokken zijn bij hematopoietische stamcelveroudering en hun rol het in eventuele ontstaan van leukemie, is op voorhand het aantal te onderzoeken genen niet vast te stellen.

Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. DE AANVRAAG IS VOLLEDIG IN OVEREENSTEMMING MET DE 3V's Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten NVT

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

De achtergrond van deze projectbeschrijving is een heldere uiteenzetting van aanleiding, achtergrond en context van het voorgestelde onderzoek. Het medisch en maatschappelijk belang van de voorgestelde dierproeven is helder.

D. Ethische afweging

Dit onderzoek zal fundamentele inzichten verschaffen hoe veroudering tot depletie van of veranderingen in hematopoietische stamcellen kunnen leiden met o.a. leukemie als gevolg. Alvorens mogelijke therapieën te kunnen ontwikkelen is een fundamenteel begrip van het effect van veroudering op

hematopoietische stamcellen noodzakelijk. Op termijn kan het project voordelen opleveren voor de mens en in bredere zin voor de samenleving.

De doeleinden van het project rechtvaardigen daarom het voorgestelde gebruik van dieren; de schade in de vorm van lijden, pijn en angst bij dit aantal dieren wordt gerechtvaardigd door het verwachte resultaat. Het onderzoek is uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord en – zoals hierboven vermeld – worden de 3 V-s adequaat in acht genomen.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan
9713 AV GRONINGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD105002015286

Bijlagen

2

Datum 21 oktober 2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 19 oktober 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD105002015286. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10500
Naam instelling of organisatie: Rijksuniversiteit Groningen
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 1179037
Straat en huisnummer: A. Deusinglaan [REDACTED]
Postcode en plaats: 9713 AV GRONINGEN
IBAN: NL80ABNA0446049352
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: Rijksuniversiteit Groningen

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum: 1 oktober 2015
Geplande einddatum: 30 september 2020
Titel project: Regulering van differentiatie en zelfvernieuwing van hematopoietische stamcellen
Titel niet-technische samenvatting: Regulering van differentiatie en zelfvernieuwing van hematopoietische stamcellen
Naam DEC: DEC-RuG
Postadres DEC: Antonius Deusinglaan1, [REDACTED] 9713 AV Groningen
E-mailadres DEC: secrdec.umcg@umcg.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 741,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Er zijn geen bijlagen ontvangen.

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Plaats: Groningen
Datum: 15 oktober 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan

9713 AV GRONINGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD105002015286

Bijlagen

2

Datum 21 oktober 2015

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 21 oktober 2015

Vervaldatum: 20 november 2015

Factuurnummer: 15700286

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD105002015286	€ 741,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A Deusingelaan 1

9713AV Groningen

**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.zbo-ccd.nl

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
AVD105002015286

Uw referentie

Bijlagen

Datum 1 december 2015

Betreft Aanvullende informatie vergunningsaanvraag

Geachte

Wij hebben een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om het project "Regulering van differentiatie en zelfvernieuwing van hematopoietische stamcellen" met aanvraagnummer AVD105002015286.

Welke informatie nog nodig

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

-U wordt verzocht in het kader van vermindering voor elk van de onderzoeksvragen keuzemomenten vast te stellen bij de start van een dierproef, tussen de verschillende dierproeven en tussen de verschillende experimenten binnen een type dierproef.

-Daarnaast wordt u verzocht de criteria te beschrijven op welke wijze bepaald zal worden of wel/niet met een dierproef gestart gaat worden en te beschrijven op basis waarvan bijvoorbeeld gekozen zal worden voor specifieke genen/mutaties.

De samenhang tussen de verschillende onderzoeksvragen in uw aanvraag is niet geheel duidelijk. Binnen een project dienen de proeven onderling samen te hangen en een gemeenschappelijk welomschreven toetsbaar doel te dienen. Uw aanvraag lijkt echter uit twee verschillende onderdelen te bestaan met elk een ander direct doel: 1) onderzoek naar hematopoietische stamcellen tijdens veroudering en 2) ontwikkeling en behandeling van leukemie.

-U wordt verzocht toe te lichten wat de samenhang is tussen onderzoeksvraag 5 enerzijds en de overige onderzoeksvragen anderzijds?

Uit uw aanvraag wordt niet duidelijk hoeveel dieren nodig zijn voor de beantwoording van elke onderzoeksvraag.

-U wordt verzocht voor elk van de dierproeven aan te geven hoeveel dieren nodig zijn voor de beantwoording van elke individuele onderzoeksvraag.

In dierproef 3.4.4.2 geeft u aan 5000 ontvanger dieren te gaan gebruiken. U geeft echter niet aan hoeveel donordieren u nodig heeft. Dit moet echter wel in uw vergunningsaanvraag worden opgenomen.

-U wordt verzocht aan te geven hoeveel donordieren u nodig heeft (per transplantatie en in totaal).

Datum

1 december 2015

Onze referentie

AVD105002015286

Opsturen informatie

U heeft 14 dagen de tijd om de ontbrekende informatie op te sturen. De CCD zou de gevraagde informatie echter graag uiterlijk vrijdag 4 december 2015 van u ontvangen om uw aanvraag in de eerstvolgende vergadering te kunnen behandelen. U kunt deze informatie in de vorm van een brief onder vermelding van het aanvraagnummer (AVD105002015286) aanleveren via NetFTP of per post. Indien u de informatie per post verstuurd, gebruik dan het bijgevoegde formulier.

Wanneer een beslissing

De beslistermijn op uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat bovengenoemde informatie is ontvangen. Na ontvangst van uw reactie/de ontbrekende informatie nemen wij uw aanvraag verder in behandeling. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.zbo-cdd.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut). De CCD zou de gevraagde informatie graag uiterlijk donderdag 02 april 2015 van u ontvangen.

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post



Melding

Bijlagen via de post

- U wilt één of meerdere bijlagen naar ons versturen? Voeg *altijd* deze Melding Bijlagen toe. Wij weten dan welke documenten van u zijn en hoeveel documenten u opstuurt.
- Meer informatie vindt u op www.zbo-ccd.nl
- Of bel met ons: 0900 28 000 28 (10 ct/min).

1 Uw gegevens

- 1.1 Vul de gegevens in.
- | | | | |
|----------------|--|------------|--|
| Naam aanvrager | | | |
| Postcode | | Huisnummer | |
- 1.2 Bij welke aanvraag hoort de bijlage?
Het aanvraagnummer staat in de brief of de ontvangstbevestiging.
- | | | | |
|----------------|--|--|--|
| Aanvraagnummer | | | |
|----------------|--|--|--|

2 Bijlagen

- 2.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
Vul de naam of omschrijving van de bijlage in.
- | | |
|--------------------------|--|
| ☐ | |
| ☐ | |
| ☐ | |

3 Ondertekening

- 3.1 Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
- | | | | |
|--------------|---|---|----|
| Naam | | | |
| Datum | - | - | 20 |
| Handtekening | | | |
- Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Geachte Commissie,

U heeft mij verzocht om aanvullende informatie betreffende mijn projectvergunningaanvraag getiteld "Regulering van differentiatie en zelfvernieuwing van hematopoietische stamcellen" (AVD105002015286), hetgeen ik door middel van deze brief volgaarne doe.

U verzoek voor aanvullende informatie besloeg drie hoofdpunten:

1. U schreef: *-U wordt verzocht in het kader van vermindering voor elk van de onderzoeksvragen keuzemomenten vast te stellen bij de start van een dierproef, tussen de verschillende dierproeven en tussen de verschillende experimenten binnen een type dierproef.*

In mijn aanvraag heb ik de volgende 5 onderzoeksvragen centraal gesteld:

- a. what are the genetic and epigenetic changes that occur in hematopoietic stem cells as they age?
- b. can functioning of young, but particularly aged hematopoietic stem- and progenitor cells be improved by genetic or chemical interference?
- c. how do hematopoietic stem cells from distinct mouse genotypes (strains) age differently, and can we identify genetic loci and indeed genes, associated with stem cell ageing?
- d. how many stem cells contribute to blood cell formation during the lifespan of an organism?
- e. how many stem cells contribute to leukemia, and are different leukemic stem cells differentially sensitive to drugs?

U verzoek om meer duidelijkheid omtrent "*keuzemomenten bij de start van een dierproef, tussen de verschillende proeven en tussen verschillende experimenten binnen een type dierproef*" is niet heel specifiek. Ik interpreteer uw verzoek om keuzemomenten helderder definiëren als een uitnodiging om duidelijker aan te geven wanneer al dan niet over zal worden gegaan tot uitvoering van experimenten die gericht zijn op genoemde onderzoeksvragen a-e.

In het algemeen zal -vanzelfsprekend- pas worden overgegaan tot uitvoering van een proef als er uit de bestaande literatuur geen informatie, cq data, voorhanden zijn die de vraag reeds beantwoorden. Dit is keuzemoment 1. Keuzemoment 2 betreft de omvang van de studie, cq het benodigde aantal proefdieren. Dit aantal zal sterk afhangen van de te gebruiken technieken. Voor onderzoeksvraag a. spelen twee factoren een rol: ten eerste hebben we in voorgaand werk laten zien dat er gedurende veroudering veel heterogeniteit optreedt tussen individuele muizen. Waar jonge muizen over het algemeen weinig spreiding laten zien voor wat betreft meerdere stamcelparameters, is dat bij oude muizen niet het geval. Dit betekent dat, afhankelijk van het exacte experiment, er meer oude muizen dan jonge muizen nodig zullen zijn om statistisch voldoende solide data te genereren (zie bv onze publikatie [REDACTED]). Een tweede aspect bij onderzoeksvraag a. betreft de snelle ontwikkelingen op het gebied van (epi-) genetische profilering, met name Next Generation Sequencing. Dit leidt er toe dat steeds minder cellulair materiaal nodig is om goede metingen te verrichten, hetgeen leidt tot minder proefdieren. Het is onmogelijk om hier preciezer over te zijn, ook omdat elke epigenetische verandering

gemeten wordt op een unieke manier (cq. met unieke antilichamen), die meer of minder gevoelig zijn.

Voor onderzoeksvraag b. is een belangrijk criterium de grootte van het effect dat verwacht kan worden. Het interveniëren in stamcelfunctionaliteit met genetische (repressie of overexpressie constructen) of chemische middelen kan tot kleine of grotere effecten leiden. Op dit moment bijvoorbeeld voeren wij genetische studies uit met een specifiek microRNA, waarin we een erg groot effect zien en derhalve de groepsgrootte van het gebruikte aantal muizen kleiner kan zijn. In alle gevallen zullen we eerst een pilot experiment uitvoeren waarin we een groep van 5 experimentele muizen vergelijken met een identiek grote groep van controle muizen. Slechts indien we een effect observeren in een dergelijke pilotstudie zal, op grond van deze resultaten, een herhalingsstudie worden ingezet met voldoende dieren per groep.

Voor onderzoeksvraag c. zijn de belangrijkste keuzemomenten om groepsgrootte te bepalen het aantal cellen dat we kunnen isoleren van donordieren, en samenhangend daarmee de hoeveelheid cellen die we nodig hebben om epi-genetische studies uit te voeren. Met betrekking tot het laatste aspect is de trend dat we steeds meer met steeds minder cellen kunnen, hetgeen dus leidt tot kleinere groepsgrootte (zie ook boven). In een deel van deze studies zullen transplantaties worden uitgevoerd, en die doen wij over het algemeen met een klein aantal cellen, zodat een klein aantal (3-5) donoren meestal voldoet.

Voor onderzoeksvraag d. zijn vanwege de geobserveerde heterogeniteit (zie bv onze publikatie Verovskaya, BLOOD 2013), relatief veel ontvangers nodig. Het keuzemoment hier wordt vrijwel uitsluitend bepaald door het aantal stamcelklonen dat we willen volgen om een goed spectrum aan in vivo gedrag te observeren. Vermindering wordt hier tot stand gebracht door het feit dat we meerdere -gebarcodeerde- klonen in één muis kunnen volgen. In eerdere studies werd 1 cel per ontvangermuis getransplanteerd, hetgeen leidde tot een veel groter aantal ontvangermuizen dan in de nu voorgestelde studies (vergelijk bv. [REDACTED]).

Voor onderzoeksvraag e. geldt feitelijk hetzelfde als bij d. We weten op dit moment weinig van de heterogeniteit van leukemische stamcelklonen, dus het is lastig om hier precies te zijn. Indien humane leukemieën uit veel klonen zullen bestaan is het aantal ontvangermuizen relatief hoog, terwijl bij weinig klonale heterogeniteit minder ontvangermuizen nodig zijn. Het keuzemoment zal hier worden bepaald door eerste pilotstudies, waarin een indruk zal worden gekregen van de aanwezige heterogeniteit.

2. Een tweede verzoek tot aanvulling betreft:

-Daarnaast wordt u verzocht de criteria te beschrijven op welke wijze bepaald zal worden of wel/niet met een dierproef gestart gaat worden en te beschrijven op basis waarvan bijvoorbeeld gekozen zal worden voor specifieke genen/mutaties. De samenhang tussen de verschillende onderzoeksvragen in uw aanvraag is niet geheel duidelijk. Binnen een project dienen de proeven onderling samen te hangen en een

gemeenschappelijk welomschreven toetsbaar doel te dienen. Uw aanvraag lijkt echter uit twee verschillende onderdelen te bestaan met elk een ander direct doel: 1) onderzoek naar hematopoietische stamcellen tijdens veroudering en 2) ontwikkeling en behandeling van leukemie.

Het eerste deel van dit verzoek lijkt mij identiek als het eerste punt dat uw aanroert, namelijk welke de keuzemomenten zijn bij de start van een dierproef. Ik begrijp niet helemaal hoe dit anders is dan 'op welke wijze bepaald zal worden of wel/niet met een dierproef zal worden gestart'. Ik refereer voor het eerste deel van de beantwoording van uw vraag derhalve naar mijn antwoord bij punt 1.

Het tweede aspect van uw verzoek betreft het beschrijven van de basis op grond waarvan gekozen zal worden voor specifieke mutaties. Deze genen zullen voortkomen uit de verschillende screens die we uitvoeren in het kader van onderzoeksvraag a en c. In het verleden hebben wij uit vergelijkbare screens bijvoorbeeld Ezh2, Cbx7 en mir125a geïdentificeerd als genen die een belangrijke rol spelen bij het op een juiste manier reguleren van het gedrag van hematopoietische stamcellen (zie [redacted]).

[redacted]. In het bijzonder zijn wij op dit moment geïnteresseerd in interactiepartners van Cbx7, en in microRNA125a targets. Wij hebben een lijst van ~10 genen geïdentificeerd die wij als kandidaatgenen zouden willen zien. Echter, meer in vitro voorwerk is nodig om te besluiten of er al dan niet in vivo vervolgstudies zullen volgen.

Om de functionele consequenties van dergelijke interactiepartners en/of microRNA targets te bestuderen zullen deze genen tot overexpressie worden gebracht, of juist worden onderdrukt. In eerste instantie in stamceltransplantatie-experimenten, waarbij genen ectopisch worden geïnduceerd. Echter, het is ook mogelijk dat in sommige gevallen genetisch gemodificeerde dieren zullen worden gemaakt. De uiteindelijke afweging om dergelijke dieren wel of niet te maken zal altijd afhangen van het wetenschappelijk belang. Als we de wetenschappelijke vraag kunnen 'oplossen' zonder genetisch gemodificeerde dieren te maken (hetgeen tot nu toe altijd het geval is geweest) zullen we dit traject vanzelfsprekend niet bewandelen. In een toenemend aantal gevallen bestaan er trouwens reeds genetisch gemodificeerde modellen, en zullen we deze niet zelf genereren.

Het laatste deel van uw verzoek ('*de samenhang van de verschillende onderzoeksvragen in uw aanvraag is niet geheel duidelijk*') lijkt mij -opnieuw- te overlappen met het derde punt dat u in uw brief aanroert ("*U wordt verzocht toe te lichten wat de samenhang is tussen onderzoeksvraag 5 enerzijds en de overige onderzoeksvragen anderzijds?*").

Ik zal, mijns inziens nogmaals, trachten te schetsen hoe de 5 onderzoeksvragen uit deze aanvraag nauw met elkaar samenhangen. Zoals ik in mijn aanvraag schreef betreft het hier onderzoeksvragen die parallel zullen worden uitgevoerd, maar die in experiment en in concept sterk overlappen. In gezamenlijkheid betreft het onderzoeksvragen die ten doel hebben om het biologisch gedrag van hematopoietische stamcellen te doorgronden. Gedurende ons leven functioneren deze stamcellen steeds slechter, maar we begrijpen niet hoe dat komt. Onderzoeksvragen a. t/m c. behelzen onderzoek naar genetische en epigenetische factoren die een rol spelen bij stamcelzelfvernieuwing, en hoe dit proces verstoord raakt gedurende veroudering. Als we begrijpen welke mechanismen exact verstoord raken gedurende veroudering

(onderzoeksvraag a. en c.), kan begonnen worden met na te denken of sommige van die processen niet omkeerbaar zijn (onderzoeksvraag b.). Een belangrijke vraag waar amper iets over bekend is, is van hoeveel stamcellen gedurende veroudering de perifere bloedcellen eigenlijk afkomstig zijn, en of dit aantal participerende stamcelklonen varieert gedurende veroudering. Technieken in ons lab hebben het mogelijk gemaakt dit soort klonale contributies accuraat te meten, en in onderzoeksvraag d. willen we dat in detail gaan uitzoeken. Deze klonale informatie is natuurlijk relevant in normale hematopoïese, maar we zullen ook onderzoeken of de klonaliteit van het hematopoïetisch systeem verandert als belangrijke stamcelzelfvernieuwingsgenen (voortkomend uit de screens in onderzoeksvraag a-c) tot overexpressie worden gebracht. Gaan in dat geval meer stamcellen participeren in bloedcelvorming, of gaan juist enkele (of slechts één) stamcellen meer bloedcellen produceren? Als het bloedvormende systeem gedurende veroudering klonaler wordt (dwz, veel bloedcellen zijn afkomstig van slechts enkele stamcellen), wordt dat algemeen gezien als een voorbode voor leukemie. Inderdaad is één van de klinische verschijnselen van een verouderend hematopoïetisch systeem de ontwikkeling van leukemie. Recent onderzoek laat zien dat de grens tussen normale, maar verouderende hematopoïese, en pathologische leukemie niet zwart-wit is, en dat er een fase van klonale hematopoïese voorafgaat aan leukemie ontwikkeling, en andersom, dat leukemieën meestal niet bestaan uit één uniforme kloon, maar uit meerdere, of zelfs vele, subkloons. Het gedrag van dergelijke leukemische subkloons is amper onderzocht, en de techniek die ontwikkeld is in ons lab en die voor onderzoeksvraag d. zal worden gebruikt, is ook voor onderzoeksvraag e. essentieel. We zullen kunnen vaststellen hoe klonaal, ouderdoms-geassocieerde leukemie is, en of dit van klinisch belang zou kunnen zijn (is een leukemie die uit één kloon bestaat minder kwaadaardiger, cq. gevoeliger voor cytostatica, dan een leukemie die uit meerdere klonen bestaat?). Tevens is het zeer wel mogelijk dat overexpressie van een deel van de genen die voortkomen uit onderzoeksvraag a.-c. na transplantatie tot leukemie leiden. Recente voorbeelden in ons lab zijn Cbx [REDACTED]. Hoewel deze genen leiden tot sterke stamcelzelfvernieuwing, onstond (daardoor?) ook in een flink deel van de muizen leukemie. Klonale informatie omtrent deze experimentele leukemieën (die wordt verkregen in onderzoeksvraag e.) is uiterst waardevol voor een beter begrip van leukemogenese.

Ik hoop dat bovenstaand schrijven u genoegzaam heeft overtuigd van het feit dat deze 5 onderzoeksvragen belangrijke samenhang bevatten. In het algemeen kan gesteld worden dat onderzoeksvragen a. en c. vooraf zullen gaan aan vraag b, die weer voorafgaat aan vragen d. en e. De onderzoeksvragen zijn naar mijn mening derhalve sterk samenhangend, maar ze zijn -met opzet- niet conditioneel afhankelijk van elkaar.

3. Uw laatste punten betreffen, mijns inziens wederom erg overlappende, zo niet identieke opmerkingen (1. " Uit uw aanvraag wordt niet duidelijk hoeveel dieren nodig zijn voor de beantwoording van elke onderzoeksvraag". en 2"-U wordt verzocht voor elk van de dierproeven aan te geven hoeveel dieren nodig zijn voor de beantwoording van elke individuele onderzoeksvraag.", en 3 "In dierproef 3.4.4.2 geeft u aan 5000 ontvanger dieren te gaan gebruiken. U geeft echter niet aan hoeveel donordieren u nodig heeft. Dit moet echter wel in uw vergunningsaanvraag worden opgenomen.", en tot slot 4 "-U wordt verzocht aan te geven hoeveel donordieren u

nodig heeft (pertransplantatie en in totaal)."

Ik neem aan dat deze 4 punten feitelijk allemaal een identiek aspect adresseren, namelijk een uw inziens onvolledigheid omtrent het exacte aantal proefdieren wat wij in ieder experiment zullen gaan gebruiken. Het is inderdaad zo dat het onmogelijk is exact aan te geven hoeveel proefdieren we in elk en ieder experiment zullen gaan gebruiken. Dit komt voor een groot deel voort uit het feit dat wij niet in staat zijn op dit moment in detail te schetsen welk experiment wij zullen uitvoeren; vanzelfsprekend worden dergelijke beslissingen genomen op grond van de resultaten van eerdere studies, en slechts als deze data beschikbaar komen kunnen en zullen we al dan niet nieuwe dierexperimenten gaan opzetten. Vaak is het zo dat één type experiment gebruikt wordt bij de beantwoording van meerdere onderzoeksvragen. Soms is het zelfs ook zo dat we in één fysiek experiment meerdere onderzoeksvragen trachten te beantwoorden.

Een deel van de verwarring komt daardoor mijns inziens voort uit het feit dat er twee parameters zijn die u hanteert; de **onderzoeksvraag** en de **experimentele handeling**. Uw opmerkingen hier boven suggereren dat u per **onderzoeksvraag** wilt weten hoeveel dieren worden gebruikt. Ik heb de onderzoeksvragen geformuleerd in het document getiteld "Form-Project Proposal", en in dat document lees ik nergens dat ik hier al geacht wordt aan te geven hoeveel proefdieren ik per onderzoeksvraag denk te gaan gebruiken. Ik laat mij graag corrigeren als ik iets over het hoofd zie, maar volgens mij wordt deze vraag niet in dit document gesteld.

De vraag omtrent het aantal te gebruiken proefdieren kom ik slechts tegen in het document "Appendix- Description of animal procedures". Bijgevoegd bij de oorspronkelijke aanvraag heb ik drie van dergelijke bijlagen. In deze bijlagen wordt nu niet meer gevraagd naar de **onderzoeksvragen**, maar naar de specifieke **experimenten**. Ik heb drie typen experimenten in kaart gebracht, en zoals gezegd voor ieder type experiment een bijlage toegevoegd. In elk van deze bijlagen heb ik het aantal te gebruiken proefdieren nader toegelicht:

Appendix 1: Lifespan studies. 4100 mice. U stelt hierover verder geen vragen.

Appendix 2: Stem cell transplantations. 5000 mice. Hier heb ik inderdaad geen onderscheid gemaakt tussen ontvangers en donoren. Het exacte aantal donoren en ontvangers dat per experiment gebruikt zal worden (u vraagt daar in uw schrijven expliciet naar) is onmogelijk te geven. Er zullen experimenten zijn waarbij cellen van 1 donor getransplanteerd worden in 10 ontvangers, maar deze verhouding is ook weleens 1:1. Tevens, in deze bijlage wordt gerefereerd aan immuundeficiente ontvangers, die gebruikt zullen worden voor humane xenotransplantaties. In die gevallen is er dus geen sprake van een muis als donor. Het beste wat ik hier kan doen is de te vermelden dat de verwachte ratio donor-recipient gemiddeld 1-4 bedraagt (1000 donoren en 4000 ontvangers).

Appendix 3: Genereren nieuwe transgene muizenstammen. 480 dieren. U stelt hierover verder geen vragen.

Ik hoop dat mijn antwoord op uw aanvullende vragen voor u voldoende aanleiding zijn om mijn aanvraag nu toe te kennen.

Met vriendelijke groet

A solid black rectangular box used to redact a signature.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A Deusingelaan 1

9713AV Groningen

**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.zbo-ccd.nl

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
AVD105002015286

Uw referentie

Bijlagen

Datum 30 december 2015

Betreft Aanvullende informatie vergunningsaanvraag

Wij hebben een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om het project "Regulering van differentiatie en zelfvernieuwing van hematopoietische stamcellen" met aanvraagnummer AVD105002015286.

Welke informatie nog nodig

Op 14 december 2015 heeft u ons aanvullende informatie verstrekt. U heeft één van de aan u gestelde vragen echter niet beantwoord.

De beoordeling van een aanvraag voor een projectvergunning omvat onder andere een analyse van de schade en de baten die het project oplevert, waarbij wordt nagegaan of de schade in de vorm van pijn, lijden, angst of blijvende schade bij de dieren wordt gerechtvaardigd door het te verwachte resultaat met inachtneming van de ethische overwegingen, en op termijn voordelen kan opleveren voor mens, dier of milieu. Indien informatie ontbreekt stelt de CCD vragen met als doel de ontbrekende informatie alsnog te verkrijgen. Dit betekent dat u alle gestelde vragen dient te beantwoorden om het voor de CCD mogelijk te maken uw aanvraag te beoordelen. U wordt daarom verzocht deze vraag alsnog te beantwoorden.

Het betreft onderstaande vraag:

Uit uw aanvraag wordt niet duidelijk hoeveel dieren nodig zijn voor de beantwoording van elke onderzoeksvraag.

-U wordt verzocht voor elk van de type dierproeven aan te geven hoeveel dieren nodig zijn voor de beantwoording van elke individuele onderzoeksvraag.

Daarnaast heeft u als antwoord op de vraag over de hoeveelheid te gebruiken donordieren aangeven dat u in Bijlage 3.4.4.2 geen onderscheid heeft gemaakt tussen donordieren en ontvanger dieren en dat u in totaal 5000 dieren gaat gebruiken. In Bijlage 3.4.4.2, onderdeel B, staat echter het volgende: "Over a period of 5 years we anticipate therefore to use 5000 recipient mice". In

onderdeel B wordt ook verder niet gesproken over donordieren, wel over ontvanger dieren. U wordt verzocht de tekst in bijlage 3.4.4.2 aan te passen en, net als u voor de ontvanger dieren heeft gedaan, de stammen, levensstadia, herkomst en benodigde aantallen van de donordieren te specificeren.

Datum

30 december 2015

Onze referentie

AVD105002015286

Opsturen informatie

U heeft 14 dagen de tijd om de ontbrekende informatie en de herziene bijlage 3.4.4.2 op te sturen. De CCD zou de gevraagde informatie echter graag uiterlijk dinsdag 5 januari 2015 van u ontvangen om uw aanvraag in de eerstvolgende vergadering te kunnen behandelen. U kunt deze informatie in de vorm van een brief onder vermelding van het aanvraagnummer (AVD105002015286) aanleveren via NetFTP of per post. Indien u de informatie per post verstuurd, gebruik dan het bijgevoegde formulier.

Wanneer een beslissing

De beslistermijn op uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat bovengenoemde informatie is ontvangen. Na ontvangst van uw reactie/de ontbrekende informatie nemen wij uw aanvraag verder in behandeling. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.zbo-ccd.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut). De CCD zou de gevraagde informatie graag uiterlijk donderdag 02 april 2015 van u ontvangen.

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post



Melding

Bijlagen via de post

- U wilt één of meerdere bijlagen naar ons versturen? Voeg *altijd* deze Melding Bijlagen toe. Wij weten dan welke documenten van u zijn en hoeveel documenten u opstuurt.
- Meer informatie vindt u op www.zbo-ccd.nl
- Of bel met ons: 0900 28 000 28 (10 ct/min).

1 Uw gegevens

- 1.1 Vul de gegevens in.
- | | | | |
|----------------|--|------------|--|
| Naam aanvrager | | | |
| Postcode | | Huisnummer | |
- 1.2 Bij welke aanvraag hoort de bijlage?
Het aanvraagnummer staat in de brief of de ontvangstbevestiging.
- | | | | |
|----------------|--|--|--|
| Aanvraagnummer | | | |
|----------------|--|--|--|

2 Bijlagen

- 2.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
Vul de naam of omschrijving van de bijlage in.
- | | |
|--------------------------|--|
| ☐ | |
| ☐ | |
| ☐ | |

3 Ondertekening

- 3.1 Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
- Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
- | | | | |
|--------------|---|---|----|
| Naam | | | |
| Datum | - | - | 20 |
| Handtekening | | | |

Geachte commissie,

Naar aanleiding van mijn antwoorden op uw aanvullende vragen stelt u mij opnieuw twee aanvullende vragen. In deze brief beantwoord ik deze beide vragen.

Vraag 1:

"-U wordt verzocht voor elk van de type dierproeven aan te geven hoeveel dieren nodig zijn voor de beantwoording van elke individuele onderzoeksvraag".

In mijn antwoord op uw eerste aanvullende vragen ben ik wel degelijk op dit punt ingegaan; ik schreef immers:

"Uw opmerkingen suggereren dat u per onderzoeksvraag wilt weten hoeveel dieren worden gebruikt. Ik heb de onderzoeksvragen geformuleerd in het document getiteld "Form-Project Proposal", en in dat document lees ik nergens dat ik hier al geacht wordt aan te geven hoeveel proefdieren ik per onderzoeksvraag denk te gaan gebruiken. Ik laat mij graag corrigeren als ik iets over het hoofd zie, maar volgens mij wordt deze vraag niet in dit document gesteld. De vraag omtrent het aantal te gebruiken proefdieren kom ik slechts tegen in het document "Appendix- Description of animal procedures". Bijgevoegd bij de oorspronkelijke aanvraag heb ik drie van dergelijke bijlagen. In deze bijlagen wordt nu niet meer gevraagd naar de onderzoeksvragen, maar naar de specifieke experimenten. Ik heb drie typen experimenten in kaart gebracht, en zoals gezegd voor ieder type experiment een bijlage toegevoegd. In elk van deze bijlagen heb ik het aantal te gebruiken proefdieren nader toegelicht"

U gaat in uw aanvullende vragen niet in op het punt dat ik hier maak, namelijk dat er nergens in de door uw opgestelde documenten gevraagd wordt om per onderzoeksvraag proefdiaraantallen te specificeren.

Na een email correspondentie met uw medewerker [REDACTED] (zij schrijft "In de toelichting staat inderdaad niet beschreven dat het aantal te gebruiken dieren per onderzoeksvraag moet worden beschreven. Echter, indien in een project, zoals dat van jullie, meerdere onderzoeksvragen beantwoord gaan worden, wil de CCD wel graag een indicatie hebben hoeveel dieren voor elke onderzoeksvraag gebruikt gaan worden (een inschatting plus een onderbouwing daarvoor).") begrijp ik dat ik geacht wordt deze informatie, die ik niet kwijt kan in de reguliere formulieren nu in deze aanvulling alsnog te geven, hetgeen ik hierbij doe:

Mijn aanvraag omvatte 5 onderzoeksvragen:

1. what are the genetic and epigenetic changes that occur in hematopoietic stem cells as they age?

-Hiervoor zullen (een deel van) de muizen worden gebruikt die ook dienen om onderzoeksvraag 3 te beantwoorden. Van muizen van verschillende leeftijden en genetische achtergronden zullen cellen worden geïsoleerd om 1. functionele studies uit te voeren (beenmergtransplantaties) en 2. materiaal uit te verzamelen voor een moleculaire analyse (meer specifiek; RNA en ChIP-Seq analyses). We schatten in voor deze studies 1500 donormuizen te gebruiken (100 stammen x 3 tijdstippen x 5 muizen per tijdstip). De resterende dieren die

verantwoord zijn in Appendix A ("Lifespanstudies"), paragraaf B (4100 - 1500 = 2600) zullen worden gebruikt voor lifespanstudies. Het betreft hier opnieuw 100 verschillende BXD stammen (25 dieren elk = 2500 muizen), aangevuld met C57BL/6 en DBA/2 (50 elk = 100 muizen).

2. can functioning of young, but particularly aged hematopoietic stem- and progenitor cells be improved by genetic or chemical interference?

Voor deze studies, beschreven in Appendix B ('beenmergtransplantaties'), zullen 5000 muizen worden gebruikt, onderverdeeld als 1000 donormuizen en 4000 ontvangermuizen.

In Appendix B ben ik, zoals u terecht opmerkt, ten onrechte vergeten de donormuizen expliciet te benoemen. Zoals ik u in mijn voorgaande reactie op uw aanvullende vragen reeds mededeelde, zijn per donormuis gemiddeld genomen 4 ontvangermuizen noodzakelijk.

In Appendix B worden wordt berekend dat wij voorzien in een periode van 5 jaar 4000 ontvangermuizen nodig te hebben (per test conditie -bv overexpressie/repressie van bepaalde genes, muizenstam, kweekcondities, etc- zullen gemiddeld 100 ontvangermuizen nodig zijn). In een periode van 5 jaar schatten wij in 40 van bovenstaande testcondities te zullen bestuderen (8 testcondities per jaar). Dit resulteert in $5 \times 8 \times 100 = 4000$ ontvangermuizen.

Ik heb in Appendix 2 paragraaf B nu aangepast om dit onderscheid te maken, en stuur samen met dit antwoord op uw aanvullende vragen ook een correcte, nieuwe, versie van Appendix 2 mee. Ook heb ik in de correcte versie van Appendix B de details van de donormuizen nu aangegeven.

3. how do hematopoietic stem cells from distinct mouse genotypes (strains) age differently, and can we identify genetic loci and indeed genes, associated with stem cell ageing?

-Hiervoor zullen de 1500 muizen worden gebruikt die vermeld staan in Appendix A ("Lifespanstudies"). Een deel van deze muizen zal ook worden gebruikt om vraagstelling 1 (zie boven) te beantwoorden. en zijn hierboven nader gespecificeerd onder onderzoeksvraag 1.

Ook zullen voor deze onderzoeksvraag transplantaties worden uitgevoerd. Deze muizen die als beenmergontvanger dienen en staan gespecificeerd in Appendix B. Het betreft voor deze vraagstelling 102 verschillende testcondities (100 BXD stammen + C57BL/6 en DBA/2 ouderstammen). Waar we normaal ~100 ontvangermuizen nodig hebben voor elke testconditie (zie boven bij onderzoeksvraag 2), is de experimentele variatie tussen vers geïsoleerde stamcellen van verschillende muizenstammen erg laag, en zullen we met 5 ontvangerdieren per donorstam toekunnen. Hiervoor zijn derhalve $102 \times 5 = 510$ ontvangermuizen nodig.

4. how many stem cells contribute to blood cell formation during the lifespan of an organism?

De experimenten die voor de beantwoording van deze onderzoeksvraag noodzakelijk zijn staan beschreven in Appendix B. Het betreft hier experimenten waarin we muizen- of uit navelstrengbloed geïsoleerde humane stamcellen viraal barcoderen en transplanteren in (indien humane cellen worden gebruikt

immuundeficiente) ontvangermuizen. Wij verwachten in een tijdspanne van 5 jaar ongeveer 1000 ontvanger muizen en 250 donormuizen nodig te hebben voor deze experimenten. Deze muizen zullen tevens gebruikt worden voor vraagstelling 2

5. how many stem cells contribute to leukemia, and are different leukemic stem cells differentially sensitive to drugs?

Het betreft hier voornamelijk xenotransplantaties, waarin donorcellen afkomstig zullen zijn van leukemiepatiënten. De experimentele details staan beschreven in Appendix B. Wij voorzien van een 50-tal patiënten leukemische cellen te barcoderen en te transplanteren in immuundeficiente muizen. Per patiëntenmonster zullen gemiddeld 4 muizen kunnen worden getransplanteerd (afhankelijk van het aantal primaire leukemische cellen dat geïsoleerd en gebarcodeerd kan worden). Dit leidt dan tot een geschat aantal van 200 primaire immuundeficiente ontvangermuizen. In 20 experimenten zullen secundaire transplantaties worden uitgevoerd. Per primaire ontvanger zullen 5 secundaire ontvanger worden gebruikt, hetgeen resulteert in $20 \times 5 = 100$ secundaire ontvangers. Totaal aantal muizen dat voor deze vraagstelling zal worden gebruikt bedraagt $200 + 100 = 300$ muizen.

Vraag 2:

"Daarnaast heeft u als antwoord op de vraag over de hoeveelheid te gebruiken donordieren aangeven dat u in Bijlage 3.4.4.2 geen onderscheid heeft gemaakt tussen donordieren en ontvanger dieren en dat u in totaal 5000 dieren gaat gebruiken. In Bijlage 3.4.4.2, onderdeel B, staat echter het volgende: "Over a period of 5 years we anticipate therefore to use 5000 recipient mice". In onderdeel B wordt ook verder niet gesproken over donordieren, wel over ontvanger dieren. U wordt verzocht de tekst in bijlage 3.4.4.2 aan te passen en, net als u voor de ontvanger dieren heeft gedaan, de stammen, levensstadia, herkomst en benodigde aantallen van de donordieren te specificeren".

Zoals ik hierboven reeds gemeld heb, heb ik inderdaad ten onrechte dit onderscheid niet gemaakt. In de herziene Appendix B, hier bijgevoegd, heb ik dit gecorrigeerd.

Van: [REDACTED]
Verzonden: woensdag 13 januari 2016 10:31
Aan: Info-zbo
Onderwerp: FW: Aanvraag projectvergunning AVD105002015286: aanvullende informatie

Beste [REDACTED]

De ongerief classificatie voor appendix is door de onderzoeker onterecht als terminaal (non-recovery) bestempeld. Dit zou mild ongerief moeten zijn. Hetzelfde geldt voor appendix 2

Deze respons heeft even geduurd omdat de DEC graag ruggenspraak wilde hebben met de onderzoeker.

Dat de duiding 'non-recovery' / terminaal wordt aangehaald bij dieren die geofferd worden is ook wel enigszins begrijpelijk.

Van: Info-zbo [info@zbo-ccd.nl]
Verzonden: dinsdag 29 december 2015 14:55
Aan: Secretariaat DEC
Onderwerp: Aanvraag projectvergunning AVD105002015286: aanvullende informatie

Geachte DEC,

Wij hebben een aanvraag voor een projectvergunning in behandeling waar u ons advies over heeft gegeven. Het gaat om het project "Regulering van differentiatie en zelfvernieuwing van hematopoietische stamcellen" met aanvraagnummer AVD105002015286. Wij hebben nog twee vragen over de ongeriefsclassificaties in dierproeven 3.4.4.1 en 3.4.4.2.

In dierproef 3.4.4.1 is het ongerief voor een deel van de dieren ingeschat als terminaal. Uit de aanvraag blijkt echter niet dat er dieren zijn waarbij het ongerief als terminaal zou moeten worden ingeschat. Indien u van mening bent dat het ongerief voor een deel van de dieren toch als 'terminaal' zou moeten worden ingeschat, verzoeken wij u dit toe te lichten en aan te geven welke handelingen de dieren zullen ondergaan.

In dierproef 3.4.4.2 is aangegeven dat het ongerief voor donordieren ook als terminaal zou moeten worden ingeschat. Het alleen doden van dieren voor het isoleren van organen wordt echter geclassificeerd als licht ongerief. Kunt u ook voor dierproef 3.4.4.2 aangegeven waarom u van mening bent dat voor donordieren het ongerief als terminaal zou moeten worden ingeschat.

Aangezien de CCD deze aanvraag graag in de eerstkomende vergadering wil behandelen, zouden wij uw toelichting graag uiterlijk dinsdag 5 januari 2016 ontvangen.

Bij voorbaat hartelijk dank,

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl (Let op: nieuw e-mail adres)

De inhoud van dit bericht is vertrouwelijk en alleen bestemd voor de geadresseerde(n). Anderen dan de geadresseerde(n) mogen geen gebruik maken van dit bericht, het niet openbaar maken of op enige wijze verspreiden of vermenigvuldigen. Het UMCG kan niet aansprakelijk gesteld worden voor een incomplete aankomst of vertraging van dit verzonden bericht.

The contents of this message are confidential and only intended for the eyes of the addressee(s). Others than the addressee(s) are not allowed to use this message, to make it public or to distribute or multiply this message in any way. The UMCG cannot be held responsible for incomplete reception or delay of this transferred message.



Form Project proposal

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

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 10500
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. University of Groningen
- 1.3 Provide the title of the project. Regulering van differentiatie en zelfvernieuwing van hematopoietische stamcellen

2 Categories

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

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

Hematopoietic stem cells. Most, if not all, tissues in our body contain a small population of stem cells that are essential to remain cellular homeostasis. The frequency and functional activity of these tissue-resident stem cells varies substantially from tissue to tissue. Arguably the best-characterized adult stem

cells are hematopoietic stem cells (HSC) that are normally located in the bone marrow and play an essential role in replenishing all the differentiated blood cell compartments. Although the various mature blood cell types, which include erythrocytes, granulocytes, platelets, macrophages and B- and T-lymphocytes, are morphologically and functionally highly distinct, they are all produced by the same population of HSCs. Seminal experimental transplantation studies in mice have proven that a single HSC is able to restore all blood cell types. The first experimental bone marrow transplantations were carried out in the mid 1950's, and the existence of HSCs was formally proven in the early 1960's. As such, it is safe to consider that HSCs are the founding fathers, or rather mothers, of the field of adult stem cell biology.

Clinical relevance of hematopoietic stem cells. After HSCs were first discovered, it did not take very long to realize their potential clinical relevance, and indeed the first bone marrow transplantations in patients with leukemia were carried out in the 1960's, leading to the Nobel Prize for E. Donnall Thomas in 1990. The clinical use of HSCs has been on the increase ever since. Beyond "classical" bone marrow transplantations, HSCs can now be isolated from cord blood and can be used as carriers for transgenes to treat various genetic deficiencies. Multiple exciting research programs are underway to assess whether it will be possible to generate, in vitro, functional mature blood cells (erythrocytes, platelets) from HSCs, to be used for transfusion/infusion purposes. In addition, lymphoid progeny of HSCs can possibly be used in immune therapy protocols. One very recent avenue of HSC research explores whether it may be possible to generate transplantable HSCs from non-stem cells. Therefore, although the field of HSC biology started in the mid 1950's, the full potential of using and manipulating these rare cells has been far from reached.

Stem cell ageing. Hematopoietic stem cells, as all adult, tissue-resident stem cells, ensure lifelong homeostasis. HSCs replenish blood cells that are lost as a result of trauma/bleeding, but more typically as a result of their age. The lifespan of individual blood cells ranges from several days (granulocytes) to months (erythrocytes) or years (memory B- cells), and mature blood cell compartments must therefore be constantly replenished from more primitive stem- and progenitor cell compartments. Therefore, stem cells can be considered as nature's (or the organism's) own anti-ageing agents; without the continuous, lifelong activity of stem cells, tissues would rapidly and prematurely degenerate. The converse corollary implies that protecting stem cells from the deleterious effects of ageing could contribute to an increased potential to maintain tissue homeostasis during the lifespan of an organism.

As pointed out above, HSCs are arguably the best understood stem cells, and consequently, of all adult stem cell types we have learned most about stem cell ageing in the field of hematology. From a clinical perspective, most patients with hematological conditions are elderly subjects. This holds true for patients suffering from a shortage of blood cells types (anemias, neutropenias, thrombopenias) as well as patients suffering from an excess of blood cells (myeloproliferative syndromes, chronic and acute leukemias). The increased incidence of hematological conditions with advanced age suggests that they may be originating from dysfunctional HSCs, in which the balance between selfrenewal and differentiation has become impaired.

Early serial transplantation studies in the field of HSC ageing have shown that the functional lifespan of HSCs exceeds the lifespan of the original donor mouse. Multiple studies, including our own, documented that, counter-intuitively, with age hematopoietic stem cells increase in number in the mouse. However, we showed that the functional activity of aged HSCs decreases substantially compared to their young counterparts (1). This is evident from single cell transplantation studies, but we also showed, using virally barcoded HSCs, that the clone size of aged HSCs is much smaller than that of young HSCs (2). Serial transplantation studies have documented that aged HSCs have reduced selfrenewal capacity, and display a preference for producing myeloid cells at the expense of lymphoid cells (aged HSCs become myeloid-biased or rather lymphoid-deficient) (reviewed in 3). Several lines of evidence indicate that in elderly humans fewer HSC clones contribute to hematopoiesis compared to young adults, suggesting exhaustion of many HSCs, and clonal dominance of some. Interestingly, very recent data indicate that such clonal dominance may arise from mutations in important 'selfrenewing' genes that confer a proliferative advantage to these cells. These potentially preleukemic cells may then in a time frame of many years, if not decades, accumulate additional mutations before they fully derail and become acutely leukemic. Interestingly, from large-scale sequencing efforts it is now evident that common preleukemic events very often involve genes that can be considered as epigenetic modifiers. Examples include DNMT3a, ID2, ASXL, and EZH2. In fact, my lab was the first to show that Ezh2 plays an important role in murine HSCs selfrenewal, and extends their functional lifespan (4). At the same time, however, it should also be realized that the (stem cell) ageing process is under genetic control. Whereas in experimental

hematology studies C57BL/6 mice are used in >95% of all cases (simply because many transgenic-, reporter-, and congenic strains exist in this background) it is very clear that hematopoiesis in other regular inbred strains of mice is often very different (5,6). Obviously, the same holds true for humans, where the genetic variation is even more diverse than in laboratory mouse strains. The natural genetic variation that is present in the many regular inbred strains that are available underlies impressive, but largely underexplored, physiological variability.

Although it is evident that hematopoietic stem cells lose functional activity during the ageing process, at present, the molecular mechanisms that contribute to hematopoietic stem cell ageing remain poorly understood.

References (from own work):

[REDACTED]

3.2 Purpose

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

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

The overall objective of this project is to identify and understand the molecular and cellular mechanisms that underly normal hematopoietic stem cell aging and its transformation towards leukemia. For this purpose we have established the following aims which we will address in the upcoming 5 years:

1. what are the genetic and epigenetic changes that occur in hematopoietic stem cells as they age?
2. can functioning of young, but particularly aged hematopoietic stem- and progenitor cells be improved by genetic or chemical interference?
3. how do hematopoietic stem cells from distinct mouse genotypes (strains) age differently, and can we identify genetic loci and indeed genes, associated with stem cell ageing?
4. how many stem cells contribute to blood cell formation during the lifespan of an organism?
5. how many stem cells contribute to leukemia, and are different leukemic stem cells differentially sensitive to drugs?

Our lab has 20+ years experience in experimental hematology, and has invested very substantially in the various technical approaches that are required to complete this research project. These include purification protocols of mouse hematopoietic stem cells (ref), single cell transplantations (ref), genetic (retro- or lentiviral) transductions of stem cells (ref), expansion of hematopoietic stem cells (ref), xenotransplantation of human normal and leukemic stem cells in immune-deficient recipients (ref), and transcriptome and epigenome profiling of limited numbers of stem cells (ref). Collectively, the availability

of this methodology ensures feasibility of the proposed studies.

3.3 Relevance

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

The population in many parts of the world, including the Netherlands, is gradually aging. Life expectancy has increased by ~40 years in the last 150 years, and all evidence suggests that a further increase will take place. Maintaining optimal stem cell functioning by preventing decline in their functioning, and may be even restoring stem cell potential in aged cells, will be of significant interest to combat and prevent age-related diseases. As most patients with hematopoietic failures are 65 years or older, the demographic changes in the developed world will lead to a very substantial increase in hematological patients seen in the Hospital. Understanding why hematopoietic stem cells decline in functionality in individuals with advanced age is essential to initiate efforts to design interventions aimed to improve stem cell functioning. Such interventions will consist of efforts to improve tissue homeostasis during ageing, prevent stem cell decline, and using stem cell therapies. The current research proposal aims to identify the molecular machinery that impacts on stem cell aging. Only if we understand how stem cells age, can we hope to begin designing anti-ageing intervention strategies.

3.4 Research strategy

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

The various subaims as specified in paragraph 3.2 will be pursued in parallel and not sequential subprojects, each carried out by different PhD students and postdocs, and supported by a permanent team of experienced research technicians. The research projects will be financed by different funding bodies, and are therefore relatively independent. Yet, the data obtained in the various subprojects are all addressing the fundamental question as to what makes hematopoietic stem cells age, and therefore methodology and results originating from one subproject will feed into other projects.

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

This proposal concerns 5 research questions, detailed below. The animal procedures, which are explained in detail in Appendix 1, 2, and 3, will be employed in all 5 research questions.

1. *what are the genetic and epigenetic changes that occur in hematopoietic stem cells as they age?*

In this project we will isolate hematopoietic stem and progenitor cells from differentially aged mice, from distinct mouse strains. These cells will be characterized molecularly (RNA-Seq and Epi-Seq), and will be tested functionally in in vitro and in vivo experiments. To obtain stem and progenitor cells, donor mice will be aged and sacrificed at various timepoints. For functional testing, isolated cells will be transplanted in syngeneic or immune-deficient recipients, as explained in detail in Appendix 2. Often, these recipient mice will need to be properly conditioned by whole body irradiation. The fate of transplanted cells will then be monitored by assessing chimerism levels in blood, and at time of sacrifice in bone marrow, spleen, and thymus.

2. *can functioning of young, but particularly aged hematopoietic stem and progenitor cells be improved by genetic or chemical interference?* In this project we will overexpress or repress/disrupt, candidate genes which we predict to alter hematopoietic stem cell behavior and assess the effect of such a genetic perturbation on stem cell functioning. In addition, we will culture stem cells in the presence of compounds predicted to alter their functioning and test this in appropriate in vitro and in vivo assays. Animal procedures in this project will include isolating stem cells from donor mice or human cord blood, genetically altering mice or cells using various genome-editing tools, transplanting genetically altered stem cells in recipient mice and monitoring chimerism levels in multiple tissues. Further details of the required animal procedures are explained in Appendix 2 and 3.

3. *how do hematopoietic stem cells from distinct mouse genotypes (strains) age differently, and can we identify genetic loci and indeed genes, associated with stem cell ageing?* In this project we will age mice from multiple distinct genotypes/strains, perform classical lifespan studies, and at specified timepoints

sacrifice otherwise unperturbed donor mice to collect stem cells, used for phenotyping at a molecular and functional level. Animal procedures are explained in Appendix 1, and will involve lifespan studies, and, as outlined above, hematopoietic stem cell transplantation.

4. how many stem cells contribute to blood cell formation during the lifespan of an organism? In this project we will assess how many stem cells contribute to blood cell formation after transplantation. For this purpose, hematopoietic stem cells will be isolated from donor mice or human cord blood, these cells will be lenti- or retrovirally transduced using vectors that are DNA barcoded (and in addition may or may not contain sequences encoding for genes of interest), after which transduced stem cells will be (xeno-) transplanted in properly conditioned recipients. Blood cell chimerism and barcode composition will be evaluated at various time points after transplant (Appendix 2). Upon termination of the experiment, mice are sacrificed to document barcode contribution in different cell types in various hematopoietic organs.

5. how many stem cells contribute to leukemia, and are different leukemic stem cells differentially sensitive to drugs? Similar to the question as to how many stem cells contribute to normal blood cell development, we are also very much interested in how many leukemic stem cells maintain a tumor, ie how clonally diverse are cancer cells in one individual? In these studies we will barcode murine stem cells with a gene of interest, and similar as explained above, assess barcode composition upon transplanting modified cells in syngenic recipients. In addition, we will lentivirally barcode tumor cells from patients, and transplant these xenogeneically in immune deficient recipients. In all recipients chimerism levels will be assessed in blood at repeated time intervals, and at sacrifice in multiple hematopoietic organs (see Appendix 2 for more details).

These various subprojects will be pursued in parallel, and not sequentially. They will all include the same set of animal procedures (Appendix 1, 2, and 3), but the milestones for each project is separate, and milestones are not contingent upon each other. Yet, all projects contribute to the overall aim of the current application, namely to improve our understanding of what makes hematopoietic stem cells age.

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

All projects revolve around the central question as to how blood cell production is regulated and which are the genes that play a central role in this process. If we have found candidate stem cell genes, can we perturb/enhance functioning of hematopoietic stem cells by repressing or overexpressing these genes? Although the coherence between the various projects is therefore obvious, they will not be executed in a predetermined order.

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

Serial number	Type of animal procedure
1	Lifespan studies
2	Stem cell transplantation
3	Genereren nieuwe transgene muizenstammen
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10500	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Rijks Universiteit Groningen	
1.3	List the serial number and type of animal procedure.	Serial number 2	Type of animal procedure Stem cell transplantation

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

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

Stem cell transplantation. The overall primary outcome of the animal procedures described in this Appendix is to assess the functionality of hematopoietic stem cells. This functionality essentially measures how well transplanted test stem cells contribute to blood cell formation. Assessing the functional activity of hematopoietic stem cells requires the transplantation of such cells into the bloodstream of a recipient animal. Pretreatment of the recipient can vary from untreated, mildly treated to heavily treated (lethally irradiated) depending on the research question of the experiment. In most case, recipients are used

whose endogenous hematopoietic system is (temporarily) defect such that infused stem cells have a competitive advantage over endogenous stem cells. Transplanted stem cells will lodge to the bone marrow and re-establish hematopoiesis in the recipient. Transplanted stem cells can be obtained from fetal liver, cord blood, bone marrow, spleen or peripheral blood, and can be freshly isolated, in vitro cultured, or genetically modified. Transplanted stem cells can originate from same strain donor mice (and thus transplanted syngeneically in properly conditioned recipient mice), can originate from different strains (and thus be transplanted in an allogeneic settings), or can originate from human samples (and then be xenogeneically transplanted in immune deficient recipients).

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

Stem cell harvest: Hematopoietic stem cells can be harvested from fetal liver, bone marrow, spleen, or peripheral blood. Harvesting of hematopoietic stem cells requires sacrificing donor mice (or in cases where stem cells are isolated from fetal livers, pregnant mothers) that are otherwise unperturbed. In some experiments hematopoietic stem cells will be (re-)isolated from mice that previously received a stem cell transplantation.

Stem cell transplantation:

Recipient mice will be prepared for stem cell transplantation using total body irradiation or chemotherapy. The dose of TBI or chemotherapy will depend on the genetic background of the recipient. In some experiments we will use immune deficient hosts, which typically are radiosensitive and will therefore receive a low dose of radiation. For regular strains of mice (we will most often use C57BL/6 mice) the radiation dose needs to be much higher to efficiently deplete endogenous stem cells. We will also (explore the) use of strains of mice that do not require any irradiation or other pretreatment. Irradiation is a very effective way of host conditioning and will be (and has been) the preferred method. However, in some instances it may be useful to avoid radiation and administer recipient mice with chemotherapy, such as busulfan, or cyclophosphamide. This is particularly relevant if we want to avoid radiation of non-hematopoietic organs, such as liver, brain, and intestine, which cannot be avoided during total body irradiation. The protocol to condition mice with these cytotoxic drugs is well established (for example: *Down JD, Boudewijn A, Dillingh JH, Fox BW, Ploemacher RE. Br J Cancer. 1994 Oct;70(4):611-6. Relationships between ablation of distinct haematopoietic cell subsets and the development of donor bone marrow engraftment following recipient pretreatment with different alkylating drugs*) Within 24 hrs after conditioning mice will receive a stem cell transplantation. This requires mice to be anesthetized and involves intravenous administration of a volume of ~100-200 µl, containing the stem cells. After transplantation mice will be prophylactically treated with antibiotics for a period of 2 weeks. After 2 weeks the hematopoietic system has typically recovered and antibiotic treatment can be suspended. In some cases it has been shown that transplantation directly into the bone marrow generates the best results, e.g. in the xenogeneic setting. To this end, a smaller volume (20 µl) will be injected directly into the femur of anaesthetized recipient mice.

To assess the functioning of the transplanted stem cells we will collect small volumes of peripheral blood at regular intervals, typically every 4-6 weeks. Mice will mostly be analyzed for at least 20 weeks, but some experiments may require longer periods of follow up with a maximum of one year. In some experiments bone marrow biopsies will be taken from previously transplanted recipients. This requires puncturing the femur and isolating a small volume of bone marrow cells (~50 µl) from a fully anesthetized mouse.

In some experiments mice will be transplanted with stem cells that have been genetically manipulated. In some instances such genetically manipulated stem cells originate from genetically modified donor mice. In most cases in which genetically altered stem cells will be transplanted to recipient mice the stem cells have been transduced with retro- or lentiviral vectors which encode for a gene of interest or carry a DNA tag (barcode) to allow for clonal analysis.

Administration of compounds: In some experiments the genes that were manipulated in transplanted stem cells may cause leukemia in the recipient. In other cases we will transplant leukemic cells, either from murine or from human origin. In these experiments recipient mice may be treated with compounds that affect disease progression. Typically, these compounds are drugs that may affect cell proliferation, either existing or novel. In addition, in some experiments mice may be treated with novel growth factors, cytokines, hormones, specific inhibitors or other biological compounds. The route of administration of compounds will vary from experiment to experiment, but may include subcutaneous, intraperitoneal, and intravenous administration. For

subcutaneous administration requiring a stable, permanent release of the compound, implantable osmotic mini-osmotic pumps may be used.

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

In most experiments we will be comparing 2 groups of mice that have received 'control' or 'test' stem cells. The size of the effect is impossible to predict in most experiments, at least when we carry out a specific experiment for the first time. Our approach has been and will be to perform first a pilot experiment in which we have 5 mice in each experimental group. Depending on the size of the effect we repeat the experiment at least twice and maximally 4 times, using completely independently isolated test stem cells. The number of recipient mice can then be calculated based upon the observed effect in the pilot. This strategy will allow us to early detect biologically relevant effects, while at the same time minimizing the number of mice used as recipients.

B. The animals

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

As recipients we will only use mice, albeit of multiple strains. These include wild type C57BL/6 mice, congenic C57BL/6.CD45.1 mice, C57BL/6 x C57BL/6.CD45.1 F1 mice, C-kit deficient W/W^v mice, C-kit deficient W/W^v.CD45.1 mice, immune deficient NSG mice, and potentially other immune deficient strains. As donor mice we will use wild type C57BL/6 mice, congenic C57BL/6.CD45.1 mice, or DBA/2 mice. Most mice will be purchased from commercial vendors, some strains will be bred in the local UMCG animal facility, and some strains will (at least initially) be obtained from collaborating labs. Recipient mice will be young adults, typically between 10 weeks and 4 months old. We prefer to use female mice as we transplant donor stem cells in multiple recipient models, we want to avoid the confounding effects of sex-mismatch. However, at the same time we will make use of available mice most optimally, so if at instances only male mice are available, we will use these.

In the last 5 years we have carried out ~1000 stem cell transplantation per year, in which on average some 10 different genes or conditions were tested (ie 100 recipient mice are required to test the activity of one stem cell gene, compared to controls). Based upon the research objectives explained in the main project proposal form, we do expect that the collective research activities of our lab in the upcoming 5 years will be comparable to what we have done in the last 5 years, and we therefore expect to evaluate some 40 different genes/conditions in a timeframe of 5 years. We typically transplant test stem cells in different concentrations and conditions to 80 primary or secondary recipient mice, and compare this with effects in 20 control mice. This results in the anticipated use of 100 recipient mice x 8 test conditions = 800 recipient mice per year. Over a period of 5 years we anticipate therefore to use 4000 recipient mice. We typically need 1 donor mouse per 4 recipient mice, to isolate sufficient stem cells. Although this donor-recipient ratio varies from experiment to experiment, and can vary from a 1:1 to a 1:20 ratio, a 1:4 ratio is the average number. This implies that we foresee to use 1000 donor mice in a period of 5 years. Collectively, these experiments will therefore use 1000 + 4000 = 5000 mice.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

☒ No, continue with question D.

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

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

☐ No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: Functional studies in the field of experimental hematology rely essentially exclusively on mice, and this species is therefore the preferred model system.

Reduction: The overall number of animals is based on the track record of the lab in the last 5 years. Due to inherent biological variation we typically transplant ~5 mice per tested stem cell population. This number allows for detection of a biological meaningful effect in a single experiment.

Refinement: For the various transplantation scenarios we will need genetically distinct strains of mice. Most experiments will use congenic recipients, but in cases where human cells will be transplanted we will use immunodeficient hosts. Immunodeficient hosts may also be used for genetically diverse donors (BxD recombinant inbred) which need to be compared in a common recipient strain. Stem cell transplantations have been carried out by my lab for over 15 years; although each particular experiment is a little different, and the exact experimental protocol varies (for example, with respect to cell dose, whether competitor cells are cotransplanted etc), the basic procedure is routine and follows internationally acceptable strategies.

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

Transplanted mice that are pre-irradiated with a high dose, will be kept on antibiotic prophylaxis in the drinking water from one day before irradiation until 10-14 days after the transplant, during a time when the animals are susceptible to infections due to a low white blood cell count (as a result of the conditioning regime, ie total body irradiation or high dose chemotherapy). To refine these experiments further, recipient mice are housed in IVC cages until they have recovered from the irradiation and transplantation procedures and are also carefully monitored (weighed and observed for activity or other symptoms of illness). No other measurements are typically taken, nor are these necessary. The large majority of animals will not suffer from pain or fear. Mice that develop overt leukemia will be sacrificed, or will be treated with chemotoxic drugs in some experiments before they are expected to become sick. The administration of these compounds is typically well tolerated if the appropriate dosing is used, and is not associated with pain or fear.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

Obviously, we are very well aware of what sorts of experiments our competitors, elsewhere in the world, are performing. We will only embark on novel stem cell transplantations if, to the best of our knowledge, these or very similar experiments are not being carried out elsewhere.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

☒ No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

☒ No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☐ No > Continue with question I.

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

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

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

Anaesthesia, Isoflurane/air/oxygen is used for iv injections, blood draws and sacrifice by cervical dislocation.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

fatigue, increased susceptibility to infections, weight loss, diarrhea

Explain why these effects may emerge.

Shortly after total body irradiation mice will display low blood cell counts. If the transplanted stem cells do not function properly, or delayed, animals will present with low red blood cell counts and platelets, which may lead to further anemia. The reduction of white blood cell counts renders mice susceptible to infections. To refine these experiments, recipient mice are housed in IVC cages until they have recovered from the irradiation and transplantation procedures and are also carefully monitored. In some experiments mice may develop leukemia. Leukemia is also associated with a loss of functional mature blood cells, and the symptoms are therefore not different that described above. Mice will be kept for no longer than 12 months post-transplant.

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

A prophylactic administration of antibiotics typically is very effective in preventing infections. In our long history of stem cell transplantation we lose animals only very rarely. Mice that develop overt leukemia will be euthanized.

J. Humane endpoints

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

☐ No > Continue with question K.

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

cachexia, lethargic behavior

Indicate the likely incidence.

Less than 5% in experiments in which wild type stem cells are transplanted. In experiments in which genetically modified, or primary leukemic stem cells are transplanted, this incidence is obviously much higher, and can be up to 100%

K. Classification of severity of procedures

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

mild in 90% of the proposed experiments, moderate in the remaining 10%, donors will be in the category 'non-recovery'

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No > Continue with Section 3: 'signatures'.

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

Mice will not be killed after the stem cell transplantation as such, but at the end of the experiments we will also assess how the transplanted stem cells perform in the bone marrow, which requires sacrificing mice.

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

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

☒ Yes



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10500	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Rijks Universiteit Groningen	
1.3	List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
		1	Lifespan studies

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

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

Lifespan studies. The primary outcome parameter of these experiments is to record lifespan measurements of different strains of mice. Secondary outcome parameters of these experiments are the correlation these lifespan statistics with functioning of the hematopoietic stem and progenitor cell pool. We will test the hypothesis that long-lived mouse strains have superior stem cell functioning compared to short-lived strains. Studies will start with cohorts of (recombinant) inbred strains of mice, from which at selected intervals a small number of mice will be terminated to evaluate changes in frequencies and

functioning of the hematopoietic stem cell pool.

In order to obtain hematopoietic stem and progenitor cells from mice of different ages, mice will be aged without further intervention. At selected timepoints animals will be sacrificed and cells and tissues will be isolated.

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

Animals will be aged without any intervention. Cohorts of mice will be sacrificed between 4-6 months of age, 12-14 months of age, and 22-26 months of age.

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

For each strain we will start an aging cohort of approximately 40 individual mice. At the three timepoints indicated above 5 mice will be removed from the cohort. We will need 5 mice per strain and timepoint in order to be able to obtain a sufficient number of hematopoietic stem cells. We are typically able to purify by flowcytometry ~ 10,000 hematopoietic stem cell from an individual mouse. To perform biochemical, genetic, and functional studies we need (at current) at the very least ~50,000 stem cells. From the cohort of 40 mice, 25 mice will remain to collect lifespan measurements. Typical lifespan studies in the literature use somewhat higher numbers of mice per cohort (ranging between 30-50 mice per experiment). However, in addition to wildtype C57BL/6 and DBA/2 mice, we plan to age so-called recombinant inbred BXD mice. The use of these mice allows for particular statistical considerations, explained below.

B. The animals

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

We plan to use female C57BL/6 and DBA/2 mice, and a large panel of so-called BXD recombinant inbred mice. The family of BXD strains is commercially available and comprises of ~150 fully inbred strains in which just over 5.2 million maternal C57BL/6 and paternal DBA/2 common sequence variants (SNPs, indels, CNVs, inversions) segregate. As each of the 150 strains is fully inbred, the collective family constitutes a permanent genetic reference panel, of which each strain/genotype can be repeatedly phenotyped. As we propose to embark on ageing studies, the BXD family enable us to age entire cohorts of genetically identical individuals—impossible with more classical F2 generation progeny, where each individual mouse is unique and no mean lifespan studies can be executed. All mice used will be either purchased from the Jackson Laboratory, or will be shared from collaborating scientists.

As pointed out above, we aim to establish cohorts of 40 mice from 100 strains selected from the available cohort of 150 strains. Five mice will be sacrificed at an age of 3-4 months, another 5 will be sacrificed at 12-14 months of age, 5 mice will be used at an age of 24-26 months, and the remaining (~25) mice will be used to establish lifespan/survival statistics. Some strains may not live to the age of 2 years, and those will be sacrificed when only 5 mice from the cohort remain. We plan to use female mice only. Although there is no reason to suspect that hematopoiesis is fundamentally different in males vs female mice, for logistical reasons (to avoid sex-mismatched stem cell transplants) we have historically only used female mice. There are sex-differences in lifespan, but there is no reason to assume that these are caused by differences in stem cell behavior.

The survival curves will be established with relatively few mice (on average 25 female mice/strain, but sometimes fewer). Although this is a lower number than used in studies where survival statistics for genetically modified mice are compared with wild type mice, in the BXD panel we will actually be able to compare for any of the 5.2 million genetic variants that segregate in all 100 strains whether and which the B6 or DBA allele is associated with differences in lifespan. Therefore, by pooling mice with identical haplotypes at a given locus we have ~ in total 50 strains and ~ 25 mice/genotype to test for lifespan effects, increasing the statistical power substantially, and allowing us to use 'only' 25 strains for lifespan measurements.

In total we estimate to use 4100 mice for these studies (100 BXD strains x 40 animals/strain = 4000 mice + 50 C57BL/6 + 50 DBA/2 parental strains)

C. Re-use

Will the animals be re-used?

☒ No, continue with question D.

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

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

☐ No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: We will not be able to replace in vivo stem cell functioning experiments with in vitro assays, as stem cell activity is defined by functioning of stem cells after transplant.

Reduction: The use of BXD mice, in which only 2 alleles segregate at any polymorphic locus, allows to perform lifespan studies with relatively few mice per strain. The BXD mice are a perfect genetic reference panel to perform the proposed studies. A small collection of these mice has been used by us before and has led to multiple high profile publications, documenting the power of the approach. We will use the minimal number of mice needed to obtain sufficient biological material (hematopoietic stem cells).

Refinement: By pooling mice with identical haplotypes at a given locus, we have ~ in total 50 strains and ~ 25 mice/genotype to test for lifespan effects, increasing the statistical power substantially, and allowing us to use 'only' 25 strains for lifespan measurements.

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

Animals will be housed in IVC racks without any intervention, so suffering will be minimal, and most often absent Mice will be carefully monitored using the monitoring system designed for aging mice in the Mouse Clinic for Cancer And Aging (MCCA) within our institute.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

We have established collaborations with the two labs that are also using the BXD mice [REDACTED] to avoid pertinent duplication.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

☒ No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

☒ No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☐ No > Continue with question I.

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

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

Mice that develop discomfort in the course of the natural ageing process will be removed from the cohort

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Mice will be aged naturally, and are therefore expected to develop various age-related symptoms.

Explain why these effects may emerge.

Due to natural aging

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

Mice will be inspected thoroughly throughout their lifespan and overt diseased animals will be removed from the cohort.

J. Humane endpoints

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

☐ No > Continue with question K.

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

We will monitor persistent loss of weight at monthly intervals, and assess deviant behavior, cachexia and tumor development according to the system set up for MCCA.

Indicate the likely incidence.

For aged mice the incidence of age-associated pathology is (obviously) high. We will implement a careful monitoring routine, most notably towards the end of their natural lifespan. This will involve individual monitoring of deviant behavior, cachexia and tumor development. Mice with visible tumors, mice that display progressive weight loss, and mice which show aberrant motor behavior will be euthanized. These endpoint criteria are difficult to define quantitatively, as the normal aging process is associated with highly variable phenotypes, and require individual monitoring/decision making. We will consult very regularly with the veterinarian, which will allow us to sacrifice most animals prior to the onset of the humane endpoints

K. Classification of severity of procedures

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

95% of the animals are expected to suffer mild levels of discomfort as most will be used in non-recovery experiments without any prior suffering. the remaining animals may develop spontaneous age-associated discomfort, that may be classified as moderate.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No > Continue with Section 3: 'signatures'.

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

Harvesting viable bone marrow cells requires sacrificing of donor mice.

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

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

☒ Yes



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10500	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Rijks Universiteit Groningen	
1.3	List the serial number and type of animal procedure.	Serial number 2	Type of animal procedure Stem cell transplantation

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

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

Stem cell transplantation. The overall primary outcome of the animal procedures described in this Appendix is to assess the functionality of hematopoietic stem cells. This functionality essentially measures how well transplanted test stem cells contribute to blood cell formation. Assessing the functional activity of hematopoietic stem cells requires the transplantation of such cells into the bloodstream of a recipient animal. Pretreatment of the recipient can vary from untreated, mildly treated to heavily treated (lethally irradiated) depending on the research question of the experiment. In most case, recipients are used

whose endogenous hematopoietic system is (temporarily) defect such that infused stem cells have a competitive advantage over endogenous stem cells. Transplanted stem cells will lodge to the bone marrow and re-establish hematopoiesis in the recipient. Transplanted stem cells can be obtained from fetal liver, cord blood, bone marrow, spleen or peripheral blood, and can be freshly isolated, in vitro cultured, or genetically modified. Transplanted stem cells can originate from same strain donor mice (and thus transplanted syngeneically in properly conditioned recipient mice), can originate from different strains (and thus be transplanted in an allogeneic settings), or can originate from human samples (and then be xenogeneically transplanted in immune deficient recipients).

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

Stem cell harvest: Hematopoietic stem cells can be harvested from fetal liver, bone marrow, spleen, or peripheral blood. Harvesting of hematopoietic stem cells requires sacrificing donor mice (or in cases where stem cells are isolated from fetal livers, pregnant mothers) that are otherwise unperturbed. In some experiments hematopoietic stem cells will be (re-)isolated from mice that previously received a stem cell transplantation.

Stem cell transplantation:

Recipient mice will be prepared for stem cell transplantation using total body irradiation or chemotherapy. The dose of TBI or chemotherapy will depend on the genetic background of the recipient. In some experiments we will use immune deficient hosts, which typically are radiosensitive and will therefore receive a low dose of radiation. For regular strains of mice (we will most often use C57BL/6 mice) the radiation dose needs to be much higher to efficiently deplete endogenous stem cells. We will also (explore the) use of strains of mice that do not require any irradiation or other pretreatment. Irradiation is a very effective way of host conditioning and will be (and has been) the preferred method. However, in some instances it may be useful to avoid radiation and administer recipient mice with chemotherapy, such as busulfan, or cyclophosphamide. This is particularly relevant if we want to avoid radiation of non-hematopoietic organs, such as liver, brain, and intestine, which cannot be avoided during total body irradiation. The protocol to condition mice with these cytotoxic drugs is well established (for example: *Down JD, Boudewijn A, Dillingh JH, Fox BW, Ploemacher RE. Br J Cancer. 1994 Oct;70(4):611-6. Relationships between ablation of distinct haematopoietic cell subsets and the development of donor bone marrow engraftment following recipient pretreatment with different alkylating drugs*) Within 24 hrs after conditioning mice will receive a stem cell transplantation. This requires mice to be anesthetized and involves intravenous administration of a volume of ~100-200 µl, containing the stem cells. After transplantation mice will be prophylactically treated with antibiotics for a period of 2 weeks. After 2 weeks the hematopoietic system has typically recovered and antibiotic treatment can be suspended. In some cases it has been shown that transplantation directly into the bone marrow generates the best results, e.g. in the xenogeneic setting. To this end, a smaller volume (20 µl) will be injected directly into the femur of anaesthetized recipient mice.

To assess the functioning of the transplanted stem cells we will collect small volumes of peripheral blood at regular intervals, typically every 4-6 weeks. Mice will mostly be analyzed for at least 20 weeks, but some experiments may require longer periods of follow up with a maximum of one year. In some experiments bone marrow biopsies will be taken from previously transplanted recipients. This requires puncturing the femur and isolating a small volume of bone marrow cells (~50 µl) from a fully anesthetized mouse.

In some experiments mice will be transplanted with stem cells that have been genetically manipulated. In some instances such genetically manipulated stem cells originate from genetically modified donor mice. In most cases in which genetically altered stem cells will be transplanted to recipient mice the stem cells have been transduced with retro- or lentiviral vectors which encode for a gene of interest or carry a DNA tag (barcode) to allow for clonal analysis.

Administration of compounds: In some experiments the genes that were manipulated in transplanted stem cells may cause leukemia in the recipient. In other cases we will transplant leukemic cells, either from murine or from human origin. In these experiments recipient mice may be treated with compounds that affect disease progression. Typically, these compounds are drugs that may affect cell proliferation, either existing or novel. In addition, in some experiments mice may be treated with novel growth factors, cytokines, hormones, specific inhibitors or other biological compounds. The route of administration of compounds will vary from experiment to experiment, but may include subcutaneous, intraperitoneal, and intravenous administration. For

subcutaneous administration requiring a stable, permanent release of the compound, implantable osmotic mini-osmotic pumps may be used.

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

In most experiments we will be comparing 2 groups of mice that have received 'control' or 'test' stem cells. The size of the effect is impossible to predict in most experiments, at least when we carry out a specific experiment for the first time. Our approach has been and will be to perform first a pilot experiment in which we have 5 mice in each experimental group. Depending on the size of the effect we repeat the experiment at least twice and maximally 4 times, using completely independently isolated test stem cells. The number of recipient mice can then be calculated based upon the observed effect in the pilot. This strategy will allow us to early detect biologically relevant effects, while at the same time minimizing the number of mice used as recipients.

B. The animals

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

As recipients we will only use mice, albeit of multiple strains. These include wild type C57BL/6 mice, congenic C57BL/6.CD45.1 mice, C57BL/6 x C57BL/6.CD45.1 F1 mice, C-kit deficient W/W^v mice, C-kit deficient W/W^v.CD45.1 mice, immune deficient NSG mice, and potentially other immune deficient strains. As donor mice we will use wild type C57BL/6 mice, congenic C57BL/6.CD45.1 mice, or DBA/2 mice. Most mice will be purchased from commercial vendors, some strains will be bred in the local UMCG animal facility, and some strains will (at least initially) be obtained from collaborating labs. Recipient mice will be young adults, typically between 10 weeks and 4 months old. We prefer to use female mice as we transplant donor stem cells in multiple recipient models, we want to avoid the confounding effects of sex-mismatch. However, at the same time we will make use of available mice most optimally, so if at instances only male mice are available, we will use these.

In the last 5 years we have carried out ~1000 stem cell transplantation per year, in which on average some 10 different genes or conditions were tested (ie 100 recipient mice are required to test the activity of one stem cell gene, compared to controls). Based upon the research objectives explained in the main project proposal form, we do expect that the collective research activities of our lab in the upcoming 5 years will be comparable to what we have done in the last 5 years, and we therefore expect to evaluate some 40 different genes/conditions in a timeframe of 5 years. We typically transplant test stem cells in different concentrations and conditions to 80 primary or secondary recipient mice, and compare this with effects in 20 control mice. This results in the anticipated use of 100 recipient mice x 8 test conditions = 800 recipient mice per year. Over a period of 5 years we anticipate therefore to use 4000 recipient mice. We typically need 1 donor mouse per 4 recipient mice, to isolate sufficient stem cells. Although this donor-recipient ratio varies from experiment to experiment, and can vary from a 1:1 to a 1:20 ratio, a 1:4 ratio is the average number. This implies that we foresee to use 1000 donor mice in a period of 5 years. Collectively, these experiments will therefore use 1000 + 4000 = 5000 mice.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

☒ No, continue with question D.

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

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

☐ No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: Functional studies in the field of experimental hematology rely essentially exclusively on mice, and this species is therefore the preferred model system.

Reduction: The overall number of animals is based on the track record of the lab in the last 5 years. Due to inherent biological variation we typically transplant ~5 mice per tested stem cell population. This number allows for detection of a biological meaningful effect in a single experiment.

Refinement: For the various transplantation scenarios we will need genetically distinct strains of mice. Most experiments will use congenic recipients, but in cases where human cells will be transplanted we will use immunodeficient hosts. Immunodeficient hosts may also be used for genetically diverse donors (BxD recombinant inbred) which need to be compared in a common recipient strain. Stem cell transplantations have been carried out by my lab for over 15 years; although each particular experiment is a little different, and the exact experimental protocol varies (for example, with respect to cell dose, whether competitor cells are cotransplanted etc), the basic procedure is routine and follows internationally acceptable strategies.

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

Transplanted mice that are pre-irradiated with a high dose, will be kept on antibiotic prophylaxis in the drinking water from one day before irradiation until 10-14 days after the transplant, during a time when the animals are susceptible to infections due to a low white blood cell count (as a result of the conditioning regime, ie total body irradiation or high dose chemotherapy). To refine these experiments further, recipient mice are housed in IVC cages until they have recovered from the irradiation and transplantation procedures and are also carefully monitored (weighed and observed for activity or other symptoms of illness). No other measurements are typically taken, nor are these necessary. The large majority of animals will not suffer from pain or fear. Mice that develop overt leukemia will be sacrificed, or will be treated with chemotoxic drugs in some experiments before they are expected to become sick. The administration of these compounds is typically well tolerated if the appropriate dosing is used, and is not associated with pain or fear.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

Obviously, we are very well aware of what sorts of experiments our competitors, elsewhere in the world, are performing. We will only embark on novel stem cell transplantations if, to the best of our knowledge, these or very similar experiments are not being carried out elsewhere.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

☒ No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

☒ No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☐ No > Continue with question I.

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

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

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

Anaesthesia, Isoflurane/air/oxygen is used for iv injections, blood draws and sacrifice by cervical dislocation.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

fatigue, increased susceptibility to infections, weight loss, diarrhea

Explain why these effects may emerge.

Shortly after total body irradiation mice will display low blood cell counts. If the transplanted stem cells do not function properly, or delayed, animals will present with low red blood cell counts and platelets, which may lead to further anemia. The reduction of white blood cell counts renders mice susceptible to infections. To refine these experiments, recipient mice are housed in IVC cages until they have recovered from the irradiation and transplantation procedures and are also carefully monitored. In some experiments mice may develop leukemia. Leukemia is also associated with a loss of functional mature blood cells, and the symptoms are therefore not different that described above. Mice will be kept for no longer than 12 months post-transplant.

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

A prophylactic administration of antibiotics typically is very effective in preventing infections. In our long history of stem cell transplantation we lose animals only very rarely. Mice that develop overt leukemia will be euthanized.

J. Humane endpoints

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

☐ No > Continue with question K.

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

cachexia, lethargic behavior

Indicate the likely incidence.

Less than 5% in experiments in which wild type stem cells are transplanted. In experiments in which genetically modified, or primary leukemic stem cells are transplanted, this incidence is obviously much higher, and can be up to 100%

K. Classification of severity of procedures

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

mild in 90% of the proposed experiments, moderate in the remaining 10%, donors will be in the category 'non-recovery'

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No > Continue with Section 3: 'signatures'.

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

Mice will not be killed after the stem cell transplantation as such, but at the end of the experiments we will also assess how the transplanted stem cells perform in the bone marrow, which requires sacrificing mice.

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



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1,

9713 AV Groningen

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

T 0900-28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
AVD105002015286

Uw referentie

Bijlagen
1

Datum 02 februari 2016

Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 05 november 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Regulering van differentiatie en zelfvernieuwing van hematopoietische stamcellen' met aanvraagnummer AVD105002015286. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 14 december 2015 en 19 januari 2016 heeft u digitaal gereageerd op onze vragen.

Beslissing

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

Uw aanvraag omvat drie bijlagen dierproeven. De ongeriefsclassificaties voor de studies beschreven in bijlage 3.4.4.1 'Lifespan studies' en bijlage 3.4.4.2 'Stem cell transplantation' zijn in de vergunning, na overleg met de DEC, aangepast. In beide bijlagen heeft u aangegeven dat voor een deel van de dieren het ongerief ingeschat moet worden als 'terminaal'. Het doden van dieren voor het isoleren van organen zonder voorgaande handelingen wordt echter geclassificeerd als licht ongerief.

Aan deze vergunning zijn de voorwaarden verbonden zoals genoemd in de vergunning en hieronder toegelicht.

1) U heeft aangegeven voor dierproeven 3.4.4.1 en 3.4.4.2 met name vrouwelijke dieren te willen gebruiken. Uw overwegingen voor het gebruik van voornamelijk vrouwelijke dieren in deze dierproeven heeft u ook in uw aanvraag toegelicht. De redenen hiervoor zijn voornamelijk logistiek van aard: het voorkomen van 'sex-mismatched' stamceltransplantaties. U geeft zelf echter al aan dat er geen reden is om aan te veronderstellen dat er geslachtsafhankelijke verschillen in stamcelfunctionaliteit zijn. U geeft ook aan optimaal gebruik te willen maken van beschikbare dieren en om die reden voor dierproef 3.4.4.2 soms ook mannelijke dieren te gebruiken. Wij zijn het met u eens dat er geen reden is om te veronderstellen dat er verschillen zijn tussen hematopoietische stamcellen van mannelijke en vrouwelijke dieren. Voor het voorkomen van 'sex-mismatched' stamcel transplantaties is het echter niet noodzakelijk om alleen één geslacht te gebruiken.

Mannelijke als vrouwelijke dieren moeten daarom in dierproeven 3.4.4.1 en 3.4.4.2 in evenredige aantallen gebruikt worden. Het blijft wel toegestaan de proeven zodanig op te zetten dat sex-mismatched' stamcel transplantaties voorkomen kunnen worden. U kunt een pilot uitvoeren waarin onderzocht wordt of het gebruik van beide geslachten mogelijk is. De uitkomst van deze pilot kan voor de CCD aanleiding zijn om bovenstaande voorwaarde van gelijk gebruik van beide geslachten te wijzigen of in te trekken. Deze voorwaarde is toegevoegd om het aantal in voorraad gedode dieren te beperken.

2) Hierbij geldt de algemene voorwaarde zoals genoemd in de vergunning.

U kunt met uw project 'Regulering van differentiatie en zelfvernieuwing van hematopoietische stamcellen' starten. De vergunning wordt afgegeven van 02 februari 2016 tot en met 30 september 2020.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies gevoegd van de Dierexperimentencommissie DEC-RUG d.d. 13 oktober 2015. De DEC heeft op 13 januari 2016 aanvullend geadviseerd naar aanleiding van een vraag over de ongeriefclassificaties in dierproeven 3.4.4.1 en 3.4.4.2. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet. We nemen het advies van de Dierexperimentencommissie grotendeels over met uitzondering van de afwijkingen zoals hierboven gemotiveerd. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving liggen ten grondslag aan dit besluit.

Ter informatie

Wij signaleren dat in onderdeel D van de bijlage dierproeven niet in voldoende mate is uitgewerkt waarom de doelstellingen van het project niet kunnen worden behaald zonder gebruik te maken van dieren. De CCD heeft dankzij beschikbare kennis binnen de commissie op het gebied van hematopoietische stamcellen desondanks toch een oordeel kunnen vormen over uw aanvraag.

Wij verzoeken u in toekomstige projectvergunningsaanvragen in onderdeel D van de bijlage dierproeven aan te geven welke andere mogelijkheden voor vervanging u heeft overwogen en te beargumenteren waarom u deze mogelijkheden niet geschikt acht. Daarnaast dient u uitgebreider te onderbouwen waarom het met deze proef beoogde doel niet kan worden bereikt zonder gebruik te maken van dieren.

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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

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

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

Meer informatie

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

De Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



Ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Dit besluit is genomen met inachtneming van het Besluit mandaat, volmacht en machtiging van de Centrale Commissie Dierproeven CCD 2014 zoals de Centrale Commissie Dierproeven heeft vastgesteld op 19 december 2014, ref 2014-04 en is gepubliceerd in de Staatscourant van 2 januari 2015, Nr. 163

Bijlagen

- Vergunning

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



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Rijksuniversiteit Groningen
Postbus: A. Deusinglaan 1
Postcode en woonplaats: 9713 AV Groningen
Deelnemersnummer: 10500

deze projectvergunning voor het tijdvak 02 februari 2016 tot en met 30 september 2020, voor het project 'Regulering van differentiatie en zelfvernieuwing van hematopoietische stamcellen' met aanvraagnummer AVD105002015286, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-RUG. Hierbij is afgeweken van het DEC-advies, omdat de CCD van mening is dat voor het beantwoorden van de onderzoeksvragen zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt kunnen worden. In aanvulling op het DEC advies is een algemene voorwaarde opgenomen in de vergunning. In overleg met de DEC zijn de ongeriefsclassificaties in bijlage 3.4.4.1 'Lifespan studies' en bijlage 3.4.4.2 'Stem cell transplantation' aangepast.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 05 november 2015
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 05 november 2015 en 27 november 2015, een herziene bijlage 3.4.4.1, zoals ontvangen op 02 februari 2016 en een herziene bijlage 3.4.4.2, zoals ontvangen op 19 januari 2016 en 02 februari 2016;
 - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 05 november 2015 en een herziene NTS, zoals ontvangen per digitale indiening op 02 februari 2016;
 - c. Advies van Dierexperimentencommissie, zoals ontvangen per digitale indiening op 05 november 2015;
 - d. Aanvullende informatie aanvrager, zoals ontvangen per digitale indiening op 14 december 2015 en 19 januari 2016;
 - e. Aanvullend advies DEC, zoals ontvangen per digitale indiening op 13 januari 2016.

Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
Lifespan studies	Muizen	4100	Licht
Stem cell transplantation	Muizen Donordieren Ontvanger dieren	1000 4000	Licht Licht 90%, Matig 10%
Genereren nieuwe transgene muizenstammen	Muizen	480	Licht

Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 Wet zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen.

- 1) Mannelijke als vrouwelijke dieren moeten in evenredige aantallen gebruikt worden. Het blijft wel toegestaan de proeven zodanig op te zetten dat sex-mismatched' stamcel transplantaties

voorkomen kunnen worden. Indien de aanvrager van mening is dat bij gebruik van beide geslachten de doelstellingen toch niet gehaald kunnen worden, mag de aanvrager de uitkomsten van de eerste onderzoeken waarbij beide geslachten gebruikt worden rapporteren aan de CCD. De uitkomst van deze eerste onderzoeken kan voor de CCD aanleiding geven om bovenstaande voorwaarde van gelijk gebruik van beide geslachten voor deze projectvergunning te wijzigen of in te trekken.

Algemene voorwaarde

- 1) In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

Volgens artikel 10c van de Wet op de dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g. Uit artikel 10b volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b schrijft voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister van Economische Zaken een ontheffing is verleend.

Verzorging

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de Instantie voor dierenwelzijn.

Pijnbestrijding en verdoving

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn 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 blijven schade

zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

Volgens artikel 13b moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

Uit artikel 13c 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 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.