

	Inventaris Wob-verzoek W16-16S								
		wordt verstrekt			weigeringsgronden				
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2016465								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel oud				x			x	
3	Niet-technische samenvatting oud			x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1 oud				x		x	x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2 oud				x			x	
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3 oud				x		x	x	
7	DEC-advies				x		x	x	
8	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
9	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x	x	
10	Projectvoorstel herzien				x			x	
11	Niet-technische samenvatting herzien	x							
12	Bijlage beschrijving dierproeven 1 herzien				x		x	x	
13	Bijlage beschrijving dierproeven 2 herzien				x			x	
14	Bijlage beschrijving dierproeven 3 herzien				x		x	x	
15	Reactie verzoek aanvulling 12-5-2016				x		x	x	
16	Advies CCD		x						x
17	Beschikking en vergunning				x		x	x	

17 MAART 2016



Centrale Commissie Dierproeven

AVD 105002016465

Aanvraag

Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	☒ Ja > Vul uw deelnemernummer in 10500 ☐ Nee > U kunt geen aanvraag doen																
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table><tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td>Rijksuniversiteit Groningen</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td></td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>01179037</td></tr><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>A. Deusinglaan 1, </td></tr><tr><td>Postbus</td><td></td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>9713AV GRONINGEN</td></tr><tr><td>IBAN</td><td></td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td></td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	Rijksuniversiteit Groningen	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde		KvK-nummer	01179037	Straat en huisnummer	A. Deusinglaan 1,	Postbus		Postcode en plaats	9713AV GRONINGEN	IBAN		Tenaamstelling van het rekeningnummer	
Naam instelling of organisatie	Rijksuniversiteit Groningen																	
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde																		
KvK-nummer	01179037																	
Straat en huisnummer	A. Deusinglaan 1,																	
Postbus																		
Postcode en plaats	9713AV GRONINGEN																	
IBAN																		
Tenaamstelling van het rekeningnummer																		
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>																	
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td></td><td>☒ Dhr. ☐ Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>Universitair docent</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td></td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td></td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters		☒ Dhr. ☐ Mw.	Functie	Universitair docent		Afdeling			Telefoonnummer			E-mailadres			
(Titel) Naam en voorletters		☒ Dhr. ☐ Mw.																
Functie	Universitair docent																	
Afdeling																		
Telefoonnummer																		
E-mailadres																		
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td></td><td>☐ Dhr. ☒ Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>Universitair docent</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td></td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td></td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters		☐ Dhr. ☒ Mw.	Functie	Universitair docent		Afdeling			Telefoonnummer			E-mailadres			
(Titel) Naam en voorletters		☐ Dhr. ☒ Mw.																
Functie	Universitair docent																	
Afdeling																		
Telefoonnummer																		
E-mailadres																		

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- | | | |
|-----------------------------|---------------------|---|
| (Titel) Naam en voorletters | [Redacted] | ☒ Dhr. ☐ Mw. |
| Functie | Universitair docent | |
| Afdeling | [Redacted] | |
| Telefoonnummer | [Redacted] | |
| E-mailadres | [Redacted] | |
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- | | |
|--|---|
| ☒ Ja | > Stuur dan het ingevulde formulier <i>Melding Machtiging</i> 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 - 4 - 2016 |
| Einddatum | 31 - 3 - 2021 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- | |
|----------------------------------|
| De rol van aneuploidie in kanker |
|----------------------------------|
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- | |
|----------------------------------|
| De rol van aneuploidie in kanker |
|----------------------------------|
- 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 | A. Deusinglaan 1, [Redacted] |
| E-mailadres | secrdec.umcg@umcg.nl |

4 Betaalgegevens

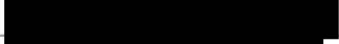
- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- ☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1441 Lege
- ☐ Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- ☐ Via een eenmalige incasso
- ☒ Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

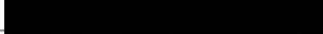
5 Checklist bijlagen

- 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 16-03-2016

Handtekening 



Format Projectvoorstel dierproeven

- Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie over het projectvoorstel 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.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul de titel van het project in.

2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*
- ☒ 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 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2 aangekruiste categorieën.

- Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn.
- Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en).
- Geef in geval van 'hoger onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

Elke celdeling wordt ons erfelijk materiaal gerepliceerd en verdeeld over de twee nieuwe ontstane dochtercellen. Soms maken cellen een fout bij het verdelen van de chromosomen en ontstaan er twee cellen met een afwijkende hoeveelheid DNA. Dit proces noemen we chromosomale instabiliteit; de cellen met afwijkende hoeveelheden chromosomen noemen we aneuploïde. Kankercellen maken dit soort van fouten frequent en **twee van de drie tumoren zijn dan ook aneuploïde**. Omdat de omliggende gezonde cellen zelden tot niet aneuploïde zijn, vormt aneuploidie een veelbelovend aangrijppunt voor kankertherapie. Om tot zulke therapie te kunnen komen, moeten we eerst beter begrijpen waarom de meeste kankers aneuploïde zijn en dus wat de gevolgen zijn van aneuploidie voor het ontstaan van kanker.

Hiertoe zijn in de afgelopen 15 jaar diverse muismodellen gemaakt waarin systemisch (dus in alle weefsels van de muis) aneuploidie werd geprovoceerd. In deze modellen werden genen uitgeschakeld in het 'mitotic spindle checkpoint', een mechanisme dat in mitose bepaalt of alle chromosomen correct gebonden zijn aan de mitotische spoel. Het inactiveren van dit mechanisme leidt tot frequente fouten in de chromosoomverdeling en dus tot aneuploidie. Het systemisch inactiveren van genen in het mitotic spindle checkpoint leidt in alle gevallen tot vroege embryonale letaliteit (~E6.5). Heterozygote dieren lieten milde aneuploidie zien en in sommige gevallen een iets verhoogde frequentie van kankers (als de dieren een kankerpredispositie lieten zien, ontwikkelde ongeveer 1/3 van de dieren tumoren na 18-24 maanden) (zie voor review: [redacted]). In veel gevallen waren deze dieren wel gevoeliger voor geïnduceerde kankers (bijvoorbeeld door het inactiveren van [redacted] of het blootstellen aan carcinogene stoffen). Samengevat hebben deze modellen ons geleerd dat chromosomale instabiliteit kanker versnelt maar dat het (in de muis) geen primaire oorzaak is van kanker. Verder lieten enkele van de modellen versnelde veroudering zien, wat suggereert dat aneuploidie ook gerelateerd is aan veroudering. Ondanks dat deze modellen wel de relatie tussen aneuploidie, kanker en veroudering hebben geschetst, zijn deze modellen minder geschikt om de moleculaire gevolgen van aneuploidie in kanker te onderzoeken, omdat de tumoren in deze modellen zeldzaam zijn, in diverse weefsels ontstaan en pas laat in het leven van de muis. Om in deze modellen de gevolgen van aneuploidie in kaart te brengen zouden onnodig veel dieren nodig zijn.

Wij hebben daarom conditionele knockout (cKO) muizen gemaakt, waarin we in weefsels naar keuze het mitotic spindle checkpoint kunnen uitschakelen ([redacted]) of verzwakken ([redacted] cKO). Middels deze modellen onderzoeken we wat de moleculaire gevolgen zijn van aneuploidie voor weefselontwikkeling, en verder hoe aneuploidie leidt tot kanker. In deze modellen kunnen we ernstige aneuploidie veroorzaken op weefselniveau en op deze wijze hebben we een tumormodel (T-cell acute lymphoblastic lymphoma) kunnen ontwikkelen, waarin 100% van de muizen binnen 3 maanden [redacted] ([redacted]) of 4 maanden [redacted]) aneuploïde lymphomen ontwikkelen. Dankzij deze modellen hebben we een zeer reproduceerbaar en gedefinieerd tumorcohort kunnen genereren, en kunnen we beter de moleculaire gevolgen van aneuploidie in kaart brengen.

Zoals de eerdere modellen al suggereerden, laten ook onze modellen zien dat chromosomale instabiliteit alleen niet voldoende is voor kanker. We hebben dit

laten zien in T-cellen (), de lever () en de huid (), wat aangeeft dat aneuploïde cellen nog extra mutaties nodig hebben om te transformeren in aneuploïde kankercellen. Daarnaast hebben we gevonden dat verschillende celtypen op verschillende wijze omgaan met aneuploidie. Zo blijken T-cellen (), levercellen () en basal epidermal cells () vrij goed tegen aneuploidie te kunnen, in tegenstelling tot bijvoorbeeld de bulge stamcellen van de huid, die in de haarfollikel liggen (). Dit laatste type cellen gaat net als cellen in weefselweek relatief snel dood (Kops et al, PNAS, 2004 Jun 8;101(23):8699-704) t.g.v. aneuploidie. Dit geeft aan dat de verschillende celtypen op verschillende wijze omgaan met aneuploidie en benadrukt het belang van weefselspecifieke knockouts om te komen tot therapieën die selectief aneuploïde kankers aanpakken.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

- In het geval het project gericht is op één of meer onderzoeksdoelen: op welke vraag(en) dient dit project antwoord(en) te verschaffen?
- In geval het een ander dan een onderzoeksdoel betreft: in welke concrete behoefte voorziet dit project?

Ondanks dat twee van de drie kankers aneuploïde zijn, leidt aneuploidie in weefselweek tot een groeinadeel, niet een groeivoordeel (Kops GJPL et al, Proc Natl Acad Sci USA. 2014;101:8699–704); (Williams BR, et al Science; 2008; 322:703–709). Dit suggereert dat aneuploïde kankercellen zich aan hebben weten te passen aan de nadelen van aneuploidie. Dit betekent ook, dat als we beter begrijpen hoe aneuploïde kankercellen omgaan met de (nadelige) gevolgen van aneuploïde, we mogelijk kunnen komen tot manieren om aneuploïde kankercellen selectief te doden, het lange-termijn doel in mijn lab. Daarvoor moeten we in eerste instantie beter begrijpen hoe kankercellen en niet-kwaadaardige cellen omgaan met aneuploidie. Hiervoor hebben we conditionele knockout allelen gegenereerd (voor () en ()) waarmee we aneuploidie kunnen provoceren op weefselspecifiek niveau. Deze modellen stellen ons, in tegenstelling tot de vroegere modellen, in staat om gestructureerd te onderzoeken hoe weefsels en tumoren omgaan met aneuploidie en hoe dit leidt tot kanker (). We onderzoeken hoe cellen aneuploïde worden, hoe aneuploidie cellen helpt om kwaadaardig te worden en wat de fysiologische gevolgen zijn van aneuploidie. Hiertoe stellen we in eerste instantie **drie vragen**:

1. Wat zijn de gevolgen van aneuploidie voor 'niet-kankercellen'? Om deze vraag te beantwoorden brengen we de gevolgen van aneuploidie in kaart in diverse weefsels (bijv. huid, lever, bloed, hersenen, mamma, darm). Hiervoor maken we gebruik van onze bestaande conditionele knockout allelen () en () gecombineerd met weefselspecifieke Cre-drivers achtergronden en zullen we vergelijken hoe verschillende weefseltypen omgaan met de gevolgen van aneuploidie. Hiertoe zullen we dieren volgen in de tijd en op verschillende tijdstippen (maximaal tot een leeftijd van 18 maanden) opofferen en de weefsels in detail analyseren (transcriptome, proteome, epigenome, etc.) Een van de mogelijke gevolgen van aneuploidie is versnelde veroudering (zie ook het werk van ()). We zullen de relatie tussen aneuploidie, veroudering en kanker dan verder onderzoeken als onderdeel van deze vraag door te bepalen of het aneuploïde weefsel (en mogelijk omliggende weefsels) verouderings-pathologie laten zien (stamceldepletie, neurodegeneratie, lineage skewing, weefseldegeneratie, etc.). We zullen de aneuploidie-geïnduceerde pathologie vergelijken met 'normaal' verouderde muisweefsels, te verkrijgen uit de *Mouse Clinic for Cancer and Ageing*.
2. Wat is de rol van aneuploidie in het ontstaan en de voortgang van kanker? Om deze vraag te beantwoorden, stellen we een drietal deelvragen:

- a. *Welke veranderingen in de cel maken van aneuploïde cellen aneuploïde kankercellen?* Chromosomale instabiliteit alleen is niet voldoende om efficiënt kanker te provoceren in de muis en daarnaast leidt chromosomale instabiliteit in niet getransformeerde cellen tot een groeinadeel en geen groeivoordeel. Om beter te begrijpen welke genen belangrijk zijn om van een aneuploïde cel een aneuploïde kankercel te maken, willen we *in vivo* weefsel-specifieke transposonscreens uitvoeren in een aneuploïde achtergrond, waarbij we aneuploïde cellen *in vivo* mutageniseren met transposons (induceerbaar PiggyBac transposonsysteem, (Rad et al, Nat. Gen. 2015 Jan;47(1):47-56)). PiggyBac is een transposon dat met PiggyBac transposase te mobiliseren is en dan random integreert. Het construct dat we gebruiken zal bij integratie in of nabij een gen leiden tot inactivatie of activatie van dat gen (afhankelijk van waar het integreert). De PiggyBac transposonlijnen hebben voordat PiggyBac transposase actief is een tandem van transposons geïntegreerd op 1 chromosoom, waar ze niets doen. Als PiggyBac transposase geactiveerd wordt, mobiliseren de transposons en integreren ze random in het genoom van de hostcellen, wat daardoor gemutageniseerd wordt. Omdat PiggyBac transposase door Cre-recombinase geactiveerd wordt, kunnen we de mutagenese beperken tot de weefsels waarin we de aneuploïdie provoceren. Omdat we verschillen zien in hoe weefsels reageren op genomische instabiliteit, willen we deze screens ook uitvoeren in verschillende weefsels (bloed, hersenen, huid, darm, etc.). Hiertoe worden conditional aneuploïde mutanten ingekruist met het induceerbaar PiggyBac transposonsysteem en verschillende Cre-drivers om weefsel-specificiteit te bewerkstelligen. Cohorten dieren worden dan gevolgd op het ontstaan van tumoren en geëuthanaseerd zodra ze ziek worden. Tumoren worden vervolgens geïsoleerd en geanalyseerd op waar de transposons geïntegreerd zijn, gevolgd door moleculair (*in vitro*) onderzoek, wat uiteindelijk *in vivo* gevalideerd dient te worden zoals beschreven onder 2c.
- b. *Hoe gaan diverse typen kankercellen om met (de gevolgen van) aneuploïdie?* Ons voorafgaand werk heeft aangetoond dat aneuploïdie in T-cellen niet voldoende is voor kanker, maar dat er daarnaast initiating events (zoals mutatie van [REDACTED]) nodig zijn. Omdat we zeer duidelijke weefsel-specificiteit zien in hoe (kanker)cellen omgaan met aneuploïdie ([REDACTED]) willen we ook in andere weefsels kijken (onder meer in hersenen, huid, darm en in mammaweefsel) of aneuploïdie ook in die weefsels een predispositie geeft voor kanker. Hiervoor gebruiken we dezelfde aneuploïdie-induceerbare muismodellen als onder vraag 1, maar nu gecombineerd met genetische (bijv. [REDACTED] verlies, c-Myc inductie, Ras^{V12} mutatie, etc.) of chemische kankerpredisposities (bijv. DMBA/TPA protocol). Naast 'educated guesses', combineren we aneuploïdie ook met het activeren/inactiveren van genen waarvan we op basis van ons voorgaand werk een sterk vermoeden hebben dat ze samen met aneuploïdie leiden tot kanker. We kijken dan of muteren van deze genen leidt tot aneuploïde kankers en zo ja, of deze lijken op hun humane evenknie. Deze tumorcohorten worden vervolgens in groot detail geanalyseerd (hoe aneuploïde zijn de tumoren, hoe hard groeien ze, etc.) en onderling vergeleken om aan de ene kant de weefsel-specificiteit beter te begrijpen en aan de andere kant te onderzoeken of ook gemeenschappelijke factoren een rol spelen bij het ontstaan van aneuploïde kanker.
- c. *Hoe chromosomaal instabiel zijn aneuploïde tumoren en hebben aneuploïde tumoren een groeinadeel?* Ondanks dat 2 van de 3 kankers aneuploïde zijn, is een huidig dogma in het veld dat aneuploïde kankercellen, ondanks hun afwijkende aantal chromosomen in de uiteindelijke tumor weinig onderling verschillende karyotypes laten zien. Met andere woorden: de cellen maken uiteindelijk maar weinig fouten in het verdelen van hun erfelijk materiaal. Onze preliminaire data suggereert dat dit dogma onjuist is: er blijken op individueel cel niveau juist wel subtiele verschillen te bestaan tussen karyotypes die extrapoleren op het moment dat de tumor in een andere omgeving (de muis) gebracht wordt. Aangezien tumortherapie ook als een druk op de tumor gezien kan worden, is onze verwachting dat het meten van de chromosoom-missegregatie en karyotype-heterogeniteit in tumoren een belangrijke prognostische factor zal worden voor (aneuploïde) kanker. Om deze hypothese verder te toetsen zullen we in meerdere aneuploïde kankers meten hoe vaak cellen chromosomen missegregeren als ze in een andere omgeving (niche) geplaatst worden. Hiertoe zullen we kankers uit verschillende weefsels transplanteren in de muis en voor en na transplantatie de karyotype heterogeniteit op individueel cel niveau meten met single cell sequencing (Falconer E,

et al/ Nat Methods; 2012; 9:1107–1112). Daarnaast zullen we de groeisnelheid van aneuploïde tumoren en niet aneuploïde tumoren vergelijken om te testen of aneuploïde tumoren nog steeds een groeinadeel ondervinden van de aneuploïdie en bepalen welk type veranderingen dit eventuele groeinadeel omzet in een groeivoordeel.

3. Hoe gedragen aneuploïde cellen zich *in vivo* en *in vitro*? Onze drivers voor chromosomale instabiliteit (verlies, truncatie) leiden in weefselkweek binnen een aantal passages tot celdood. Ons voorgaand werk laat duidelijk zien dat verlies/ truncatie wel getolereerd worden in een *in vivo* setting (lever, huid, T-cellen). Dat betekent dat er grote verschillen zijn in hoe weefselkweekcellen en cellen *in vivo* reageren op aneuploïdie. Om dit beter te begrijpen, ontwikkelen wij muismodellen om chromosoomsegregatie en aneuploïdie *in vivo* te visualiseren middels intravital imaging. Deze transgene muismodellen zullen conditioneel diverse fluorescente reporters (); tot expressie brengen en daarnaast een 'chromosoom tracker' waarmee we een specifiek getagged chromosoom kunnen volgen *in vivo* als een marker voor aneuploïdie. Deze modellen zullen we kruisen met onze muismodellen voor aneuploïdie (zie vraagstellingen 1, 2) in enkele weefsels (bijv. huid, darm). De transgenen en conditionele knockout allelen zullen dan *in vivo* geactiveerd worden met tamoxifen gevolgd door intravital imaging. Daarnaast zullen we ook weefsels isoleren van deze muizen voor organoid kweek. Op deze wijze kunnen we *in vivo* en *in vitro* gedrag van aneuploïde cellen vergelijken en daarnaast onze tracker modellen.

Haalbaarheid: De hierboven benoemde vragen kunnen we beantwoorden met de dierexperimenten beschreven in dit voorstel. Voor alle benoemde technieken en benaderingen hebben we of de modellen al beschikbaar, of kunnen we de modellen genereren samen met . In vraag 2 en 4 genereren we een aantal nieuwe muismodellen. Hiervoor zullen we voor het genereren van de muizen samenwerken met de die brede ervaring heeft hiermee. Voor vragen 1 en 3 maken we gebruik van bestaande modellen die we inkruisen in nieuwe weefsel specifieke drivers (te verkrijgen via) eventueel gecombineerd met chemische mutagenese. Hiervoor maken we gebruik van bestaande protocollen. Vraag 2a betreft het screenen voor en valideren van genen die samen met aneuploïdie tot kanker leiden. Onze eerdere pilot-screens hebben laten zien dat deze aanpak zeer efficiënt werkt in T-cellen. We hebben al ervaring met aneuploïdie in andere weefsels (lever, huid) en kunnen deze screen dus eenvoudig in andere weefsels herhalen. Voor vraag 3 zullen we chromosoomsegregatie en aneuploïdie middels intravital imaging volgen. We hebben hier al ervaring mee vanuit het verleden). Hiertoe zullen we delende cel populaties specifiek labelen met de probes om zo het zoeken naar delende cellen te vereenvoudigen. In het geval we geen delende cellen kunnen vinden binnen de periode van ~6 uur dat we per muis kunnen imagen, kunnen we in ieder geval wel betrouwbaar het aantal aneuploïde cellen meten via de chromosoomtracker die we zullen genereren. Daarnaast zullen we in parallel middels organoid kweek van weefsels uit deze tracker muizen ook kijken naar chromosoomsegregatie in weefselkweek (vervanging). Voor deze imaging zullen we samenwerken met het lab van), een expert op het gebied van intravital imagen. Uiteindelijk zullen we ok binnen onze eigen imaging faciliteit op gaan imagen, waar de faciliteiten ook al geschikt zijn voor intravital imaging van muizen.

3.3 Belang

Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelstelling(en).

Het primaire belang van dit onderzoek is wetenschappelijk. 2 van de 3 kankers zijn aneuploïde. Ondanks dit gegeven, zijn er nog geen therapieën beschikbaar die selectief aneuploïde cellen kunnen bestrijden, terwijl aneuploïdie zo'n belangrijk onderscheidende factor van 'gezonde' lichaamscellen is. Om tot dergelijke therapie te komen, moeten we eerst beter begrijpen hoe cellen en weefsels omgaan met aneuploïdie. Dit doen we waar mogelijk met celkweekexperimenten, maar het blijkt dat cellen in celkweek vaak anders op aneuploïdie reageren dan cellen in hun eigen fysiologische niche. Daarom, om tot aneuploïdie-selectieve therapie te komen, is het van cruciaal belang om aneuploïdie in diermodellen te onderzoeken. Onze modellen zijn wereldwijd uniek

en hebben al belangrijke resultaten opgeleverd over aneuploidie en de gevolgen daarvan. In deze experimenten werken we deze bevindingen verder uit en komen we stap voor stap steeds dichterbij mogelijke therapieën die selectief aneuploïde cellen kunnen doden, welke zeer belangrijk kunnen worden in de behandeling van 2 van de 3 kankers, maar mogelijk ook kunnen helpen veroudering beter te begrijpen om uiteindelijk de gevolgen van het ouder worden te kunnen vertragen (healthy ageing), twee zeer belangrijke maatschappelijke belangen. Dit doen we waar mogelijk met celweekexperimenten, maar het blijkt dat cellen in celweek vaak anders op aneuploidie reageren dan cellen in hun eigen fysiologische niche. Daarom, om tot aneuploidie-selectieve therapie te komen, is het van cruciaal belang om aneuploidie in diermodellen te onderzoeken.

3.4 Onderzoeksstrategie

3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project (strategie).

Het overkoepelend doel van deze aanvraag is komen tot manieren om aneuploïde (kanker)cellen selectief te doden. Daartoe moeten we eerst begrijpen wat de gevolgen zijn van aneuploidie in verschillende weefsels en hoe aneuploïde cellen transformeren in kankercellen.

Hiertoe nemen we in parallel een drietal benaderingen:

- 1) We brengen de gevolgen van aneuploidie in niet getransformeerde weefsels (bijv. lever, huid, hersenen, bloed) en tumoren in kaart middels onze bestaande muismodellen voor aneuploïde en nieuw te genereren muismodellen voor aneuploidie (vragen 1 en 2b).
- 2) We onderzoeken welke genen en daarmee samenhangende fysiologische processen van aneuploïde cellen kankercellen maken (middels *in vivo* genetische screens en follow up *in vivo* kandidaat gen validatie (vraag 2)).
- 3) We visualiseren chromosoom(mis)segregatie en aneuploidie door intravital imaging in onze muismodellen voor aneuploidie in vergelijking met imaging van organoid cultures (*in vitro*) om de *in vivo* en *in vitro* gevolgen van chromosomale instabiliteit te kunnen bepalen en vergelijken (vraag 3).

Samenvattend, vergelijken we in deze aanvraag hoe verschillende weefsels reageren op aneuploidie en welke veranderingen de verschillende celtypen moeten doorstaan om kankercellen te worden, omdat ons voorgaand onderzoek heeft aangetoond dat verschillende celtypen verschillend reageren op aneuploidie. Om te komen tot aneuploidie-specifieke therapie, zullen we dus ook moeten weten hoe verschillende weefsels omgaan met aneuploidie. Door in verschillende weefsels de vier beschreven vragen te beantwoorden zullen de komende vijf jaar stappen dichterbij het overkoepelend doel: therapie die selectief aneuploïde kankercellen doodmaakt, therapie die we conceptueel en praktisch zullen testen in een in parallel ingediend projectvoorstel.

3.4.2 Geef een overzicht op hoofdlijnen van de verschillende onderdelen van het project en de daarbij gebruikte type(n) dierproef of dierproeven.

Het hier beschreven project valt uiteen in de volgende drie hoofdvragen.

1. Wat zijn de gevolgen van aneuploidie voor niet-kankercellen?
2. Wat is de rol van aneuploidie in het ontstaan en de voortgang van kanker?
3. Hoe gedragen aneuploïde cellen zich *in vivo* en *in vitro*?

Deze vragen zullen we beantwoorden middels 3 dierproeftypes:

- Dierproeftype 1: Muismodellen voor aneuploidie in niet getransformeerde cellen.
- Dierproeftype 2: Muismodellen voor aneuploidie in getransformeerde cellen.
- Dierproeftype 3: Muismodellen voor het visualiseren van aneuploidie en chromosoomsegregatie.

3.4.3 Beschrijf en benoem de logische samenhang van deze verschillende onderdelen en de eventuele fasering in de uitvoering. Vermeld eventuele mijlpalen en keuzemomenten.

In vraag 1 zullen we de gevolgen van aneuploidie in niet getransformeerde cellen onderzoeken. Dit zullen we onder deze vraag doen in diverse weefsels met een focus op niet-kanker gerelateerde pathologie. Een mogelijk gevolg van aneuploidie is versnelde veroudering van weefsels, dit is bijvoorbeeld aan aangetoond in het werk van [REDACTED]), waarin ze waarnamen dat muizen met systemische (dus in alle organen tegelijk) aneuploidie diverse verouderingsziektes lieten zien, zoals staarvorming, kyphosis, haarverlies, vetverlies. We zullen weefsel-specifiek onderzoeken wat de gevolgen zijn van aneuploidie op bijv. het hematopoietisch systeem, de lever, de mamma, de hersenen, de darmen en de huid. Indien er aanleiding toe is, breiden we dit met meerdere weefsels uit, in overleg met de IvD. In de meeste gevallen zullen we hiervoor dieren kunnen gebruiken uit onze bestaande foklijnen zonder ongerief. In enkele gevallen zullen lijnen ongerief ondervinden van de weefsel-specifieke aneuploidie. In geval we een tamoxifen-induceerbare Cre hebben, zullen we dieren met tamoxifen moeten behandelen. Deze experimenten zullen inzicht geven hoe niet-getransformeerde cellen (dus zonder kanker-predispositie) reageren op aneuploidie en dus wat de algemene en/of weefsel-specifieke responsen zijn op chromosomale instabiliteit zoals mogelijk versnelde veroudering. Naast dat deze dierproeven inzicht geven in hoe verschillende weefsels omgaan met aneuploidie, dienen de cohorten voor deze vraag ook als controledieren voor de cohorten onder vraag 2b.

Voor vraag 2a zullen we trachten te identificeren welke genen van een aneuploïde cel een kankercel maken. Hiertoe zullen we *in vivo* genetische screens uitvoeren, in eerste instantie met transposons (PiggyBac) en in het hematopoietisch systeem. In dit muismodel worden transposons conditioneel gemobiliseerd samen met het inactiveren van de genen die de aneuploidie veroorzaken in de gekozen weefsels. De transposons blijven rondspringen gedurende de tumorontwikkeling: deze benadering werkt zeer efficiënt om sterke drivers van tumorigenese bloot te leggen: op die loci blijven de transposons juist behouden [REDACTED]

[REDACTED] Voor deze setup loopt reeds een eerste experiment na een succesvolle pilot vorig jaar als onderdeel van onze huidige vergunning. Gedurende jaar 1-2 van dit voorstel zal deze specifieke screen nog lopen. Als deze screen tot gevalideerde hits leidt (*i.e.* genen die van aneuploïde hematopoietische stamcellen kankercellen maken) en als we een duidelijke weefsel-specifieke respons op aneuploidie zien onder vraag 1, dan zullen we ook *in vivo* genetische screens uitvoeren in de huid en in het cerebellum. Deze genetische screens zullen we uitvoeren met het [REDACTED]

[REDACTED] Met deze screens zullen we starten zodra daartoe aanleiding is (zie hierboven), waarschijnlijk in jaar 3-5 van dit plan.

Voor vraag 2b zullen we in verschillende weefsels en middels verschillende extra predisposities de rol van aneuploidie in het ontstaan en de voortgang van kanker onderzoeken. Zodoende hopen we inzicht te krijgen in algemene en weefsel-specifieke manieren waarop tumorcellen omgaan met aneuploidie. Onder onze huidige vergunning volgen we een tumormodel voor bloed, een tumormodel voor lever en mammatumormodel. Onder deze CCD aanvraag zullen we nog enkele dieren volgen van deze bestaande lijnen gedurende de eerste twee jaar, daarna zullen de vragen voor deze modellen beantwoord zijn en zullen we de lijnen stoppen.

Daarnaast willen we onder vraag 2b onderzoeken wat de rol van aneuploidie is in het ontstaan van borstkanker, medulloblastoma, darmkanker en huidkanker. Hiertoe zullen we onze bestaande conditionele allelen voor aneuploidie () of nieuw te genereren aneuploidie-inducerende allelen combineren met een chemische of genetische tumorpredispositie. Voor medulloblastoma zullen we cerebellum specifieke () cKO dieren inkruisen met () cKO dieren en/of c-Myc overexpresserende dieren. We verwachten dat dit model de eerste 3 jaar van de aanvraag zal lopen. Voor het induceren van darmtumoren zullen we aneuploidie in de darm combineren met darm-specifieke K-Ras^{V12} of () mutatie. Voor huidtumoren zullen we huid specifieke aneuploïde dieren in een Ptch conditionele achtergrond (basal cell carcinoma) of () conditionele achtergrond (squamous cell carcinoma) kruisen of topisch behandelen met TPA en/of DMBA om proliferatie en transformatie te induceren. De darm en huidmodellen zullen we gedurende de laatste 3 jaar van deze aanvraag onderzoeken, maar alleen als uit de voorgaande modellen een duidelijke weefsel specificiteit blijkt van hoe cellen omgaan met aneuploidie. Voor zowel het medulloblastoma-model, het darmmodel en het huidkankermodel zal Cre-recombinase geactiveerd worden met tamoxifen; de foklijnen voor deze dieren bestaan reeds en hebben geen ongerief.

Voor vraag 2c zullen we aneuploïde of controle hematologische tumorcellen sequentieel transplanteren in ontvanger muizen, bepalen hoe snel de cellen opnieuw tumoren vormen en meten hoe de karyotypes van de individuele cellen veranderen. De te transplanteren cellen voor en na transplantatie gemeten worden met single cell sequencing om te karyotype heterogeniteit te meten. In eerste instantie zullen we ons richten op hematologische kankers (Jaar 1-3 van deze aanvraag). Mogelijk breiden we dit naar andere orgaansystemen uit, maar alleen in nauw overleg met de IvD. De experimenten om de groeisnelheid van aneuploïde en niet aneuploïde tumoren te vergelijken zullen gedurende de eerste drie jaar van dit voorstel lopen. In dit voorstel zullen we daarnaast de in onze lopende transposon screen geïdentificeerde genen valideren in follow-up transplantatie experimenten. Hiertoe zullen we (aneuploïde) hematopoietische stamcellen isoleren en hierin de kandidaatgenen activeren/inactiveren (zoals in de transposonscreen optrad) middels (conditionele) overexpressie of shRNA knockdown/CRISPR/Cas9 om te kijken of dit ook leidt tot transformatie van de aneuploïde hematopoietische stamcellen. Deze validaties zullen gedurende de gehele duur van dit voorstel lopen.

Voor vraag 3 zullen we nieuwe muismodellen ontwikkelen om mitose, chromosoommissegregatie en aneuploidie in levende dieren te visualiseren in weefsels/celtypes naar keuze. De diersmodellen zullen worden gegenereerd op de DEC/CCD vergunning van () en dan ingekruist met onze tumormodellen uit vraag 2 en ontwikkelingsmodellen uit vraag 5. In eerste instantie zullen we ons richten op celdeling en aneuploidie in de huid en tumoren genetisch () of chemisch (DMBA/TPA) induceren dan wel in 'normale' aneuploïde huid naar aneuploidie en celdeling te kijken. Experiment dieren zullen dan geïmaged worden. Hiertoe zullen we gebruik maken van minimaal invasieve imaging windows (). Verder zullen we in samenwerking met () organoid cultures generen die we ook zullen imageren. Als we weinig tot geen delende cellen vinden met onze huidige Cre-driver voor de huid, kruisen we onze modellen ook nog in een selectievere Cre-driver die beter delende cellen labelt. Deze experimenten zullen in de eerste 3 jaar van dit voorstel worden uitgevoerd. Als de modellen goed blijken te werken, zullen we ook andere weefsels onderzoeken (bijvoorbeeld mamma, darm, etc.) in samenwerking met labs ().

3.4.4 Benoem de typen dierproeven. Vul per type dierproef een bijlage Beschrijving dierproeven in.

Volgnummer	Type dierproef
1	Muismodellen voor aneuploidie in niet getransformeerde cellen.
2	Muismodellen voor aneuploidie in getransformeerde cellen
3	Muismodellen voor het visualiseren van aneuploidie en chromosoomsegregatie
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	De rol van aneuploidie in kanker
1.2 Looptijd van het project	5 jaar
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	Aneuploidie, kanker, veroudering, intravital imaging

2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.	☒ 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

U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.

3 Projectbeschrijving

3.1	Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	Aneuploidie is een afwijkende hoeveelheid erfelijk materiaal in de celkern. Aneuploidie is een veelvoorkomende eigenschap van kankercellen; twee van de drie kankers bestaan uit cellen die aneuploïde zijn. Daarmee is een eigenschap waarmee men kankercellen kan onderscheiden van gezonde lichaamscellen. Het specifiek doden van aneuploïde kankercellen zou mogelijk een zeer selectieve manier kunnen zijn om een groot deel van de kankers aan te pakken. Tot dusver is er geen therapie beschikbaar die selectief aneuploïde cellen kan doden. Om tot dit soort van therapie te komen, moeten we eerst beter begrijpen wat aneuploidie met cellen doet. In dit onderzoek brengen we in kaart hoe verschillende weefsels reageren op aneuploidie, hoe aneuploidie in die weefsels tot kanker leidt en welke processen aneuploïde cellen tot kankercellen maken. Hiervoor maken we gebruik van bestaande en nieuw te ontwikkelen muismodellen waarin we aneuploidie op weefselspecifiek niveau kunnen induceren. Zo kunnen we heel specifiek, weefsel voor weefsel, de gevolgen van aneuploïdie voor de ontwikkeling van een weefsel en voor het ontstaan en de voortgang van kanker in kaart brengen.
3.2	Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?	Door dit onderzoek zullen we komen tot: 1) een beter begrip van hoe verschillende celtypes omgaan met aneuploidie (wetenschappelijk doel) 2) inzicht in welke processen aneuploïde cellen veranderen in kankercellen (wetenschappelijk doel) 3) inzicht in welke andere ziektebeelden (mede) een gevolg zijn van aneuploidie (wetenschappelijk doel) Verder zal dit project leiden tot: 1) een unieke collectie aneuploïde tumoren in verschillende weefsels (zoals bloed, lever, borst, huid en hersenen) (wetenschappelijk doel) 2) een unieke aneuploïde weefselcollectie (zoals bloed, lever, borst, huid en hersenen) (wetenschappelijk doel) 3) muismodellen waarin we aneuploidie onder de microscoop in levende muizen kunnen visualiseren (wetenschappelijk doel) 4) Alternatieven voor dierproeven (weefselkweek, organoids).
3.3	Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?	Voor ons onderzoek zullen we gebruik maken van overwegend volwassen muizen (7271) en een minderheid embryo's (400) van transgene en wild type muizen
3.4	Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?	Een deel van de dieren zal licht ongerief hebben van injecties of kleine operaties. Een deel van de dieren zal beginnende tumoren ontwikkelen.
3.5	Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?	~60% van de dieren zal mild ongerief (injecties, non-invasive imaging, wegen) hebben; ~37% van de dieren zal matig ongerief hebben (tumoren, invasieve imaging, tumortransplantaties), ~3% zal ernstig ongerief hebben (vorderende of uitgezaaide tumor, opofferen op basis van humane eindpunten).
3.6	Wat is de bestemming van de dieren na afloop?	De dieren zullen aan het einde van het experiment gedood worden voor uitgebreide analyse.

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.

Proefdieren zijn nodig omdat de te onderzoeken processen in een levend organisme moeten plaatsvinden. Al onze experimenten worden vooraf gegaan door uitgebreid weefselkweekonderzoek, waarin we onderzoeken hoe in kweekschaltes cellen omgaan met aneuploidie en hoe aneuploide cellen reageren op onze nieuw ontdekte therapieën. Pas als we heel zeker zijn van onze weefselkweekbevindingen, zullen we overgaan tot het testen in muizen, omdat dit het meest geschikte model is om kanker te onderzoeken. Ons voorgaand werk heeft namelijk duidelijk laten zien dat hoe cellen in weefselkweek reageren op aneuploidie niet altijd overeenkomt met hoe cellen in een weefsel reageren. Daarnaast is het tot dusver onmogelijk gebleken om kanker en andere complexe biologische processen betrouwbaar alleen in weefselkweek te modelleren. Uiteindelijk zijn deze proefdiermodellen noodzakelijk voor het vervolgstadium waarbij de nieuwe therapie in klinische studies in de mens verder wordt gevalideerd.

4.2 Vermindering

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

Voor elk dierexperiment zullen we voorafgaand een statistische analyse uitvoeren om het precies aantal benodigde dieren te berekenen. In gevallen waarbij we niet perfect het aantal benodigde dieren van tevoren weten (bijvoorbeeld als we een nog onbekend biologisch proces bestuderen), zullen we altijd eerst een kleine groep dieren testen (pilot cohort, gebaseerd op jarenlange ervaring) om te komen tot de correcte complete groepsgrootte. Tenslotte houden we ons via literatuur en ons professionele netwerk op de hoogte van het werk van onze collega's om duplicatie van dierexperimenten te voorkomen. Op deze wijze dragen we er zorg voor dat we een minimum aantal proefdieren nodig zullen hebben en dat ongerief tot een minimum beperkt blijft.

4.3 Verfijning

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

De muis is het meest geschikte model voor dit type onderzoek gezien de kennis, hulpmiddelen en technieken die beschikbaar zijn voor kankeronderzoek in de muis. We onderzoeken de effecten van aneuploidie met name in weefsels waar muizen er relatief weinig last van ondervinden en beëindigen experimenten voordat muizen ernstig ongerief ondervinden.

Vermeld welke algemene maatregelen genomen

Tumoren zullen in eerste instantie optreden in het weefsel waarin we de aneuploidie geïnduceerd hebben. Deze weefsels zullen uitgebreid gemonitord worden. Door onze ruime ervaring en de ruime ervaring van onze diervverzorgers zullen dieren

worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.

opgeofferd worden bij de eerste symptomen van ongerief. Op deze wijze zullen we het ongerief tot een minimum beperken. Dieren zullen daarom zeer regelmatig geïnspecteerd worden om ongerief zo vroeg mogelijk te zien. Dieren zullen worden verdoofd waar nodig (bijvoorbeeld bij intravital imaging). Door op weefselniveau te kijken naar aneuploidie wordt eventueel ongerief beperkt tot 1 orgaansysteem. Bovendien ligt het focus op orgaansystemen waarin tumoren relatief weinig ongerief/pijn geven (bloed, lever, huid, cerebellum) en zal onze kennis van de modellen eraan bijdragen dat de dieren worden opgeofferd voordat ze ongerief zullen ondervinden van de tumoren.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf



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.	Volgnummer	Type dierproef
		1	Muismodellen voor aneuploidie in niet getransformeerde cellen

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.

In dit type dierproef zullen we in verschillende weefsels van de muis (bijv. huid, lever, brein, bloed, darm of mamma) aneuploidie veroorzaken en de gevolgen (zoals mogelijk versnelde veroudering) voor de weefsels onderzoeken. We zullen aneuploidie veroorzaken met behulp van onze eerder gepubliceerde conditionele allelen ■■■■ of ■■■■ of door nieuwe te genereren drivers van aneuploidie. Om de aneuploidie weefsel-specifiek te provoceren, zullen onze conditionele knockout allelen gecombineerd worden met weefsel-specifieke Cre-drivers voor bijvoorbeeld de huid, het cerebellum, het bloed, de darm en de mamma. Cohorten van dieren zullen dan gevolgd worden gedurende enkele weken tot maximaal 18 maanden met een focus op aneuploidie-geïnduceerde pathologieën (veroudering, neurodegeneratie, stamceldepletie). Tussentijds zullen op geplande momenten dieren opgeofferd worden voor

uitgebreide moleculaire analyse en pathologie. In een klein deel van de gevallen zullen ontvanger muizen aneuploïde cellen (bijv. hematopoietische stamcellen, HSCs) getransplanteerd krijgen om hun regeneratieve capaciteit te meten middels lineage tracing. Daarnaast zal een deel van de dieren een fluorescent reporter gen tot expressie brengen wat ons helpt om aneuploïde cellen te isoleren of volgen. Tenslotte zullen we een klein aantal dieren opofferen voor primaire celweek doeleinden (vermindering en vervanging), zodat we een deel van onze experimenten met weefselweek kunnen uitvoeren.

In deze dieren zullen we verschillende uitkomst parameters meten/bepalen.

Om te valideren dat de dieren inderdaad aneuploidie accumuleren in de getargete weefsels zullen we deze weefsels onderwerpen aan karyotypering middels single cell sequencen, metaphase spreads en interphase FISH. Dit gebeurt op ingevroren of gefixeerde cellen. Daarnaast zullen we de weefsels onderwerpen aan een histologische analyse, waar noodzakelijk gecombineerd met immunohistochemie (ingevroren en gefixeerde weefsels). Verder zullen we de respons op aneuploidie meten middels transcriptome analyse (RNA sequencing, qPCR) en middels biochemische bepalingen (Western Blots, en mogelijk mass spectrometrie op een select aantal samples (ingevroren weefsels). Tenslotte zullen we cellijnen afleiden uit diverse weefsels om verder celbiologische metingen te kunnen doen aan de aneuploïde weefsels (time-lapse microscopie, mechanistische experimenten, etc) (vers ingevroren weefsels in kweekmedium en vers in kweek genomen weefsels).

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 eerste instantie zullen de Cre-positieve lijnen worden gegeneerd (fok). Omdat bij deze fok nieuwe allelen worden gecombineerd, kunnen we niet met 100% zekerheid voorspellen of de nieuwe lijnen ongerief hebben. De eerste twee generaties van deze nieuwe lijnen gelden dus als fok met ongerief (zie ook aantallen dieren). De meerderheid van de dieren zullen geen verdere behandelingen ondergaan, dieren zullen alleen nauwlettend gevolgd worden op het ontstaan van pathologie op worden opgeofferd op diverse leeftijden. In een deel van de cohorten (wanneer we gebruik maken van induceerbare Cre-drivers) zullen dieren tamoxifen of PolyI/PolyC toegediend krijgen om Cre te induceren. Tamoxifen toediening zal plaatsvinden via orale toediening, IP injecties of in geval van netgeboren pups via injectie direct door de maagwand. PolyI/PolyC wordt IP toegediend. Dieren worden 4-5 keer behandeld binnen een periode van 2 weken. Deze toedieningsmethodieken zijn gebaseerd op onze eigen bestaande protocollen en noodzakelijk om voldoende Cre-activiteit te waarborgen. In geval de dieren een fluorescent reporter gen tot expressie brengen, zullen we in enkele gevallen de dieren imageren met een IVIS imaging station. Hiervoor worden de dieren licht gesedeeerd en gedurende enkele minuten in het imaging station gelegd. De dieren worden dan teruggelegd in hun kooi om ze te laten bijkomen. Uiteindelijk zullen de dieren op verschillende tijden worden opgeofferd (cervicale dislocatie na isofluraan sedatie) om de diverse relevante weefsels te isoleren voor pathologie en moleculaire analyses, of, in enkele gevallen, voor HSC transplantaties.

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

In de meeste gevallen kennen we de latentie van de fenotypes/pathologie van de voren niet. Onze uitgebreide ervaring heeft ons geleerd, dat cohorten van 40-50 dieren per genotype in totaal voldoende zijn om een statistisch significant verschil aan te tonen tussen controle-groepen en dieren met een genetische predispositie (aneuploidie). In het geval van dit type dierproef zullen we controle en experimentdieren op verschillende leeftijden opofferen: hiervoor kiezen we ongeveer 5 tijdspunten gelegen tussen kort na geboorte en 18 maanden.

Om tot het minimum aantal noodzakelijke dieren te kunnen komen, zullen we daarom altijd starten met een pilotcohort van dieren (ongeveer 15 per groep, 3 per tijdspunt): dit geldt dus voor alle hieronder 'B aangevraagde dieraantallen' beschreven groepen. Deze dieren zullen dan worden geanalyseerd middels de hierboven beschreven uitleesparameters en dan zal er gekeken worden of we op basis van dit aantal dieren (en geïsoleerde weefsels) voldoende verschillen hebben kunnen waarnemen. Dan vindt een go/no go assessment plaats (zijn er verschillen waarneembaar op basis van de beschreven uitleesparameters?) en zo ja, dan zullen we in overleg met de IvD de groepsgrootte uitbreiden tot MAXIMAAL 50 dieren (10 per tijdspunt), afhankelijk van hoe groot de verschillen

zijn tussen de experimentgroep en controlegroep en op welke tijdstippen de verschillen waarneembaar zijn. In de meeste gevallen verwachten we dat we per groep minder dieren zullen nodig hebben. Als er op een bepaald tijdstip geen verschillen waarneembaar zijn na de assessment van de eerste 15 dieren, dan zullen we dit tijdstip niet verder onderzoeken en als er helemaal geen verschillen meetbaar zijn, dan zullen we concluderen dat de aneuploidie in deze setting geen effect heeft en geen extra dieren gebruiken (het blijft dan bij de eerste 15 gebruikte dieren).

Bij doorgang zullen na afronding van de experimenten en followup analyses alle dieren (dus pilot van 15 en extra aangevraagde dieren tot een maximum van 50 in totaal) als 1 experimentgroep beschouwd worden. Correctie voor multiple testing is dan ook niet noodzakelijk. De eerste 15 dieren als pilot: we gaan ervan uit (op basis van voorgaande kennis) dat 15 dieren niet voldoende is om een significant verschil tussen dieren aan te tonen. Omdat de genotypes die we testen een onbekend fenotype hebben, kunnen we niet 100% voorspellen wat de verschillen in fenotype tussen de dieren zullen zijn. Mocht dit verschil groter zijn dan hier ingeschat, dan zullen we post-hoc een nieuwe power analyse uitvoeren met de dan nieuw bekende gegevens (i.e. het verschil in overleving tussen de groepen en de verdeling van experimentwaardes) om zo vast te stellen of de 15 dieren voldoende zijn voor een statistisch significant verschil of dat er nog meerdere dieren noodzakelijk zijn.

In geval van HSC transplantaties zijn 25 dieren per groep in onze ervaring voldoende.

Belangrijk: ook beschouwd vanuit een power-analyse is 40-50 dieren per cohort een reële schatting: in ons geval is de variatiecoëfficiënt sigma vooraf niet bekend; de proefgrootte wordt daarom afgelezen van een uit Owen afgeleide grafiek (Proefdieren en Dierproeven, L.F.M van Zutphen, vijfde druk, 2009, blz 211). Op basis van een onbetrouwbaarheidsdrempel (alpha) van 0.05 of een power (pi) van > 0.8 en een verhouding tussen het te meten verschil ($\mu_1 - \mu_2 / \sigma$) en variatiecoëfficiënt van ongeveer 0.7 (dit betekent dat er bij een spreiding sigma van bijvoorbeeld 2 maanden in de overleving binnen 1 groep een significant verschil gemeten wordt als de gemiddelde overleving tussen experiment en controlegroep 1.5 maanden uit elkaar ligt; dit zijn reële waarden die we in de praktijk vaak waarnemen) valt er uit de grafiek af te lezen dat de proefgrootte ongeveer 40-50 dieren dient te zijn.

B. De dieren

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

Alle experimenten zullen worden uitgevoerd op transgene muizen. We maken gebruik van zowel mannen als vrouwen behalve in geval van de mamma-experimenten (daar gebruiken we alleen vrouwen), omdat er geen reden is om aan te nemen dat we verschillen zullen zien tussen de sexes. Voor dit type dierproef zullen alleen volwassen muizen uit eigen fok (heel soms bestellen we dieren vanuit extern, zoals XXXXXXXXXX) gebruikt worden, in sommige gevallen zullen dieren als jong volwassene al behandeld worden op Cre te activeren. Binnen dit type dierproef zullen we de volgende experimentele en controle cohorten volgen:

Aneuploidie in bloed:

1 experimenteel en 1 control cohort voor aneuploïdie in T-cellen: $50 + 50 = 100$ dieren

1 experimenteel en 1 controle cohort voor aneuploïdie in het hematopoïetisch systeem: $50 + 50 = 100$ dieren

1 experimenteel en 1 controle cohort voor transplantaties van aneuploïde cellen in het hematopoïetisch systeem: $50 + 50$ donor dieren + 100 recipient dieren = 200 dieren

Subtotaal 400 dieren

Aneuploidie in de kleine hersenen:

1 experimenteel en 1 controle cohort voor induceerbare aneuploidie in de kleine hersenen: $50+50 = 100$ dieren

Subtotaal 100 dieren

Aneuploidie in de huid en darm:

1 experimenteel en 1 controle cohort voor induceerbare aneuploidie in de epidermis: $50+50 = 100$ dieren

1 experimenteel en 1 controle cohort voor induceerbare aneuploidie in de darm: $50+50 = 100$ dieren

1 experimenteel en 1 controle cohort voor induceerbare aneuploidie in de stamcellen van de darm en huid: $50+50 = 100$ dieren

Subtotaal 300 dieren

Aneuploidie in de lever:

1 experimenteel en 1 controle cohort voor aneuploidie in de lever: $50+50 = 100$ dieren

Subtotaal 100 dieren

Aneuploidie in de mamma:

1 experimenteel en 1 controle cohort voor aneuploidie in mamma epitheel: $50+50 = 100$ dieren

Daarnaast genereren we ook enkele nieuwe modellen voor chromosomale instabiliteit, die we in eerste instantie zullen testen in het bloed en de huid. Omdat we deze kandidaatgenen nog in celweek aan het testen zijn, weten we de gennamen hiervan nog niet. We verwachten de komende 5 jaar ongeveer 4 van deze modellen te genereren waarvan we de gevolgen willen bekijken in 2 weefsels (dus 8 stammen), waarvoor we per cohort maximaal 50 dieren zullen volgen. Voor de controle cohorten voor bloed en huid zijn hierboven al dieren aangevraagd.

Subtotaal nieuw te testen genen: 400 dieren

Ook zullen we vanuit een deel van deze verschillende modellen primaire cellen isoleren (vervanging en vermindering van dierproeven)

Hiervoor vragen we de volgende hoeveelheid dieren aan:

Ten bate van primaire keratinocyten: 20 dieren

Ten bate van mouse embryonic stem cells: 20 dieren (moeders; embryo's zijn pas op E3.5 en tellen nog niet als proefdier)

Ten bate van mouse embryonic fibroblasts (40 dieren en 400 E13.5 embryo's)

Ten bate van darm organoids: 20 dieren

Ten bate van mamma organoids 20 dieren

Subtotaal primaire kweek: 120 dieren en 400 embryo's.

Voor deze experimenten zullen we een aantal nieuwe muizenstammen genereren. We verwachten geen ongerief in de fok van deze dieren, maar omdat we dit van te voren niet kunnen uitsluiten gelden de eerste twee generaties als fok met ongerief. 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. Voor de hierboven beschreven cohorten zullen we 17 nieuwe genotypes genereren.

Subtotaal fok met ongerief: $17 \times 48 = 816$ dieren.

Het totaal aantal dieren voor dit type dierproef komt daarmee op 2336 volwassen dieren en 400 embryo's

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.

Waar mogelijk doen we onze experimenten met celkweekexperimenten, maar het blijkt dat cellen in celkweek vaak anders op aneuploidie reageren dan cellen in hun eigen fysiologische niche. Daarom, om tot aneuploidie-selectieve therapie te komen, is het van cruciaal belang om aneuploidie in diermodellen te onderzoeken.

We hebben het minimum mogelijk aantal dieren per groep gekozen (vermindering) en starten in alle gevallen met een klein pilotcohort om te bepalen of er meetbare verschillen tussen experiment en controledieren zijn. Daarnaast dienen de experimentdieren in dit dierproeftype als controlecohorten voor de tumorproeven onder dierproeftype 2. Daarnaast gebruiken we de experimentdieren om te leren wat de gevolgen van aneuploidie zijn in een niet getransformeerde setting. Op deze wijze beantwoorden we twee vragen met deze cohorten en verminderen we het totaal aantal benodigde dieren.

We hebben zoveel mogelijk gekozen voor weefsels waar afwijkingen relatief weinig ongerief opleveren als verfijning. Bovendien kiezen we voor een deel van de experimenten voor een weefselkweek benadering (vermindering, vervanging) en proberen meerdere dingen van dezelfde dieren te leren (bijvoorbeeld fenotypes voor stamcellen in de darm en huid kunnen we in 1 experiment tegelijk onderzoeken). Tenslotte maken we waar mogelijk gebruik van tussentijdse non-invasieve metingen in de lineage tracing experimenten (vermindering, verfijning) zodat hetzelfde dier meerder malen gemeten kan worden wat leidt tot vermindering van het totaal aantal benodigde dieren.

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.

Aangezien onze voorgaande kennis uitwijst dat aneuploïde verbazingwekkend goed getolereerd wordt in vivo, verwachten we weinig tot geen ongerief in dit type dierproef. Alle dieren in experiment zullen intensief gecontroleerd worden (dagelijkse controle door diervverzorging en minimaal 2 maal per week

intensievere controle door de onderzoekers) om uit te sluiten dat de dieren ongerief ondervinden.

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 zijn nog niet eerder uitgevoerd. Hiervoor hebben we een uitgebreide zoekopdracht op PubMed uitgevoerd en daarnaast gesproken met onze diverse collega's die dit soort modellen ontwikkelen [REDACTED]

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?

Er wordt weining ongerief verwacht. Het is mogelijk dat aneuploidie in het cerebellum tot milde motorische afwijkingen leidt ten gevolge van neurodegeneratie. Verder kunnen in andere weefsels andere weefsel-specifieke verouderingspathologieën optreden, zoals stamceldepletie, senescence, wat uiteindelijk (in de latere tijdspunten) tot verminderde weefselfunctionaliteit zal leiden. Zo is het mogelijk dat aneuploidie in de darm tot villi-degeneratie leidt en daarmee tot gewichtsverlies. In de laatste tijdspunten (dieren ouder dan een jaar) zullen dieren ook 'natuurlijk' verouderen. Dit kan leiden tot de bij muis bekende verouderingsaandoeningen zoals tumoren, blindheid, prolapsen, huidaandoeningen. We zullen hier de dieren niet langer dan 18 maanden houden om extreme veroudering te voorkomen.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Mogelijk is er milde neuronale degeneratie in het cerebellum model. In de darm kan aneuploidie leiden tot depletie van stamcellen en daarmee villi degeneratie. In de andere modellen verwachten we geen pathologie die direct tot ongerief zal leiden, maar dit zal nauwlettend in de gaten gehouden worden. Bij de dieren ouder dan een jaar kunnen aandoeningen ook ontstaan door natuurlijke veroudering.

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

Dieren zullen zeer regelmatig (minimaal 2 maal per week) uitgebreid geïnspecteerd worden door de verantwoordelijk onderzoeker en dagelijks door de diervoorzorg om ongerief te voorkomen. In geval van ernstig ongerief door neurodegeneratie of villi-degeneratie zal of de dosis van tamoxifen verlaagd worden (noodzakelijk om de knockout genen te inactiveren) om zo mozaïsche aneuploidie te provoceren (en daarmee een milder fenotype). Doordat de aneuploïde cellen bij deze weefsels ook een fluorescente reporter tot expressie brengen, kunnen we de aneuploïde cellen alsnog isoleren uit de weefsels.

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.

In de minderheid van de gevallen zullen dieren dusdanig ernstig ziek worden dat de op basis van humane eindpunten opgeofferd dienen te worden. Onze ervaring met voorgaande modellen leert dat deze aantallen kleiner dan 5% van de dieren betreft. In dit dierproeftype zal dit naar verwachting alleen optreden als de dieren ernstig gevochten hebben, aangezien we geen ernstige pathologie verwachten met aneuploidie alleen. De te verwachten fenotypes (neurodegeneratie, villidegeneratie) zullen we nauwlettend van dag tot dag volgen, zodat deze dieren nooit dusdanig ernstig ongerief hebben dat ze moeten worden opgeofferd op basis van humane eindpunten maar altijd ruim voor die tijd. De algemene criteria die wij hanteren om dieren op basis van humane eindpunten op te offeren zijn als de dieren moribund zijn, lethargisch zijn, >20% van hun gewicht verloren zijn, ernstige neurologische afwijkingen laten zien (balansproblemen), ernstige verouderingsafwijkingen laten zien (spontane tumoren, prolapsen, ernstige huidaandoeningen) of ernstige (vecht)wonden hebben.

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

We verwachten voor deze proef dat minder dan 2% van de dieren op basis van humane eindpunten opgeofferd dienen te worden.

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.

Het cumulatief ongerief schatten we in als licht.

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 zullen uitgebreid worden onderzocht op macroscopische pathologie en weefsels zullen worden opgestuurd voor histologie. Verder zullen aangedane organen worden opgeslagen voor verder onderzoek (eiwit, RNA, DNA, aneuploidie metingen) zoals beschreven onder uitleesparameters.

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



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.	Volgnummer	Type dierproef
		2	Muismodellen voor aneuploidie in getransformeerde cellen

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.

In dit type dierproef onderzoeken we de relatie tussen chromosomale instabiliteit en kanker. Ons voorgaand onderzoek heeft uitgewezen dat chromosomale instabiliteit in de levensduur van een muis niet voldoende is om reproduceerbaar tot kanker te leiden (zie ook dierproeftype 1). Om beter te begrijpen hoe aneuploidie tot kanker leidt en hoe deze aneuploide kankers zich gedragen zullen we a) zoeken naar genen die samen met aneuploidie leiden tot kanker (middels genetische mutagenese (transposons, CRISPR)); zullen we b) onze bekende of nieuwe drivers voor chromosomale instabiliteit combineren met bekende tumorpre-disposities (bijv. XXXX, Ptch, Myc, Ras) of chemische mutagenese om aneuploide tumoren in diverse weefsels te veroorzaken; en c) humane en muizekankers transplanteren in de muis om te vergelijken hoe snel aneuploide en nieuw-aneuploide tumoren groeien en hoe frequent deze tumoren

chromosomen missegregeren.

Voor deelvraag a) zullen we een genetische in vivo screens uitvoeren (transposon of CRISPR) in enkele weefsels (bloed; kleine hersenen, darm en huid). Hiertoe zullen we onze conditionele knockout muizen inkruisen in een conditionele transposon of conditionele CRISPR achtergrond. Het genoom van het te targetten aneuploide weefsel zal dan worden gemutageniseerd (door transposons of CRISPR-libraries) en dieren zullen dan worden gevolgd op het ontstaan van tumoren. Zodra dieren ziek worden, zullen ze worden opgeofferd en de ontstane tumoren zullen worden geanalyseerd op driver-mutaties in de tumoren. We zullen beginnen met een eerste screen in bloed (pilot screen hiervan is al uitgevoerd onder oude vergunning) en daarin bepalen welk deel van de hits (genen die aneuploide bloedcellen veranderen in leukemiecellen) specifiek zijn voor bloedcellen en welke meer een algemene rol hebben in de celbiologie. Als er een groot deel van de significante hits weefselspecifiek zijn (dat is de verwachting), dan zullen we de transposonscreen uitbreiden naar andere weefsels (Go). We zullen die uitbreiding weefsel voor weefsel doen, waarbij we altijd eerst een pilotscreen zullen uitvoeren zoals hieronder beschreven. Mocht onze eerste transposonscreen met name 'algemene hits' opleveren, en het daarom aannemelijk is dat we geen extra hits zouden vinden in andere weefsels, dan beperken we ons tot 1 transposonscreen (No-Go).

Voor deelvraag b) zullen we ontstane tumoren in de verschillende modellen onderling vergelijken om de weefselspecifieke en algemene respons tegen aneuploidie in kaart te brengen. Onze eerste aanwijzingen uit voorgaand onderzoek laten zien dat er grote verschillen zijn tussen hoe verschillende weefsels/tumortypes reguleren op aneuploidie. Daarom willen we dit nu voor meerder weefsels goed in kaart brengen. In eerste instantie zullen we ons richten op bloed, lever, huid, (kleine) hersenen, darm en borst. ■■■■ (en in sommige gevallen ook ■■■■ of nieuw te genereren conditionele allelen voor chromosomale instabiliteit zullen in een tumorpredispositieachtergrond gekruisd worden (bijv. ■■■■ (huid, bloed, lever), Ptch1 (huid, cerebellum), Myc (cerebellum), mutant Ras (huid, darm), APC (darm), Her2 (mamma). Per weefsel zullen we 1 of enkele cohorten van dieren opzetten en volgen op het ontstaan van tumoren. Dieren zullen nauwlettend worden gevolgd (minimaal 2 maal per week) op het ontstaan van tumoren door veranderingen in gedrag en gewicht te monitoren, en/of uiterlijke veranderingen zoals zichtbare (huid) of palpeerbare (mamma) tumoren. In geval van de huid zullen we ook in een cohort dieren tumoren chemisch induceren (DMBA, TPA). Dieren zullen worden opgeofferd bij de eerste tekenen van tumoren om ongerief tot een minimum te beperken. Voor deze experimenten zullen eerst 15 dieren worden ingezet als pilot en als er meetbare verschillen zijn (Go), zal dit worden uitgebreid tot maximaal 50 dieren per cohort, zo niet, dan zal dit cohort niet verder opgevolgd worden (No-Go)

Voor deelvraag c) zullen dieren (tumor)cellen ingespoten krijgen om de groeisnelheid van de cellen in vivo te bepalen, om te kijken of de cellen zich gedragen als 'echte kankercellen' en om te bepalen hoe vaak de cellen chromosomen missegregeren. In de meerderheid van de experimenten zullen dieren hematologische (tumor)cellen ingespoten krijgen in het bloed en zal gevolgd worden of deze tumoren gaan groeien in de muis. In enkele gevallen zullen muizen subcutaan tumorcellen ingespoten krijgen om te kijken of cellen maligne zijn. In dit geval zullen de muizen onderhuidse tumoren ontwikkelen.

In de dieren zullen we verschillende uitkomst parameters meten/bepalen.

De allereerste belangrijke uitkomstparameter voor dit dierproeftype is tumorlatentie en/of tumorgrootte. Waar mogelijk meten we dit met non-invasieve imaging (fluorescent gelabelde tumoren te meten middels IVIS imager)

Daarnaast zullen we in de transposon-geïnduceerde tumoren meten waar de transposons geïntegreerd zijn (middels sequencing) om te kijken hoe de aneuploide cellen veranderd zijn in kankercellen.

Om te valideren dat de dieren inderdaad aneuploidie accumuleren in de getargete weefsels zullen we deze ontstane tumoren onderwerpen aan karyotypering middels single cell sequencing, metaphase spreads en interphase FISH. Dit gebeurt op ingevroren of gefixeerde tumorcellen.

Daarnaast zullen we de tumoren onderwerpen aan een uitgebreide histologische analyse, waar noodzakelijk gecombineerd met immunohistochemie

(ingevroren en gefixeerde weefsels). Verder zullen we de respons op aneuploidie meten middels transcriptome analyse (RNA sequencing, qPCR) en middels biochemische bepalingen (Western Blots, en mogelijk mass spectrometrie op een select aantal samples (ingevroren weefsels). Tenslotte zullen we cellijnen afleiden uit diverse tumoren om verder celbiologische metingen te kunnen doen aan de tumorcellen (time-lapse microscopie, mechanistische experimenten, etc) (vers ingevroren tumoren in kweekmedium en vers in kweek genomen tumoren).

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.

Voor deelvraag a) zullen we conditioneel aneuploide muizen kruisen met stammen waarin induceerbaar transposons gemobiliseerd kunnen worden. Cre zal dan met tamoxifen geïnduceerd worden (oraal of IP, 4-5 behandelingen binnen 2 weken, of IP PolyI/PolyC, 4-5 behandelingen om de dag) waarbij het te targetten weefsel aneuploide wordt en tegelijkertijd de transposons zullen mobiliseren. Dieren zullen dan gevolgd worden op het ontstaan van tumoren. We hebben al een succesvolle pilotscreen lopen voor bloed en willen nu ook screenen in de huid en het cerebellum om weefselspecifieke drivers van aneuploide kankers in deze weefsels bloot te leggen.

Omdat we de tumorlatentie niet kennen, zullen we eerst pilotcohorten van ongeveer 15 dieren volgen, om te bepalen of de transposons in het te bestuderen weefsel in combinatie met aneuploidie leidt tot tumoren. Als dit het geval is (validatie pilot, Go), dan zullen we in overleg met de IvD een compleet cohort inzetten van 100 dieren totaal (85 extra dieren, waarbij de 15 pilot dieren het cohort compleet maken). Mocht de pilot uitwijzen dat de dieren geen of te weinig tumoren krijgen om genetische drivers van aneuploide kanker te vinden, dan zullen we de proef voor het betreffende weefsel niet uitbreiden naar een compleet cohort (No-Go).

Als een pilot voor een ander type genetische screen zullen we onze conditionele aneuploide muizen inkruisen met de conditionele CRISPR muis (Platt et al Cell. 2014;159(2):440-55). Dieren zullen dan viraal CRISPR-guideRNA libraries toegediend krijgen en gevolgd op het ontstaan van tumoren. Omdat deze technologie nog zeer jong is, zullen we hiervoor eerst 2 kleine pilots uitvoeren, 1 in hersenen en 1 in de mamma. Als dit type screen in de pilots succesvol is (de dieren ontwikkelen reproduceerbare tumoren), dan zullen we een van deze twee weefsels kiezen (met de kortste tumor latentie of minste ongerief) voor een complete screen (Go). In de pilots zullen dieren intraveneus lentiviraal virus toegediend krijgen coderend voor de guideRNAs volgens de geldende protocollen in de literatuur.

Voor deelvraag b) zullen dieren in een deel van de cohorten geen behandelingen ondergaan, dieren zullen alleen nauwlettend gevolgd worden op het ontstaan van de genetisch geïnduceerde tumoren. In een ander deel (wanneer we gebruik maken van induceerbare Cre-drivers) zullen dieren tamoxifen of PolyI/PolyC toegediend krijgen om Cre te induceren. Dieren zullen dan nauwlettend gevolgd worden op het ontstaan van tumoren. Een deel van de tamoxifen behandelde dieren (het cohort waarin we kanker in de huid bestuderen) zal naast met tamoxifen ook met TPA/DMBA (chemische carcinogenese) behandeld worden, DMBA behandeling is eenmalig, TPA behandeling is daarna wekelijks tot er tumoren ontstaan. Dieren zullen regelmatig worden geschoren om topische toediening te faciliteren. Tijdens de behandeling zullen deze laatstgenoemde dieren nauwlettend gevolgd worden op het ontstaan van huidtumoren. Ook voor deze experimenten zullen we in eerste instantie 15 dieren per cohort inzetten als pilotcohort, waarna we bepalen of er verschillen waarneembaar zijn tussen experiment en controledieren. Zo ja (Go), dan zullen we hiervan een compleet cohort maken door maximaal 35 extra dieren in te zetten (dus 50 in totaal). Als er in de pilot geen of te kleine verschillen zijn tussen de groepen, zullen we geen extra dieren gebruiken voor het betreffende pilotcohort (No-Go).

Voor deelvraag c) zullen we om de groeisnelheid van aneuploide tumoren te vergelijken met niet aneuploide tumoren muizen injecteren met aneuploide kankercellen of niet aneuploide kankercellen. Hiervoor zullen we aneuploide en niet aneuploide tumorcellen isoleren uit onze muismodellen voor T-ALL. Deze tumorcellen zullen we labelen met een genetische fluorescente reporter om ze in vivo te kunnen traceren met de IVIS imager. Op deze wijze kunnen we volgen of de donor dieren tumoren ontwikkelen. Dieren worden opgeofferd als we een tumor waarnemen (IVIS) en tumorcellen worden dan getransplanteerd in ontvanger dieren, zodat we de groeisnelheid (het ontstaan van de tumor in de recipient) kunnen vergelijken tussen aneuploide en niet aneuploide tumoren. We zullen deze methode eerst testen op een pikotcohort van 15 dieren en indien we de groeisnelheid betrouwbaar kunnen meten, dan zullen we het cohort uitbreiden tot MAXIMAAL 50 dieren of tot het aantal dieren waarbij we significante verschillen hebben gemeten tussen de experiment en controle dieren. Indien we voorzien dat we geen significante verschillen kunnen meten in een cohort van 50 dieren, dan beschouwen we het verschil als biologisch niet significant en zullen we niet meer dieren dan de pilot gebruiken (15, No-Go).

Daarnaast zullen we kandidaatgenen die samen met aneuploidie leiden tot hematologische kankers (te vinden in de onder a beschreven transposonscreen in bloed) valideren middels transplantaties van aneuploidie bloedcellen die retroviraal/lentiviraal getranduceerd zijn met kandidaatgen cDNAs of RNAis. Deze experimenten zullen dus pas plaatsvinden (Go) als we kandidaatgenen uit de transposonscreens geïdentificeerd hebben en niet worden uitgevoerd als geen van de transposonscreens werkt (No-Go). Voor de in vivo validatie van kandidaatgenen worden longterm en shortterm hematopoietische stamcellen uit onze conditionele knockuit muizen geïsoleerd (te verkrijgen via dierproeftype 1). Deze cellen worden in kweek getranduceerd met kandidaatgenen (maximaal 5 transplantaties per gen) en Cre-reporter en daarna in immuno-compromised ontvangermuizen getransplanteerd. Dieren (maximaal 5 per te testen gen, zie ook onder motivering dieraantallen) worden dan gevolgd op de ontwikkeling van maligniteiten.

Verder zullen we kandidaatgenen valideren gevonden in de transposonscreens die leiden tot solide tumoren (darm, huid, hersenen). Aangezien dit solide tumoren zijn, zullen deze kandidaatgenen in hechtende relevante cellijnen getransduceerd worden (cDNA/RNAi, CRISPR) en subcutaan geïnjecteerd worden. Dieren worden dan gevolgd voor de vorming van subcutane tumoren (1 flank experiment, 1 flank controle) en opgeofferd als de tumoren >1 cm worden. Ook hier zullen we maximaal 5 dieren per te valideren gen gebruiken.

Tenslotte zullen we een aantal dieren gebruiken om de genomische instabiliteit en/ of frequentie van chromosoommissegregatie in getransplanteerde tumoren te quantificeren. Primaire tumorcellen zullen hiertoe worden getransplanteerd in immuno-compromised hosts. Muizen worden dan gevolgd op de ontwikkeling van maligniteiten (bloed of subcutaan) en opgeofferd om te meten hoe heterogeen de tumoren zijn. Per te analyseren tumor zullen we maximaal 5 dieren met de primaire tumor transplanteren.

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

In de meeste gevallen kennen we de latentie van de fenotypes/pathologie van de voren niet. Onze uitgebreide ervaring heeft ons geleerd, dat cohorten van 40-50 dieren per genotype voldoende zijn om een statistisch significant verschil aan te tonen tussen controle-groepen en dieren met een genetische predispositie (aneuploidie). In sommige gevallen blijken te verschillen tussen controlegroepen en experimentgroepen zo groot dat een kleiner aantal dieren volstaan had om het verschil in overleving/tumorlatentie significant aan te tonen. Om tot het minimum aantal noodzakelijke dieren te kunnen komen, zullen we daarom altijd starten met een pilotcohort van dieren (15 per groep) en deze alleen uitbreiden tot 50 dieren als er meetbare verschillen zijn tussen experiment en controledieren (Go) na overleg met de IvD. Als we geen duidelijk verschillen in een van de pilotcohorten meten zullen we het betreffende

cohort niet uitbreiden (no-Go) en concluderen dat er geen significante biologische verschillen meetbaar zijn.

In geval het volledige cohort van 50 dieren noodzakelijk is om de een significant verschil te meten zullen alle dieren (dus pilot van 15 en 35 extra dieren) als 1 experimentgroep beschouwd worden. Correctie voor multiple testing is dan ook niet noodzakelijk. Belangrijk hiervoor is wel, dat omdat alle experimenten survival curves zijn, we weining variatie in de overleving verwachten tussen de pilot en eventueel noodzakelijke uitgebreidere cohorten. In eerste instantie dienen de eerste 15 dieren echt als pilot: we gaan ervan uit (op basis van voorgaande kennis) dat 15 dieren niet voldoende is om een significant verschil tussen dieren aan te tonen. Omdat de genotypes die we testen een onbekend fenotype hebben, kunnen we niet 100% voorspellen wat het verschil in overleving zal zijn. Mocht dit verschil groter zijn dan hier ingeschat, dan zullen we post-hoc een nieuwe power analyse uitvoeren met de dan nieuw bekende gegevens (i.e. het verschil in overleving tussen de groepen en de verdeling van experimentwaardes) om zo vast te stellen of de 15 dieren voldoende zijn voor een statistisch significant verschil of dat er nog meerdere dieren noodzakelijk zijn.

In geval van transposon screens zullen we een cohort van 100 experimentdieren volgen, waarin we transposons mobiliseren in aneuploid weefsel, en 50 controledieren, waarin we transposons mobiliseren in niet aneuploide weefsel. Deze cohortgrootte wordt bepaald door het aantal dieren noodzakelijk om genomewide de belangrijkste terugkomende integratie sites - common insertion sites of CIS - te identificeren. In elke tumor zullen op basis van sequencing de meest belangrijke integratiesites worden geïdentificeerd. Zo vinden we in elke tumor de zogenaamde 'driversmutaties' van de tumor. Omdat elke tumor 'uniek' is, zullen we daarna de integratiesites vergelijken binnen alle tumoren in het totale cohort. Op deze wijze kunnen we uitvinden welke drivermutaties vaker voorkomen binnen het cohort. Deze steeds terugkomende integratiesites (de CIS) zijn mogelijke specifieke drivers voor aneuploide tumoren en dus de kandidaatgenen die van aneuploide cellen aneuploide kankercellen maken. Onze ervaring en daarnaast de uitgebreide ervaring van onze collega's met dit type transposonscreen (zie ook (Rad et al, Nat. Gen. 2015 Jan;47(1):47-56) heeft uitgewezen dat met deze hoeveelheden dieren de meest belangrijke common insertion sites worden gevonden: de CIS worden dan voldoende vaak gevonden in de cohorten om zeker te zijn dat de belangrijkste drivers in dit type studie dan gevonden zijn.

Belangrijk om nogmaals te benadrukken is dat we deze screens sequentieel zullen uitvoeren te beginnen met het hematopoietisch systeem. Alleen als blijkt dat een groot aantal hits in de eerste screen weefselsspecifiek is, zullen we een screen in een volgend weefsel uitvoeren (zoals beschreven onder B). Na een tweede screen zullen we de overlap tussen de eerste twee screens bekijken en op basis daarvan beslissen of we in een derde en/ of vierde weefsel gaan screenen. We zullen daarnaast ook altijd beginnen met een pilotscreen om te kijken of er daadwerkelijk transposons-geïnduceerde tumoren ontstaan in het te onderzoeken weefsel.

Belangrijk: ook beschouwd vanuit een power-analyse is 40-50 dieren per cohort een reële schatting: in ons geval is de variatiecoëfficiënt sigma vooraf niet bekend; de proefgrootte wordt daarom afgelezen van een uit Owen afgeleide grafiek (Proefdieren en Dierproeven, L.F.M van Zutphen, vijfde druk, 2009, blz 211). Op basis van een onbetrouwbaarheidsdrempel (alfa) van 0.05 of een power (π) van > 0.8 en een verhouding tussen het te meten verschil ($\mu_1 - \mu_2$) en variatiecoëfficiënt van ongeveer 0.7 (dit betekent dat er bij een spreiding van bijvoorbeeld 2 maanden in de overleving binnen 1 groep een significant verschil gemeten wordt als de gemiddelde overleving tussen experiment en controlegroep 1.5 maanden uit elkaar ligt; dit zijn reële waarden die we in de praktijk vaak waarnemen) valt er uit de grafiek af te lezen dat de proefgrootte ongeveer 40-50 dieren dient te zijn.

B. De dieren

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

Alle experimenten zullen worden uitgevoerd op volwassen muizen. We maken gebruik van zowel mannen als vrouwen, tenzij we in de mamma kijken, dan gebruiken we alleen vrouwen. We verwachten namelijk geen sexe specifieke effecten. Voor dit type dierproef zullen alleen volwassen muizen uit eigen fok (heel soms bestellen we dieren vanuit extern, ██████ gebruikt worden, in sommige gevallen zullen dieren als jong volwassene al behandeld worden op Cre te activeren.

2a)

Voor de transposonscreens (bloed, huid, cerebellum en darm):

We zullen MAXIMAAL in 4 weefsels transposonscreens uitvoeren (te beginnen in bloed), zie hierboven voor fasering en Go/No-Go keuzes. Hiervoor hebben we per weefsel maximaal 100 experiment dieren en 50 controledieren per weefsel nodig.

Subtotaal transposonscreens: 600 dieren

Voor de CRISPR screen zullen we 2 pilot cohorten (in hersenen en mamma) uitvoeren van 15 dieren elk. Voor een van deze weefsels (afhankelijk van de uitkomst van de pilot) zullen we een volledige screen doen (ook 100 dieren + 50 controledieren). Bij de volledige screen zullen we de 15 dieren van de pilot voor het uiteindelijk gekozen weefsel meenemen in het totaal aantal experiment dieren (100).

Subtotaal CRISPR screen: 165 (150 voor volledige screen inclusief de dieren in een van de pilots + 15 dieren in andere pilot die niet in volledige screen uitmondt).

2b)

Aneuploide lymfocyt cohorten; T-cel specifiek en geheel bloed:

Experiment aneuploid T-cel lymfocyt cohort: 50 dieren, niet aneuploid controle T-cel lymfocyt cohort: 50 dieren

Experiment aneuploid bloedkanker cohort: 50 dieren, niet aneuploid controle bloedkanker cohort: 50 dieren

Subtotaal bloed: 200 dieren

Aneuploide medulloblastoma cohorten: In deze cohorten combineren we aneuploidie met een aantal bekende medulloblastoma predisposities in 4 verschillende combinaties van aneuploidie met of zonder ██████ verlies en met of zonder Myc overexpressie.

Per cohort (4 in totaal, inclusief controles) testen we maximaal 50 dieren.

Subtotaal brein 200 dieren

Aneuploide squamous cell carcinoma en basal cell carcinoma cohorten: Voor basal cell carcinoma testen we een genetisch model (aneuploide gecombineerd met Ptch1 verlies) en chemische carcinogenese. Voor squamous cell carcinoma testen we alleen een genetisch model (aneuploide gecombineerd met ██████ verlies).

Voor basal cell carcinoma testen we 3 cohorten (2 experimenteel, 1 controle) van maximaal 50 dieren en voor squamous cell carcinoma 2 cohorten van maximaal 50 dieren (1 experimenteel, 1 controle), dus in totaal 5 cohorten.

Subtotaal huid: 250 dieren

Aneuploide hepatocellulair adenoma/carcinoma:

Experiment aneuploide levertumoren: 50 dieren, controle niet aneuploide levertumoren: 50 dieren

Subtotaal lever: 100 dieren

Mammatumoren (WAP-Cre):

Aneuploide mammatumoren: 50 dieren, niet aneuploide controle mammatumoren: 50 dieren

Subtotaal mamma: 100 dieren

Darmkanker: Voor het modelleren van darmkanker zullen we twee verschillende combinaties van aneuploidie met verschillende predisposities (RasV12, ████, APC) en twee controle cohorten testen met maximaal 50 dieren per cohort.

Subtotaal darm: 200 dieren

Daarnaast genereren we ook enkele nieuwe conditionele modellen voor chromosomale instabiliteit (zoals beschreven in dierproef type 1). Naast dat we onder dierproef type 1 in deze modellen zullen kijken wat de effecten van de genmutaties zijn op aneuploidie in de muis, zullen we ook kijken of deze mutaties inderdaad leiden tot aneuploide kanker. Hiertoe zullen we in eerste instantie de mutaties activeren in het bloed (waar de tumorigenese in de muis in het algemeen het snelst verloopt) en misschien in huid. Omdat we deze kandidaatgenen nog in celweek aan het testen zijn, weten we de gennamen hiervan nog niet. We verwachten de komende 5 jaar ongeveer 4 van deze modellen te genereren (zie ook onder dierproef type 1). Per gen zullen we 1 tumorpredispositie (████ testen) in T-cellen. Het T-cel controle cohort (zie ook dierproef type 1) dubbelt hier als controle. Per gen vragen we dan ook 50 dieren aan in dit type dierproef dus 200 in totaal.

Subtotaal nieuw te testen genen: 200 dieren

2c)

Metten groeisnelheid aneuploide tumoren: (████████████████); in T-cellen)

Om te meten of aneuploide tumoren sneller of langzamer groeien dan niet aneuploide tumoren, zullen we aneuploide tumoren isoleren uit onze twee modellen (████████████████) voor aneuploide T-ALL. Deze tumoren zullen we transplanteren in recipient muizen en meten hoe lang het duurt voordat deze tumorcellen een nieuwe tumor vormen in vergelijking met een transplantatie van een niet aneuploide tumor. Per genotype (3 in totaal) hebben we 50 donor dieren en 50 recipient dieren nodig, 300 in totaal. Voor 2 genotypes (100 dieren) kunnen we de donor tumorcellen isoleren uit dieren die we ook onder 2a (aneuploide T-cel tumoren) nodig hebben (vermindering).

Subtotaal: 200 dieren

Valideren rol kandidaatgenen (uit 2a) in maligne transformatie van aneuploide cellen naar aneuploide kankercellen

We verwachten ongeveer 10 genen per weefsel (voor maximaal 4 weefsels in totaal: huid, cerebellum, darm, bloed) in vivo te moeten valideren (het merendeel van de kandidaatgenen valt af op basis van eerste in celweek validatie). Hiervoor moeten we 5 experiment en 5 controledieren per gen testen.

Subtotaal: 4 weefsels, 10 genen per weefsel, 10 dieren per gen = 400 dieren

Metten chromosomale instabiliteit en aneuploidie in tumoren:

We willen maximaal een totaal van 20 tumoren (10 aneuploide (experiment transplantaties) en 10 niet aneuploide (controle transplantaties)) onderzoeken.

Per tumor zullen we maximaal 5 muizen injecteren. We hebben hiervoor maximaal 100 dieren nodig.

Subtotaal aneuploidie metingen: 100 dieren.

Voor deze experimenten zullen we een aantal nieuwe muizenstammen genereren. We verwachten geen ongerief in de fok van deze dieren, maar omdat we

dit van te voren niet kunnen uitsluiten gelden de eerste twee generaties als fok met ongerief. 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. Voor de hierboven beschreven cohorten zullen we in totaal 30 nieuwe genotypes genereren.

Subtotaal fok met ongerief: $30 \times 48 = 1440$ dieren.

Totaal: 4155 dieren

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.

Controlegroep al aanwezig in dierproef type 1

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.

Waar mogelijk doen we onze experimenten met celkweekexperimenten, maar het blijkt dat cellen in celkweek vaak anders op aneuploidie reageren dan cellen in hun eigen fysiologische niche. Daarom, om tot aneuploidie-selectieve therapie te komen, is het van cruciaal belang om aneuploidie in diermodellen te onderzoeken.

De nieuw te testen kandidaatgenen voor chromosomale instabiliteit zullen we eerst in weefselkweek testen, zodat alleen relevante genen in de muis getest worden (vervanging en vermindering). Verder gebruiken we controlecohorten en het materiaal daaruit voor verschillende type dierproeven (hier dierproeftypes 1 en 2) (vermindering). In de keuze van onze weefsels die we onderzoeken, hebben we met name gekozen voor weefsels waarin tumoren snel opgemerkt worden en daarnaast en daarom tot relatief weinig ongerief leiden (verfijning). Door waar mogelijk pilotexperimenten te doen alvorens gehele cohorten te volgen kunnen experimenten waarbij geen significant verschil meetbaar is, worden voorkomen (vermindering). Daarnaast zullen we de transposonexperimenten gefaseerd uitvoeren en na elk experiment bekijken of we in meer weefsels willen kijken wat mogelijk leidt tot vermindering.

Verder maken we gebruik van het genetisch fluorescente labelen van tumoren waar mogelijk, zodat we tumoren kunnen opsporen voor ze tot ernstig ongerief

leiden (verfijning) en verschillende tumorstadia in kaart kunnen brengen door dezelfde muizen vaker te meten (vermindering).

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 in tumorcohorten worden minimaal 2 maal per week nauwkeurig geïnspecteerd op tekenen van ongerief. Gaande onze voortgang zullen we beter weten wanneer dieren ziek worden en rond die periode zullen we de waarnemingen intensiveren. Dieren zullen worden opgeofferd zodra ze de eerste tekenen van tumoren of ander ongerief vertonen zodat ongerief tot een minimum beperkt wordt. Hiertoe worden dieren dagelijks geïnspecteerd door medewerkers van de diervoorzorg en minimaal 2 maal per week door de verantwoordelijke onderzoeker.

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 zijn nog niet eerder uitgevoerd. Hiervoor hebben we een uitgebreide zoekopdracht op PubMed uitgevoerd en daarnaast gesproken 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.

Dieren zullen bij eerste tekenen van ongerief/pljn worden opgeofferd.

☐ Ja

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Motorische problemen in de cohorten met hersentumoren, jeuk bij dieren met (beginnende) huidtumoren, anemie bij dieren met lymphoma/leukemie, gewichtsverlies (bij alle dieren met tumoren), tumoren in de aangedane weefsels

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Aantasting van het functioneren van de aneuploide weefsels en uiteindelijk tumorvorming in deze weefsels

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

Dieren zullen zeer regelmatig (minimaal 2 maal per week) uitgebreid geïnspecteerd worden door de verantwoordelijke onderzoeker en worden dagelijks door de dierv verzorging gecontroleerd. De onderzoekers zullen de inspecties intensiveren als dieren in de periode komen dat de tumoren zich gaan ontwikkelen. Dieren zullen worden opgeofferd zodra ze ongerief ondervinden (motorische problemen, kortademigheid, zichtbare of palpeerbare tumoren, kromme rug, etc). Verder worden dieren opgeofferd als ze lethargisch zijn, meer dan 20% gewicht verloren zijn, of ernstige verwondingen (vechten, krabben) hebben.

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.

Doordat we de dieren regelmatig controleren en dit intensiveren in de periode dat de dieren ziek worden, zal alleen n de minderheid van de gevallen dieren dusdanig ernstig ziek worden dat de op basis van humane eindpunten opgeofferd dienen te worden, in onze ervaring is dit in minder dan 5% van de gevallen. Dit zal zijn als de dieren moribund zijn, ernstige motorische afwijkingen hebben (omvallen, meerdere malen epileptische aanvallen krijgen) lethargisch zijn, >20% van hun gewicht verloren zijn of ernstige (vecht)wonden hebben.

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

We streven ernaar dat zo min mogelijk dieren dit criterium zal halen, we verwachten minder dan 5% van de dieren.

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.

Het cumulatief ongerief schatten we in als matig.

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 zullen uitgebreid worden onderzocht op macroscopische pathologie en weefels zullen worden opgestuurd voor histologie, zie ook de hierboven beschreven te meten uitkomstparameters. Verder zullen aangedane organen worden opgeslagen voor verder onderzoek (eiwit, RNA, DNA, aneuploidiemetingen, en transposonintegratiebepaling)

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



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.	Volgnummer	Type dierproef
		3	Muismodellen voor het visualiseren van aneuploidie en chromosoomsegregatie

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.

In dit type dierproef zullen we in levende muizen chromosoommissegregatie en aneuploïdie visualiseren. Dit is belangrijk, omdat ons voorgaand werk laat zien dat aneuploidie (zoals onderzocht in de eerste twee dierproeftypes) in vivo beter getolereerd wordt dan we eerder aannamen. In dit dierproeftype willen we chromosoomsegregatie visualiseren middels intravital imaging, gebruikende van de diermodellen uit dierproeftype 1 en 2. Hiertoe ontwikkelen we muismodellen waarin we diverse structuren van mitotische cellen genetisch fluorescent labelen. Onze te gegenereerde conditionele muismodellen voor mitotische structuren zullen in eerste instantie worden ingekruisd met ons model voor aneuploidie in de huid, maar mogelijk ook in andere orgaansystemen (bijv darm): deze modellen zijn beschreven in deelaanvraag 1 en 2. Indien nodig, zullen we celdeling (of zelfs tumoren) induceren (genetisch dan/wel

chemisch), zoals beschreven in dierproef type 2. Dieren zullen dan een intravital imaging window geïmplanteerd krijgen in huid of buikwand en dan onder verdoving gefixeerd worden onder een multi-photon microscoop opstelling zodat we individuele cellen kunnen volgen.

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.

Aneuploïde en niet aneuploïde mitotische marker dieren zullen window chambers geïmplanteerd krijgen, al dan niet na inductie van celdeling met TPA (2 x per week, enkele weken voorafgaande aan het imaging experiment; of DMBA (1x) + TPA, 2 keer per week totdat er tumoren ontstaan). DMBA (7,12-dimethylbenz[a]anthracene) dient als mutagen om mutaties in de huid aan te brengen, TPA (12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate) leidt tot een ontstekingsreactie en daarmee celdeling tot celdeling: deze tweestapscarcinogenese is een efficiënte manier om huidtumoren in de muis te provoceren (Filler et al, CSH Protoc. 2007 Sep 1;2007:pdb.prot4837). DMBA en TPA zullen topisch worden aangebracht volgens een standaard huidmutagenese protocol (Filler et al, CSH Protoc. 2007 Sep 1;2007:pdb.prot4837). Door dit protocol treedt er alleen mutagenese lokaal in de huid op.

Voor imaging zullen de dieren gesedeerd worden en onder sedatie voor enkele uren gefixeerd worden onder de microscoop om individuele celdelingen te visualiseren en aneuploidie te quantificeren in vivo. De exacte protocollen zullen worden overgenomen van en geleerd bij het lab van [REDACTED].

[REDACTED] heeft protocollen waarbij de window chambers meerdere weken goed blijven zitten zonder ongerief voor de muizen: deze protocollen zullen we leren van de biotechnici bij [REDACTED] en hier implementeren.

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

Per weefseltype en genotype (eventueel met/zonder behandeling, zie toelichting dieren) zullen we maximaal 10 dieren monitoren, met maximaal 4 metingen per dier met minimaal 1 week tussen de individuele metingen. In deze opzet krijgen we in totaal per genotype 40 metingen (4 per dier, 10 dieren totaal), wat voldoende is om biologische verschillen significant aan te tonen: zie ook statistische toelichting onder dierproeftypes 1 en 2). Per genotype zullen we tot 2 types mitosemarker-muizen testen (met verschillende kleurcombinaties, verschillende (mitose) markers), daarom vragen we 20 dieren per genotype aan. We zullen ons in eerste instantie richten op imaging in de huid en darm (2 goed toegankelijke weefsels) en indien succesvol (Go) in tweede instantie ook op imaging van de mamma, en daarna mogelijk ook de lever.

In de aanloop zullen we 20 dieren gebruiken om de intravital imaging methodieken te leren [REDACTED] en te optimaliseren. We zullen pas de 'echte metingen' starten als we de imaging methodiek geoptimaliseerd hebben (Go), maar zijn vrij zeker dat dit zal lukken, omdat dit type imaging al routinematig gedaan wordt in het [REDACTED]

B. De dieren

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

Alle experimenten zullen worden uitgevoerd op volwassen transgene muizen. We maken gebruik van mannen en vrouwen, omdat we geen verschillen verwachten tussen de sexes. Voor dit type dierproef zullen alleen volwassen muizen uit eigen fok (heel soms bestellen we dieren vanuit extern, zoals van [REDACTED]) gebruikt worden, in sommige gevallen zullen dieren als jong volwassene al behandeld worden op Cre te activeren. Binnen dit type dierproef zullen we de volgende cohorten volgen:

Optimaliseren imaging (mitose-marker): 20 dieren

Subtotaal 20 dieren

Huid:

Controle muizen; 2 te testen mitose-markers: 20 dieren

Aneuploide muizen; 2 te testen mitose-markers: 20 dieren

Controle muizen; inductie celdeling met TPA; 2 te testen mitose markers: 20 dieren

Aneuploide muizen; celdeling inductie met TPA; 2 te testen mitose markers: 20 dieren

Controle muizen; huidtumor inductie met DMBA/TPA; 2 te testen mitose markers: 20 dieren

Aneuploide muizen; huidtumorinductie met DMBA/TPA, 2 te testen mitose markers: 20 dieren

Subtotaal 120 dieren

Darm:

Controle muizen, 2 te testen mitose markers: 20 dieren

Aneuploide muizen, 2 te testen mitose markers: 20 dieren

Subtotaal 40 dieren

Indien imagin in huid en darm succesvol is zullen we ook nog in mamma en/of lever kijken. We hebben dan de bestaande mitosemarkers goed geanalyseerd en gebruiken hier dan alleen de meest geschikte mitosemarkermuis. We hebben hier dan 20 dieren per weefsel, 10 experiment, 10 controle voor nodig. Deze experimenten vinden plaats in nauw overleg met en met advies van [REDACTED].

Subtotaal 40 dieren.

Om alternatieven voor intravital imaging dierproeven te exploreren zullen we vanuit een aantal dieren organoids afleiden uit de darm en cerebellum. Hiervoor zullen we maximaal 10 reporterdieren opofferen per genotype voor 4 genotypes in maximaal 2 weefsels: 2 mitosemarkers, 10 experiment (genotype 1) en 10 controle (genotype 2) dieren: 80 dieren totaal. Deze organoids zullen we dan imageren als alternatief voor het imageren in dieren. Dit experiment kan aanleiding vormen om in een vervolgaanvraag meer experimenten in organoids te doen en minder in dieren.

Subtotaal 80 dieren

Subtotaal imaging: 300 dieren.

Voor deze experimenten zullen we een aantal nieuwe muizenstammen genereren. We verwachten geen ongerief in de fok van deze dieren, maar omdat we dit van te voren niet kunnen uitsluiten gelden de eerste twee generaties als fok met ongerief. 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. Voor de hierboven beschreven cohorten zullen we 10 nieuwe genotypes genereren.

Subtotaal fok met ongerief: $10 \times 48 = 480$ dieren.

Totaal aangevraagd voor dierproeftype 3: 780 dieren.

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.

Waar mogelijk zullen we i.p.v. dieren organoids (dus in weefselkweek) imager (vervanging, vermindering) en bekijken of we in de toekomst meer met organoids kunnen als vervanging van dierproeven. Dieren zullen passende pijnstilling krijgen waar noodzakelijk (verfijning). Verder zullen we dezelfde dieren meerdere malen bekijken, wat dus leidt tot vermindering van het aantal proefdieren. Tenslotte zullen we de minst invasieve window chambers gebruiken: verfijning.

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.

Gedurende het gehele experiment zullen de muizen gesedeeerd zijn, zodat ze geen ongerief ondervinden van het imager. Dieren zullen tijdens en na de operatie van passende pijnstilling voorzien worden. Tenslotte zullen de dieren met imaging chambers nauwgezet gevolgd worden op de eventuele ontwikkeling van complicaties van de window chamber (lokale ontsteking) en hiervoor behandeld worden en opgeofferd worden indien dit te ernstig is/ niet behandelbaar is. De ervaring van [REDACTED] leert dat de imaging chambers zonder ongerief meerdere weken blijven zitten.

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 zijn nog niet eerder uitgevoerd. Hiervoor hebben we een uitgebreide zoekopdracht op PubMed uitgevoerd en daarnaast gesproken met onze diverse collega's die dit soort modellen ontwikkelen ([REDACTED])

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?

De dieren ondervinden ongerief van de ingreep om het imaging window te implanteren en een deel van de dieren zal huidtumoren ontwikkelen die jeuk kunnen geven.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Chirurgische ingreep en huidtumoren.

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

Dieren met imaging windows zullen om de dag geïnspecteerd worden door onderzoekers en dagelijks door dierversorgers en gedurende het imaging experiment constant in de gaten gehouden worden om te waarborgen dat ze goed verdoofd zijn en geen ongerief ondervinden.

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.

In de minderheid van de gevallen zullen dieren dusdanig ernstig ziek worden dat de op basis van humane eindpunten opgeofferd dienen te worden. Dit zal zijn als de dieren moribund zijn, lethargisch zijn, >20% van hun gewicht verloren zijn, ernstige ontstekingen rondom de window chamber ontwikkelen, of ernstige (vecht)wonden hebben.

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

We verwachten dat minder dan 2% van de dieren moet worden getermineerd vanwege dit criterium.

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.

Het cumulatief ongerief schatten we in als matig.

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 zullen uitgebreid worden onderzocht op macroscopische pathologie en weefsels zullen worden opgestuurd voor histologie. Verder zullen aangedane organen worden opgeslagen voor verder onderzoek (eiwit, RNA, DNA, en single cell sequencing in enkele gevallen). De histologie van de weefsels zal worden vergeleken met de intravital imaging data.

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: (Intern RUG code **8044**)

Titel van het project: **De rol van aneuploïdie in kanker**

Titel van de NTS: **De rol van aneuploïdie in kanker**

2. Type aanvraag:

☐ **nieuwe aanvraag projectvergunning**

3. Contactgegevens DEC:

naam DEC : **DEC-RUG**

telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]

mailadres contactpersoon : [REDACTED]

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

- ontvangen door DEC: **13-01-2016**
- aanvraag complete: **13-01-2016**
- in vergadering besproken: **22-01-2016**
- anderszins behandeld: **09-03-2016**
- termijnonderbreking(en) van / tot: **22-01-2016 tot 23-02-2016**
- besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen. **n.v.t.**
- aanpassing aanvraag: **23-02-2016**
- advies aan CCD: **15-03-2016**

5. 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 wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag

6. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: **22-01-2016**
- Strekking van de vraag / vragen:
Gevraagd is naar een betere onderbouwing van het aantal dieren, betere beschrijving van de uitleesparameters en betere beschrijving van de connecties tussen de bijlagen
- Datum antwoord:
Strekking van het (de) antwoord(en): **De gevraagde verduidelijkingen zijn verwerkt in het projectvoorstel en de bijlages. De antwoorden hebben geleid tot uitgebreide aanpassing van de aanvraag.**

7. 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. **Ja.**
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:

- ☐ uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord **Ja.**

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 **substantieel**.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Naar de overtuiging van de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie / aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren. **Ja, de experimenten die zijn voorgesteld zijn prima en gangbaar van opzet. Op deze wijze zal kennis over basale eigenschappen van aneuploidie en de effecten daarvan op een organisme verkregen worden. Aanvrager heeft ruime ervaring in dit veld en werkt samen met andere vooraanstaande wetenschappers. Waar nodig wordt kennis en expertise via samenwerkingen verkregen.**
5. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. **De onderzoekers gebruiken de muis, de keuze hiervoor is wetenschappelijk ruim voldoende onderbouwd.**
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. **Ja, die is realistisch ingeschat**
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. **Nee, dit werk kan in essentie alleen in levende, intacte organismen worden uitgevoerd**
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren lijkt realistisch ingeschat. De aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om, bij wettelijk vereist onderzoek, te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. **Ja, het aantal dieren is beperkt tot wat wetenschappelijk kan worden verantwoord. Beide geslachten worden gebruikt, experimenten worden via pilots gefaseerd uitgevoerd om het aantal te beperken en gedood in voorraad te minimaliseren.**
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven en het project is zo opgezet dat de behandeling van de dieren zo humaan mogelijk wordt uitgevoerd. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten. **Ja, experimenten worden zodanig gedaan dat ongerief tot een minimum wordt beperkt. Onderzoek naar de effecten van**

aneuploidie worden met name gedaan in weefsels waarvan het aannemelijk is dat de dieren relatief weinig last van deze effecten hebben. Er zijn geen belangwekkende milieueffecten te verwachten.

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

D. Ethische afweging

Twee van de drie tumoren zijn aneuploide, terwijl het omliggende normale weefsel dat niet is. Dit biedt een uitstekend aanknopingspunt om met behulp van de hier voorgestelde dierproeven therapieën of strategieën te ontwikkelen die specifiek op aneuploide cellen zijn gericht. Het mogelijke maatschappelijk belang is helder, kanker is een veel voorkomende ziekte met grote maatschappelijke, sociale en economische gevolgen. Betere, specifiekere behandelingsmethoden zijn van groot belang. Onderzoek naar de systemen die aneuploidie reguleren en wat de gevolgen daarvan zijn voor een weefsel/organisme is nodig om de basale biologie van aneuploidie in de context van weefsel homeostase, veroudering en tumorigenese beter te begrijpen. Dergelijk onderzoek is deels alleen uit te voeren in dieren, en met name in muizen waarin veel genetisch gemodificeerde stammen beschikbaar zijn. Het gebruik van de diersoort zoals hier benoemd is daarom te rechtvaardigen. Hoewel de dieren worden geschaad in hun belangen (ze ervaren eventueel ongerief door de experimentele handelingen) is dit door de onderzoekers zo veel mogelijk beperkt en weegt het wetenschappelijk en op termijn maatschappelijk belang van het onderzoek daar tegen op.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen
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
AVD105002016465

Bijlagen

2

Datum 16 maart 2016

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw ,

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 16 maart 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD105002016465. 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: 01179037
Straat en huisnummer: A. Deusinglaan [REDACTED]
Postcode en plaats: 9713AV GRONINGEN

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: Universitair docent
Afdeling: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

Gegevens gemachtigde

Postcode en plaats:

Wat mag de gemachtigde
doen?

GRONINGEN

- ☐ Een projectvergunning aanvragen
- ☐ Een wijziging op een verleende
projectvergunning aanvragen
- ☐ Een melding doorgeven op een verleende
projectvergunning
- ☐ Een bezwaarschrift indienen en daarover communiceren
met de Centrale Commissie Dierproeven en alle andere
handelingen verrichten die nodig zijn voor een goede
afwikkeling van het bezwaarschrift
- ☐ Alle bovenstaande opties

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 april 0206

Geplande einddatum:

31 maart 2021

Titel project:

De rol van aneuploidie in kanker

Titel niet-technische
samenvatting:

De rol van aneuploidie in kanker

Naam DEC:

DEC-RUG

Postadres DEC:

A. Deusinglaan 1, XXXXXXXXXX

E-mailadres DEC:

secrdec.umcg@umcg.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen:

€ 1.441,-

De leges voldoet u:

na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:

- ☒ Projectvoorstel
- ☒ Beschrijving Dierproeven
- ☒ Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

- ☒ Melding Machtiging
- ☒ DEC-advies

Ondertekening

Naam:



Functie:



Plaats:

GRONINGEN

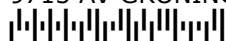


> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

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
AVD105002016465

Bijlagen

2

Datum 16 maart 2016

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 16 maart 2016

Vervaldatum: 15 april 2016

Factuurnummer: 16700465

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD105002016465	€ 1.441,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL41RBOS 056.999.6317 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

t.a.v. [REDACTED]

A. Deusinglaan [REDACTED]

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

Aanvraagnummer

AVD105002016465

Uw referentie

uw ref

Bijlagen

1

Datum 09 mei 2016

Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 16 maart 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "De rol van aneuploidie in kanker" met aanvraagnummer AVD105002016465. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Onduidelijkheden

- 1) In bijlage 1 beschrijft u onder A dat "In geval van HSC transplantaties zijn 25 dieren per groep in onze ervaring voldoende". In de proef onder B waarin u donor en ontvangerdieren beschrijft, spreekt u echter over 50 dieren per groep. Kunt u dit verhelderen?
- 2) In bijlage 2 beschrijft u dat u controlecohorten en het materiaal daaruit gebruikt voor verschillende dierproeftypes. In bijlage 2 beschrijft u echter voor elke proef alsnog een controlecohort. Dit lijkt dubbel. Kunt u dit verhelderen?
- 3) In de NTS heeft u de ongeriefsclassificatie uitgesplitst van licht tot ernstig. In de bijlagen dierproeven spreekt u over licht dan wel matig ongerief. Kunt u de ongeriefsclassificatie in de projectaanvraag beter uitsplitsen?
- 4) Hiermee samenhangend willen wij u vragen beter te onderbouwen waardoor het ongerief bij de verschillende muismodellen wordt veroorzaakt.
- 5) De humane eindpunten die u beschrijft zijn algemene humane eindpunten. Is het mogelijk deze voor de verschillende modellen specifiek te maken?

6) In bijlage 3 beschrijft u dat u gebruik maakt van diermodellen uit bijlage 1 en 2, maar u voert ook het genereren van nieuwe muizenstammen op. Kunt u dit verhelderen?

7) In bijlage 3, vraag D schrijft u: "Gedurende het gehele experiment zullen de muizen gesedeerd zijn,...". Wij nemen aan dat u bedoelt dat de dieren tijdens het imagen gesedeerd zijn. Kunt u dit bevestigen?

Datum

09 mei 2016

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD105002016465

Wij vragen u deze informatie te verduidelijken.

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

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Stuurt u het per post op, gebruik dan het formulier dat u bij deze brief krijgt.

Wanneer een beslissing

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

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.

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.centralecommissiedierproeven.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 | | | |



Format Projectvoorstel dierproeven

- Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie over het projectvoorstel 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.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul de titel van het project in.

2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*
- ☒ 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 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2 aangekruiste categorieën.

- Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn.
- Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en).
- Geef in geval van 'hoger onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

Elke celdeling wordt ons erfelijk materiaal gerepliceerd en verdeeld over de twee nieuwe ontstane dochtercellen. Soms maken cellen een fout bij het verdelen van de chromosomen en ontstaan er twee cellen met een afwijkende hoeveelheid DNA. Dit proces noemen we chromosomale instabiliteit; de cellen met afwijkende hoeveelheden chromosomen noemen we aneuploïde. Kankercellen maken dit soort van fouten frequent en **twee van de drie tumoren zijn dan ook aneuploïde**. Omdat de omliggende gezonde cellen zelden tot niet aneuploïde zijn, vormt aneuploidie een veelbelovend aangrijppunt voor kankertherapie. Om tot zulke therapie te kunnen komen, moeten we eerst beter begrijpen waarom de meeste kankers aneuploïde zijn en dus wat de gevolgen zijn van aneuploidie voor het ontstaan van kanker.

Hiertoe zijn in de afgelopen 15 jaar diverse muismodellen gemaakt waarin systemisch (dus in alle weefsels van de muis) aneuploidie werd geprovoceerd. In deze modellen werden genen uitgeschakeld in het 'mitotic spindle checkpoint', een mechanisme dat in mitose bepaalt of alle chromosomen correct gebonden zijn aan de mitotische spoel. Het inactiveren van dit mechanisme leidt tot frequente fouten in de chromosoomverdeling en dus tot aneuploidie. Het systemisch inactiveren van genen in het mitotic spindle checkpoint leidt in alle gevallen tot vroege embryonale letaliteit (~E6.5). Heterozygote dieren lieten milde aneuploidie zien en in sommige gevallen een iets verhoogde frequentie van kankers (als de dieren een kankerpredispositie lieten zien, ontwikkelde ongeveer 1/3 van de dieren tumoren na 18-24 maanden) (zie voor review: [redacted]). In veel gevallen waren deze dieren wel gevoeliger voor geïnduceerde kankers (bijvoorbeeld door het inactiveren van [redacted] of het blootstellen aan carcinogene stoffen). Samengevat hebben deze modellen ons geleerd dat chromosomale instabiliteit kanker versnelt maar dat het (in de muis) geen primaire oorzaak is van kanker. Verder lieten enkele van de modellen versnelde veroudering zien, wat suggereert dat aneuploidie ook gerelateerd is aan veroudering. Ondanks dat deze modellen wel de relatie tussen aneuploidie, kanker en veroudering hebben geschetst, zijn deze modellen minder geschikt om de moleculaire gevolgen van aneuploidie in kanker te onderzoeken, omdat de tumoren in deze modellen zeldzaam zijn, in diverse weefsels ontstaan en pas laat in het leven van de muis. Om in deze modellen de gevolgen van aneuploidie in kaart te brengen zouden onnodig veel dieren nodig zijn.

Wij hebben daarom conditionele knockout (cKO) muizen gemaakt, waarin we in weefsels naar keuze het mitotic spindle checkpoint kunnen uitschakelen ([redacted] cKO) of verzwakken ([redacted] cKO). Middels deze modellen onderzoeken we wat te moleculaire gevolgen zijn van aneuploidie voor weefselontwikkeling, en verder hoe aneuploidie leidt tot kanker. In deze modellen kunnen we ernstige aneuploidie veroorzaken op weefselniveau en op deze wijze hebben we een tumormodel (T-cell acute lymphoblastic lymphoma) kunnen ontwikkelen, waarin 100% van de muizen binnen 3 maanden [redacted] of 4 maanden ([redacted]) aneuploïde lymphomen ontwikkelen. Dankzij deze modellen hebben we een zeer reproduceerbaar en gedefinieerd tumorcohort kunnen genereren, en kunnen we beter de moleculaire gevolgen van aneuploidie in kaart brengen.

Zoals de eerdere modellen al suggereerden, laten ook onze modellen zien dat chromosomale instabiliteit alleen niet voldoende is voor kanker. We hebben dit

laten zien in T-cellen (), de lever () en de huid (), wat aangeeft dat aneuploïde cellen nog extra mutaties nodig hebben om te transformeren in aneuploïde kankercellen. Daarnaast hebben we gevonden dat verschillende celtypen op verschillende wijze omgaan met aneuploidie. Zo blijken T-cellen (), levercellen () en basal epidermal cells () vrij goed tegen aneuploidie te kunnen, in tegenstelling tot bijvoorbeeld de bulge stamcellen van de huid, die in de haarfollikel liggen (). Dit laatste type cellen gaat net als cellen in weefselweek relatief snel dood (Kops et al, PNAS, 2004 Jun 8;101(23):8699-704) t.g.v. aneuploidie. Dit geeft aan dat de verschillende celtypen op verschillende wijze omgaan met aneuploidie en benadrukt het belang van weefselspecifieke knockouts om te komen tot therapieën die selectief aneuploïde kankers aanpakken.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

- In het geval het project gericht is op één of meer onderzoeksdoelen: op welke vra(a)g(en) dient dit project antwoord(en) te verschaffen?
- In geval het een ander dan een onderzoeksdoel betreft: in welke concrete behoefte voorziet dit project?

Ondanks dat twee van de drie kankers aneuploïde zijn, leidt aneuploidie in weefselweek tot een groeinadeel, niet een groeivoordeel (Kops GJPL et al, Proc Natl Acad Sci USA. 2014;101:8699–704); (Williams BR, et al Science; 2008; 322:703–709). Dit suggereert dat aneuploïde kankercellen zich aan hebben weten te passen aan de nadelen van aneuploidie. Dit betekent ook, dat als we beter begrijpen hoe aneuploïde kankercellen omgaan met de (nadelige) gevolgen van aneuploïde, we mogelijk kunnen komen tot manieren om aneuploïde kankercellen selectief te doden, het lange-termijn doel in mijn lab. Daarvoor moeten we in eerste instantie beter begrijpen hoe kankercellen en niet-kwaadaardige cellen omgaan met aneuploidie. Hiervoor hebben we conditionele knockout allelen gegenereerd (voor () en ()) waarmee we aneuploidie kunnen provoceren op weefselspecifiek niveau. Deze modellen stellen ons, in tegenstelling tot de vroegere modellen, in staat om gestructureerd te onderzoeken hoe weefsels en tumoren omgaan met aneuploidie en hoe dit leidt tot kanker (). We onderzoeken hoe cellen aneuploïde worden, hoe aneuploidie cellen helpt om kwaadaardig te worden en wat de fysiologische gevolgen zijn van aneuploidie. Hiertoe stellen we in eerste instantie **drie vragen**:

1. Wat zijn de gevolgen van aneuploidie voor 'niet-kankercellen'? Om deze vraag te beantwoorden brengen we de gevolgen van aneuploidie in kaart in diverse weefsels (bijv. huid, lever, bloed, hersenen, mamma, darm). Hiervoor maken we gebruik van onze bestaande conditionele knockout allelen () en (), gecombineerd met weefselspecifieke Cre-drivers achtergronden en zullen we vergelijken hoe verschillende weefseltypen omgaan met de gevolgen van aneuploidie. Hiertoe zullen we dieren volgen in de tijd en op verschillende tijdstippen (maximaal tot een leeftijd van 18 maanden) opofferen en de weefsels in detail analyseren (transcriptome, proteome, epigenome, etc.) Een van de mogelijke gevolgen van aneuploidie is versnelde veroudering (zie ook het werk van collega (), BubR1 hypomorph, zie ook () S). We zullen de relatie tussen aneuploidie, veroudering en kanker dan verder onderzoeken als onderdeel van deze vraag door te bepalen of het aneuploïde weefsel (en mogelijk omliggende weefsels) verouderings-pathologie laten zien (stamceldepletie, neurodegeneratie, lineage skewing, weefseldegeneratie, etc.). We zullen de aneuploidie-geïnduceerde pathologie vergelijken met 'normaal' verouderde muisweefsels, te verkrijgen uit de *Mouse Clinic for Cancer and Ageing*.
2. Wat is de rol van aneuploidie in het ontstaan en de voortgang van kanker? Om deze vraag te beantwoorden, stellen we een drietal deelvragen:

- a. *Welke veranderingen in de cel maken van aneuploïde cellen aneuploïde kankercellen?* Chromosomale instabiliteit alleen is niet voldoende om efficiënt kanker te provoceren in de muis en daarnaast leidt chromosomale instabiliteit in niet getransformeerde cellen tot een groeinadeel en geen groeivoordeel. Om beter te begrijpen welke genen belangrijk zijn om van een aneuploïde cel een aneuploïde kankercel te maken, willen we *in vivo* weefsel-specifieke transposonscreens uitvoeren in een aneuploïde achtergrond, waarbij we aneuploïde cellen *in vivo* mutageniseren met transposons (induceerbaar PiggyBac transposonsysteem, (Rad et al, Nat. Gen. 2015 Jan;47(1):47-56)). PiggyBac is een transposon dat met PiggyBac transposase te mobiliseren is en dan random integreert. Het construct dat we gebruiken zal bij integratie in of nabij een gen leiden tot inactivatie of activatie van dat gen (afhankelijk van waar het integreert). De PiggyBac transposonlijnen hebben voordat PiggyBac transposase actief is een tandem van transposons geïntegreerd op 1 chromosoom, waar ze niets doen. Als PiggyBac transposase geactiveerd wordt, mobiliseren de transposons en integreren ze random in het genoom van de hostcellen, wat daardoor gemutageniseerd wordt. Omdat PiggyBac transposase door Cre-recombinase geactiveerd wordt, kunnen we de mutagenese beperken tot de weefsels waarin we de aneuploïdie provoceren. Omdat we verschillen zien in hoe weefsels reageren op genomische instabiliteit, willen we deze screens ook uitvoeren in verschillende weefsels (bloed, hersenen, huid, darm, etc.). Hiertoe worden conditional aneuploïde mutanten ingekruist met het induceerbaar PiggyBac transposonsysteem en verschillende Cre-drivers om weefsel-specificiteit te bewerkstelligen. Cohorten dieren worden dan gevolgd op het ontstaan van tumoren en geëuthanaseerd zodra ze ziek worden. Tumoren worden vervolgens geïsoleerd en geanalyseerd op waar de transposons geïntegreerd zijn, gevolgd door moleculair (*in vitro*) onderzoek, wat uiteindelijk *in vivo* gevalideerd dient te worden zoals beschreven onder 2c.
- b. *Hoe gaan diverse typen kankercellen om met (de gevolgen van) aneuploïdie?* Ons voorafgaand werk heeft aangetoond dat aneuploïdie in T-cellen niet voldoende is voor kanker, maar dat er daarnaast initiating events (zoals mutatie van [REDACTED]) nodig zijn. Omdat we zeer duidelijke weefsel-specificiteit zien in hoe (kanker)cellen omgaan met aneuploïdie ([REDACTED] [REDACTED] [REDACTED]) willen we ook in andere weefsels kijken (onder meer in hersenen, huid, darm en in mammaweefsel) of aneuploïdie ook in die weefsels een predispositie geeft voor kanker. Hiervoor gebruiken we dezelfde aneuploïdie-induceerbare muismodellen als onder vraag 1, maar nu gecombineerd met genetische (bijv. [REDACTED] verlies, c-Myc inductie, Ras^{V12} mutatie, etc.) of chemische kankerpredisposities (bijv. DMBA/TPA protocol). Naast 'educated guesses', combineren we aneuploïdie ook met het activeren/inactiveren van genen waarvan we op basis van ons voorgaand werk een sterk vermoeden hebben dat ze samen met aneuploïdie leiden tot kanker. We kijken dan of muteren van deze genen leidt tot aneuploïde kankers en zo ja, of deze lijken op hun humane evenknie. Deze tumorcohorten worden vervolgens in groot detail geanalyseerd (hoe aneuploïde zijn de tumoren, hoe hard groeien ze, etc.) en onderling vergeleken om aan de ene kant de weefsel-specificiteit beter te begrijpen en aan de andere kant te onderzoeken of ook gemeenschappelijke factoren een rol spelen bij het ontstaan van aneuploïde kanker.
- c. *Hoe chromosomaal instabiel zijn aneuploïde tumoren en hebben aneuploïde tumoren een groeinadeel?* Ondanks dat 2 van de 3 kankers aneuploïde zijn, is een huidig dogma in het veld dat aneuploïde kankercellen, ondanks hun afwijkende aantal chromosomen in de uiteindelijke tumor weinig onderling verschillende karyotypes laten zien. Met andere woorden: de cellen maken uiteindelijk maar weinig fouten in het verdelen van hun erfelijk materiaal. Onze preliminaire data suggereert dat dit dogma onjuist is: er blijken op individueel cel niveau juist wel subtiele verschillen te bestaan tussen karyotypes die extrapoleren op het moment dat de tumor in een andere omgeving (de muis) gebracht wordt. Aangezien tumortherapie ook als een druk op de tumor gezien kan worden, is onze verwachting dat het meten van de chromosoom-missegregatie en karyotype-heterogeniteit in tumoren een belangrijke prognostische factor zal worden voor (aneuploïde) kanker. Om deze hypothese verder te toetsen zullen we in meerdere aneuploïde kankers meten hoe vaak cellen chromosomen missegregeren als ze in een andere omgeving (niche) geplaatst worden. Hiertoe zullen we kankers uit verschillende weefsels transplanteren in de muis en voor en na transplantatie de karyotype heterogeniteit op individueel cel niveau meten met single cell sequencing (Falconer E,

et al/ Nat Methods; 2012; 9:1107–1112). Daarnaast zullen we de groeisnelheid van aneuploïde tumoren en niet aneuploïde tumoren vergelijken om te testen of aneuploïde tumoren nog steeds een groeinadeel ondervinden van de aneuploïdie en bepalen welk type veranderingen dit eventuele groeinadeel omzet in een groeivoordeel.

3. Hoe gedragen aneuploïde cellen zich *in vivo* en *in vitro*? Onze drivers voor chromosomale instabiliteit (verlies, truncatie) leiden in weefselkweek binnen een aantal passages tot celdood. Ons voorgaand werk laat duidelijk zien dat verlies/ truncatie wel getolereerd worden in een *in vivo* setting (lever, huid, T-cellen). Dat betekent dat er grote verschillen zijn in hoe weefselkweekcellen en cellen *in vivo* reageren op aneuploïdie. Om dit beter te begrijpen, ontwikkelen wij muismodellen om chromosoomsegregatie en aneuploïdie *in vivo* te visualiseren middels intravital imaging. Deze transgene muismodellen zullen conditioneel diverse fluorescente reporters () tot expressie brengen en daarnaast een 'chromosoom tracker' waarmee we een specifiek getagged chromosoom kunnen volgen *in vivo* als een marker voor aneuploïdie. Deze modellen zullen we kruisen met onze muismodellen voor aneuploïdie (zie vraagstellingen 1, 2) in enkele weefsels (bijv. huid, darm). De transgenen en conditionele knockout allelen zullen dan *in vivo* geactiveerd worden met tamoxifen gevolgd door intravital imaging. Daarnaast zullen we ook weefsels isoleren van deze muizen voor organoid kweek. Op deze wijze kunnen we *in vivo* en *in vitro* gedrag van aneuploïde cellen vergelijken en daarnaast onze tracker modellen.

Haalbaarheid: De hierboven benoemde vragen kunnen we beantwoorden met de dierexperimenten beschreven in dit voorstel. Voor alle benoemde technieken en benaderingen hebben we of de modellen al beschikbaar, of kunnen we de modellen genereren samen met . In vraag 2 en 4 genereren we een aantal nieuwe muismodellen. Hiervoor zullen we voor het genereren van de muizen samenwerken met de die brede ervaring heeft hiermee. Voor vragen 1 en 3 maken we gebruik van bestaande modellen die we inkruisen in nieuwe weefsel-specifieke drivers (te verkrijgen via) eventueel gecombineerd met chemische mutagenese. Hiervoor maken we gebruik van bestaande protocollen. Vraag 2a betreft het screenen voor en valideren van genen die samen met aneuploïdie tot kanker leiden. Onze eerdere pilot-screens hebben laten zien dat deze aanpak zeer efficiënt werkt in T-cellen. We hebben al ervaring met aneuploïdie in andere weefsels (lever, huid) en kunnen deze screen dus eenvoudig in andere weefsels herhalen. Voor vraag 3 zullen we chromosoomsegregatie en aneuploïdie middels intravital imaging volgen. We hebben hier al ervaring mee vanuit het verleden . Hiertoe zullen we delende cel populaties specifiek labelen met de probes om zo het zoeken naar delende cellen te vereenvoudigen. In het geval we geen delende cellen kunnen vinden binnen de periode van ~6 uur dat we per muis kunnen imagen, kunnen we in ieder geval wel betrouwbaar het aantal aneuploïde cellen meten via de chromosoomtracker die we zullen genereren. Daarnaast zullen we in parallel middels organoid kweek van weefsels uit deze tracker muizen ook kijken naar chromosoomsegregatie in weefselkweek (vervanging). Voor deze imaging zullen we samenwerken met het lab van . Uiteindelijk zullen we ook binnen onze eigen imaging faciliteit op gaan imagen, waar de faciliteiten ook al geschikt zijn voor intravital imaging van muizen.

3.3 Belang

Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelstelling(en).

Het primaire belang van dit onderzoek is wetenschappelijk. 2 van de 3 kankers zijn aneuploïde. Ondanks dit gegeven, zijn er nog geen therapieën beschikbaar die selectief aneuploïde cellen kunnen bestrijden, terwijl aneuploïdie zo'n belangrijk onderscheidende factor van 'gezonde' lichaamscellen is. Om tot dergelijke therapie te komen, moeten we eerst beter begrijpen hoe cellen en weefsels omgaan met aneuploïdie. Dit doen we waar mogelijk met celkweekexperimenten, maar het blijkt dat cellen in celkweek vaak anders op aneuploïdie reageren dan cellen in hun eigen fysiologische niche. Daarom, om tot aneuploïdie-selectieve therapie te komen, is het van cruciaal belang om aneuploïdie in diermodellen te onderzoeken. Onze modellen zijn wereldwijd uniek

en hebben al belangrijke resultaten opgeleverd over aneuploidie en de gevolgen daarvan. In deze experimenten werken we deze bevindingen verder uit en komen we stap voor stap steeds dichterbij mogelijke therapieën die selectief aneuploïde cellen kunnen doden, welke zeer belangrijk kunnen worden in de behandeling van 2 van de 3 kankers, maar mogelijk ook kunnen helpen veroudering beter te begrijpen om uiteindelijk de gevolgen van het ouder worden te kunnen vertragen (healthy ageing), twee zeer belangrijke maatschappelijke belangen. Dit doen we waar mogelijk met celweekexperimenten, maar het blijkt dat cellen in celweek vaak anders op aneuploidie reageren dan cellen in hun eigen fysiologische niche. Daarom, om tot aneuploidie-selectieve therapie te komen, is het van cruciaal belang om aneuploidie in diermodellen te onderzoeken.

3.4 Onderzoeksstrategie

3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project (strategie).

Het overkoepelend doel van deze aanvraag is komen tot manieren om aneuploïde (kanker)cellen selectief te doden. Daartoe moeten we eerst begrijpen wat de gevolgen zijn van aneuploidie in verschillende weefsels en hoe aneuploïde cellen transformeren in kankercellen.

Hiertoe nemen we in parallel een drietal benaderingen:

- 1) We brengen de gevolgen van aneuploidie in niet getransformeerde weefsels (bijv. lever, huid, hersenen, bloed) en tumoren in kaart middels onze bestaande muismodellen voor aneuploïde en nieuw te genereren muismodellen voor aneuploidie (vragen 1 en 2b).
- 2) We onderzoeken welke genen en daarmee samenhangende fysiologische processen van aneuploïde cellen kankercellen maken (middels *in vivo* genetische screens en follow up *in vivo* kandidaat gen validatie (vraag 2).
- 3) We visualiseren chromosoom(mis)segregatie en aneuploidie door intravital imaging in onze muismodellen voor aneuploidie in vergelijking met imaging van organoid cultures (*in vitro*) om de *in vivo* en *in vitro* gevolgen van chromosomale instabiliteit te kunnen bepalen en vergelijken (vraag 3).

Samenvattend, vergelijken we in deze aanvraag hoe verschillende weefsels reageren op aneuploidie en welke veranderingen de verschillende celtypen moeten doorstaan om kankercellen te worden, omdat ons voorgaand onderzoek heeft aangetoond dat verschillende celtypen verschillend reageren op aneuploidie. Om te komen tot aneuploidie-specifieke therapie, zullen we dus ook moeten weten hoe verschillende weefsels omgaan met aneuploidie. Door in verschillende weefsels de vier beschreven vragen te beantwoorden zullen de komende vijf jaar stappen dichterbij het overkoepelend doel: therapie die selectief aneuploïde kankercellen doodmaakt, therapie die we conceptueel en praktisch zullen testen in een in parallel ingediend projectvoorstel.

3.4.2 Geef een overzicht op hoofdlijnen van de verschillende onderdelen van het project en de daarbij gebruikte type(n) dierproef of dierproeven.

Het hier beschreven project valt uiteen in de volgende drie hoofdvragen.

1. Wat zijn de gevolgen van aneuploidie voor niet-kankercellen?
2. Wat is de rol van aneuploidie in het ontstaan en de voortgang van kanker?
3. Hoe gedragen aneuploïde cellen zich *in vivo* en *in vitro*?

Deze vragen zullen we beantwoorden middels 3 dierproeftypes:

- Dierproeftype 1: Muismodellen voor aneuploidie in niet getransformeerde cellen.
- Dierproeftype 2: Muismodellen voor aneuploidie in getransformeerde cellen.
- Dierproeftype 3: Muismodellen voor het visualiseren van aneuploidie en chromosoomsegregatie.

3.4.3 Beschrijf en benoem de logische samenhang van deze verschillende onderdelen en de eventuele fasering in de uitvoering. Vermeld eventuele mijlpalen en keuzemomenten.

In vraag 1 zullen we de gevolgen van aneuploidie in niet getransformeerde cellen onderzoeken. Dit zullen we onder deze vraag doen in diverse weefsels met een focus op niet-kanker gerelateerde pathologie. Een mogelijk gevolg van aneuploidie is versnelde veroudering van weefsels, dit is bijvoorbeeld aan aangetoond in het werk van [REDACTED], waarin ze waarnamen dat muizen met systemische (dus in alle organen tegelijk) aneuploidie diverse verouderingsziektes lieten zien, zoals staarvorming, kyphosis, haarverlies, vetverlies. We zullen weefselspecifiek onderzoeken wat de gevolgen zijn van aneuploidie op bijv. het hematopoietisch systeem, de lever, de mamma, de hersenen, de darmen en de huid. Indien er aanleiding toe is, breiden we dit met meerdere weefsels uit, in overleg met de IvD. In de meeste gevallen zullen we hiervoor dieren kunnen gebruiken uit onze bestaande foklijnen zonder ongerief. In enkele gevallen zullen lijnen ongerief ondervinden van de weefselspecifieke aneuploidie. In geval we een tamoxifen-induceerbare Cre hebben, zullen we dieren met tamoxifen moeten behandelen. Deze experimenten zullen inzicht geven hoe niet-getransformeerde cellen (dus zonder kanker-predispositie) reageren op aneuploidie en dus wat de algemene en/of weefselspecifieke responsen zijn op chromosomale instabiliteit zoals mogelijk versnelde veroudering. Naast dat deze dierproeven inzicht geven in hoe verschillende weefsels omgaan met aneuploidie, dienen de cohorten voor deze vraag ook als controledieren voor de cohorten onder vraag 2b.

Voor vraag 2a zullen we trachten te identificeren welke genen van een aneuploïde cel een kankercel maken. Hiertoe zullen we *in vivo* genetische screens uitvoeren, in eerste instantie met transposons (PiggyBac) en in het hematopoietisch systeem. In dit muismodel worden transposons conditioneel gemobiliseerd samen met het inactiveren van de genen die de aneuploidie veroorzaken in de gekozen weefsels. De transposons blijven rondspringen gedurende de tumorontwikkeling: deze benadering werkt zeer efficiënt om sterke drivers van tumorigenese bloot te leggen: op die loci blijven de transposons juist behouden (Rad et al, Nat Genet. 2015 Jan;47(1):47-56). [REDACTED]

[REDACTED] Voor deze setup loopt reeds een eerste experiment na een succesvolle pilot vorig jaar als onderdeel van onze huidige vergunning. Gedurende jaar 1-2 van dit voorstel zal deze specifieke screen nog lopen. Als deze screen tot gevalideerde hits leidt (*i.e.* genen die van aneuploïde hematopoietische stamcellen kankercellen maken) en als we een duidelijke weefselspecifieke respons op aneuploidie zien onder vraag 1, dan zullen we ook *in vivo* genetische screens uitvoeren in de huid en in het cerebellum. Deze genetische screens zullen we uitvoeren met het [REDACTED] of met een weefselspecifiek CRISPR/Cas9 systeem (Platt et al/ Cell. 2014;159(2):440-55). Met deze screens zullen we starten zodra daartoe aanleiding is (zie hierboven), waarschijnlijk in jaar 3-5 van dit plan.

Voor vraag 2b zullen we in verschillende weefsels en middels verschillende extra predisposities de rol van aneuploidie in het ontstaan en de voortgang van kanker onderzoeken. Zodoende hopen we inzicht te krijgen in algemene en weefselspecifieke manieren waarop tumorcellen omgaan met aneuploidie. Onder onze huidige vergunning volgen we een tumormodel voor bloed, een tumormodel voor lever en mammatumormodel. Onder deze CCD aanvraag zullen we nog enkele dieren volgen van deze bestaande lijnen gedurende de eerste twee jaar, daarna zullen de vragen voor deze modellen beantwoord zijn en zullen we de lijnen stoppen.

Daarnaast willen we onder vraag 2b onderzoeken wat de rol van aneuploidie is in het ontstaan van borstkanker, medulloblastoma, darmkanker en huidkanker. Hiertoe zullen we onze bestaande conditionele allelen voor aneuploidie (■■■■■) of nieuw te genereren aneuploidie-inducerende allelen combineren met een chemische of genetische tumorpredispositie. Voor medulloblastoma zullen we cerebellum specifieke ■■■■ cKO dieren inkruisen met ■■■■ cKO dieren en/of c-Myc overexpresserende dieren. We verwachten dat dit model de eerste 3 jaar van de aanvraag zal lopen. Voor het induceren van darmtumoren zullen we aneuploidie in de darm combineren met darm-specifieke K-Ras^{V12} of ■■■■ mutatie. Voor huidtumoren zullen we huid specifieke aneuploïde dieren in een Ptch conditionele achtergrond (basal cell carcinoma) of ■■■■ conditionele achtergrond (squamous cell carcinoma) kruisen of topisch behandelen met TPA en/of DMBA om proliferatie en transformatie te induceren. De darm en huidmodellen zullen we gedurende de laatste 3 jaar van deze aanvraag onderzoeken, maar alleen als uit de voorgaande modellen een duidelijke weefsel specificiteit blijkt van hoe cellen omgaan met aneuploidie. Voor zowel het medulloblastoma-model, het darmmodel en het huidkankermodel zal Cre-recombinase geactiveerd worden met tamoxifen; de foklijnen voor deze dieren bestaan reeds en hebben geen ongerief.

Voor vraag 2c zullen we aneuploïde of controle hematologische tumorcellen sequentieel transplanteren in ontvanger muizen, bepalen hoe snel de cellen opnieuw tumoren vormen en meten hoe de karyotypes van de individuele cellen veranderen. De te transplanteren cellen voor en na transplantatie gemeten worden met single cell sequencing om te karyotype heterogeniteit te meten. In eerste instantie zullen we ons richten op hematologische kankers (Jaar 1-3 van deze aanvraag). Mogelijk breiden we dit naar andere orgaansystemen uit, maar alleen in nauw overleg met de IvD. De experimenten om de groeisnelheid van aneuploïde en niet aneuploïde tumoren te vergelijken zullen gedurende de eerste drie jaar van dit voorstel lopen. In dit voorstel zullen we daarnaast de in onze lopende transposon screen geïdentificeerde genen valideren in follow-up transplantatie experimenten. Hiertoe zullen we (aneuploïde) hematopoietische stamcellen isoleren en hierin de kandidaatgenen activeren/inactiveren (zoals in de transposonscreen optrad) middels (conditionele) overexpressie of shRNA knockdown/CRISPR/Cas9 om te kijken of dit ook leidt tot transformatie van de aneuploïde hematopoietische stamcellen. Deze validaties zullen gedurende de gehele duur van dit voorstel lopen.

Voor vraag 3 zullen we nieuwe muismodellen ontwikkelen om mitose, chromosoommissegregatie en aneuploidie in levende dieren te visualiseren in weefsels/celtypes naar keuze. De diersystemen zullen worden gegenereerd op de DEC/CCD vergunning van ■■■■■ en dan ingekruist met onze tumormodellen uit vraag 2 en ontwikkelingsmodellen uit vraag 5. In eerste instantie zullen we ons richten op celdeling en aneuploidie in de huid en tumoren genetisch (■■■■ of Ptch) of chemisch (DMBA/TPA) induceren dan wel in 'normale' aneuploïde huid naar aneuploidie en celdeling te kijken. Experiment dieren zullen dan geïmaged worden. Hiertoe zullen we gebruik maken van minimaal invasieve imaging windows ■■■■■. Verder zullen we in samenwerking met ■■■■■ organoid cultures generen die we ook zullen imageren. Als we weinig tot geen delende cellen vinden met onze huidige Cre-driver voor de huid, kruisen we onze modellen ook nog in een selectievere Cre-driver die beter delende cellen labelt. Deze experimenten zullen in de eerste 3 jaar van dit voorstel worden uitgevoerd. Als de modellen goed blijken te werken, zullen we ook andere weefsels onderzoeken (bijvoorbeeld mamma, darm, etc.) in samenwerking met labs ■■■■■
■■■■■

3.4.4 Benoem de typen dierproeven. Vul per type dierproef een bijlage Beschrijving dierproeven in.

Volgnummer	Type dierproef
1	Muismodellen voor aneuploidie in niet getransformeerde cellen.
2	Muismodellen voor aneuploidie in getransformeerde cellen
3	Muismodellen voor het visualiseren van aneuploidie en chromosoomsegregatie
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



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.	Volgnummer	Type dierproef
		1	Muismodellen voor aneuploidie in niet getransformeerde cellen

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.

In dit type dierproef zullen we in verschillende weefsels van de muis (bijv. huid, lever, brein, bloed, darm of mamma) aneuploidie veroorzaken en de gevolgen (zoals mogelijk versnelde veroudering) voor de weefsels onderzoeken. We zullen aneuploidie veroorzaken met behulp van onze eerder gepubliceerde conditionele allelen **■** of **■** of door nieuwe te genereren drivers van aneuploidie. Om de aneuploidie weefselspecifiek te provoceren, zullen onze conditionele knockout allelen gecombineerd worden met weefselspecifieke Cre-drivers voor bijvoorbeeld de huid, het cerebellum, het bloed, de darm en de mamma. Cohorten van dieren zullen dan gevolgd worden gedurende enkele weken tot maximaal 18 maanden met een focus op aneuploidie-geïnduceerde pathologieën (veroudering, neurodegeneratie, stamceldepletie). Tussentijds zullen op geplande momenten dieren opgeofferd worden voor

uitgebreide moleculaire analyse en pathologie. In een klein deel van de gevallen zullen ontvanger muizen aneuploïde cellen (bijv. hematopoietische stamcellen, HSCs) getransplanteerd krijgen om hun regeneratieve capaciteit te meten middels lineage tracing. Daarnaast zal een deel van de dieren een fluorescent reporter gen tot expressie brengen wat ons helpt om aneuploïde cellen te isoleren of volgen. Tenslotte zullen we een klein aantal dieren opofferen voor primaire celkweek doeleinden (vermindering en vervanging), zodat we een deel van onze experimenten met weefselkweek kunnen uitvoeren.

In deze dieren zullen we verschillende uitkomst parameters meten/bepalen.

Om te valideren dat de dieren inderdaad aneuploidie accumuleren in de getargete weefsels zullen we deze weefsels onderwerpen aan karyotypering middels single cell sequencen, metaphase spreads en interphase FISH. Dit gebeurt op ingevroren of gefixeerde cellen. Daarnaast zullen we de weefsels onderwerpen aan een histologische analyse, waar noodzakelijk gecombineerd met immunohistochemie (ingevroren en gefixeerde weefsels). Verder zullen we de respons op aneuploidie meten middels transcriptome analyse (RNA sequencing, qPCR) en middels biochemische bepalingen (Western Blots, en mogelijk mass spectrometrie op een select aantal samples (ingevroren weefsels). Tenslotte zullen we cellijnen afleiden uit diverse weefsels om verder celbiologische metingen te kunnen doen aan de aneuploïde weefsels (time-lapse microscopie, mechanistische experimenten, etc) (vers ingevroren weefsels in kweekmedium en vers in kweek genomen weefsels).

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 eerste instantie zullen de Cre-positieve lijnen worden gegeneerd (fok). Omdat bij deze fok nieuwe allelen worden gecombineerd, kunnen we niet met 100% zekerheid voorspellen of de nieuwe lijnen ongerief hebben. De eerste twee generaties van deze nieuwe lijnen gelden dus als fok met ongerief (zie ook aantallen dieren). De meerderheid van de dieren zullen geen verdere behandelingen ondergaan, dieren zullen alleen nauwlettend gevolgd worden op het ontstaan van pathologie op worden opgeofferd op diverse leeftijden. In een deel van de cohorten (wanneer we gebruik maken van induceerbare Cre-drivers) zullen dieren tamoxifen of PolyI/PolyC toegediend krijgen om Cre te induceren. Tamoxifen toediening zal plaatsvinden via orale toediening, IP injecties of in geval van netgeboren pups via injectie direct door de maagwand. PolyI/PolyC wordt IP toegediend. Dieren worden 4-5 keer behandeld binnen een periode van 2 weken. Deze toedieningsmethodieken zijn gebaseerd op onze eigen bestaande protocollen en noodzakelijk om voldoende Cre-activiteit te waarborgen. In geval de dieren een fluorescent reporter gen tot expressie brengen, zullen we in enkele gevallen de dieren imageren met een IVIS imaging station. Hiervoor worden de dieren licht gesedeeerd en gedurende enkele minuten in het imaging station gelegd. De dieren worden dan teruggelegd in hun kooi om ze te laten bijkomen. Uiteindelijk zullen de dieren op verschillende tijden worden opgeofferd (cervicale dislocatie na isofluraan sedatie) om de diverse relevante weefsels te isoleren voor pathologie en moleculaire analyses, of, in enkele gevallen, voor HSC transplantaties.

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

In de meeste gevallen kennen we de latentie van de fenotypes/pathologie van de voren niet. Onze uitgebreide ervaring heeft ons geleerd, dat cohorten van 40-50 dieren per genotype in totaal voldoende zijn om een statistisch significant verschil aan te tonen tussen controle-groepen en dieren met een genetische predispositie (aneuploidie). In het geval van dit type dierproef zullen we controle en experimentdieren op verschillende leeftijden opofferen: hiervoor kiezen we ongeveer 5 tijdspunten gelegen tussen kort na geboorte en 18 maanden.

Om tot het minimum aantal noodzakelijke dieren te kunnen komen, zullen we daarom altijd starten met een pilotcohort van dieren (ongeveer 15 per groep, 3 per tijdspunt): dit geldt dus voor alle hieronder 'B aangevraagde dieraantallen' beschreven groepen. Deze dieren zullen dan worden geanalyseerd middels de hierboven beschreven uitleesparameters en dan zal er gekeken worden of we op basis van dit aantal dieren (en geïsoleerde weefsels) voldoende verschillen hebben kunnen waarnemen. Dan vindt een go/no go assessment plaats (zijn er verschillen waarneembaar op basis van de beschreven uitleesparameters?) en zo ja, dan zullen we in overleg met de IvD de groepsgrootte uitbreiden tot MAXIMAAL 50 dieren (10 per tijdspunt), afhankelijk van hoe groot de verschillen

zijn tussen de experimentgroep en controlegroep en op welke tijdstippen de verschillen waarneembaar zijn. In de meeste gevallen verwachten we dat we per groep minder dieren zullen nodig hebben. Als er op een bepaald tijdstip geen verschillen waarneembaar zijn na de assessment van de eerste 15 dieren, dan zullen we dit tijdstip niet verder onderzoeken en als er helemaal geen verschillen meetbaar zijn, dan zullen we concluderen dat de aneuploidie in deze setting geen effect heeft en geen extra dieren gebruiken (het blijft dan bij de eerste 15 gebruikte dieren).

Bij doorgang zullen na afronding van de experimenten en followup analyses alle dieren (dus pilot van 15 en extra aangevraagde dieren tot een maximum van 50 in totaal) als 1 experimentgroep beschouwd worden. Correctie voor multiple testing is dan ook niet noodzakelijk. De eerste 15 dieren als pilot: we gaan ervan uit (op basis van voorgaande kennis) dat 15 dieren niet voldoende is om een significant verschil tussen dieren aan te tonen. Omdat de genotypes die we testen een onbekend fenotype hebben, kunnen we niet 100% voorspellen wat de verschillen in fenotype tussen de dieren zullen zijn. Mocht dit verschil groter zijn dan hier ingeschat, dan zullen we post-hoc een nieuwe power analyse uitvoeren met de dan nieuw bekende gegevens (i.e. het verschil in overleving tussen de groepen en de verdeling van experimentwaardes) om zo vast te stellen of de 15 dieren voldoende zijn voor een statistisch significant verschil of dat er nog meerdere dieren noodzakelijk zijn.

In geval van HSC transplantaties zijn 25 dieren per groep in onze ervaring voldoende.

Belangrijk: ook beschouwd vanuit een power-analyse is 40-50 dieren per cohort een reële schatting: in ons geval is de variatiecoëfficiënt sigma vooraf niet bekend; de proefgrootte wordt daarom afgelezen van een uit Owen afgeleide grafiek (Proefdieren en Dierproeven, L.F.M van Zutphen, vijfde druk, 2009, blz 211). Op basis van een onbetrouwbaarheidsdrempel (alpha) van 0.05 of een power (pi) van > 0.8 en een verhouding tussen het te meten verschil ($\mu_1 - \mu_2 / \sigma$) en variatiecoëfficiënt van ongeveer 0.7 (dit betekent dat er bij een spreiding sigma van bijvoorbeeld 2 maanden in de overleving binnen 1 groep een significant verschil gemeten wordt als de gemiddelde overleving tussen experiment en controlegroep 1.5 maanden uit elkaar ligt; dit zijn reële waarden die we in de praktijk vaak waarnemen) valt er uit de grafiek af te lezen dat de proefgrootte ongeveer 40-50 dieren dient te zijn.

B. De dieren

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

Alle experimenten zullen worden uitgevoerd op transgene muizen. We maken gebruik van zowel mannen als vrouwen behalve in geval van de mamma-experimenten (daar gebruiken we alleen vrouwen), omdat er geen reden is om aan te nemen dat we verschillen zullen zien tussen de sexes. Voor dit type dierproef zullen alleen volwassen muizen uit eigen fok (heel soms bestellen we dieren vanuit extern, zoals van [REDACTED]) gebruikt worden, in sommige gevallen zullen dieren als jong volwassene al behandeld worden op Cre te activeren. Binnen dit type dierproef zullen we de volgende experimentele en controle cohorten volgen:

Aneuploidie in bloed:

1 experimenteel en 1 controle cohort voor aneuploïdie in T-cellen: $50 + 50 = 100$ dieren

1 experimenteel en 1 controle cohort voor aneuploidie in het hematopoïetisch systeem: $50 + 50 = 100$ dieren

1 experimenteel en 1 controle cohort voor transplantaties van aneuploïde cellen in het hematopoïetisch systeem: $25 + 25$ donor dieren + 50 recipient dieren = 100 dieren

Subtotaal 300 dieren

Aneuploidie in de kleine hersenen:

1 experimenteel en 1 controle cohort voor induceerbare aneuploidie in de kleine hersenen: $50+50 = 100$ dieren

Subtotaal 100 dieren

Aneuploidie in de huid en darm:

1 experimenteel en 1 controle cohort voor induceerbare aneuploidie in de epidermis: $50+50 = 100$ dieren

1 experimenteel en 1 controle cohort voor induceerbare aneuploidie in de darm: $50+50 = 100$ dieren

1 experimenteel en 1 controle cohort voor induceerbare aneuploidie in de stamcellen van de darm en huid: $50+50 = 100$ dieren

Subtotaal 300 dieren

Aneuploidie in de lever:

1 experimenteel en 1 controle cohort voor aneuploidie in de lever: $50+50 = 100$ dieren

Subtotaal 100 dieren

Aneuploidie in de mamma:

1 experimenteel en 1 controle cohort voor aneuploidie in mamma epitheel: $50+50 = 100$ dieren

Daarnaast genereren we ook enkele nieuwe modellen voor chromosomale instabiliteit, die we in eerste instantie zullen testen in het bloed en de huid. Omdat we deze kandidaatgenen nog in celkweek aan het testen zijn, weten we de gennamen hiervan nog niet. We verwachten de komende 5 jaar ongeveer 4 van deze modellen te genereren waarvan we de gevolgen willen bekijken in 2 weefsels (dus 8 stammen), waarvoor we per cohort maximaal 50 dieren zullen volgen. Voor de controle cohorten voor bloed en huid zijn hierboven al dieren aangevraagd.

Subtotaal nieuw te testen genen: 400 dieren

Ook zullen we vanuit een deel van deze verschillende modellen primaire cellen isoleren (vervanging en vermindering van dierproeven)

Hiervoor vragen we de volgende hoeveelheid dieren aan:

Ten bate van primaire keratinocyten: 20 dieren

Ten bate van mouse embryonic stem cells: 20 dieren (moeders; embryo's zijn pas op E3.5 en tellen nog niet als proefdier)

Ten bate van mouse embryonic fibroblasts (40 dieren en 400 E13.5 embryo's)

Ten bate van darm organoids: 20 dieren

Ten bate van mamma organoids 20 dieren

Subtotaal primaire kweek: 120 dieren en 400 embryo's.

Voor deze experimenten zullen we een aantal nieuwe muizenstammen genereren. We verwachten geen ongerief in de fok van deze dieren, maar omdat we dit van te voren niet kunnen uitsluiten gelden de eerste twee generaties als fok met ongerief. 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. Voor de hierboven beschreven cohorten zullen we 17 nieuwe genotypes genereren.

Subtotaal fok met ongerief: $17 \times 48 = 816$ dieren.

Het totaal aantal dieren voor dit type dierproef komt daarmee op 2236 volwassen dieren en 400 embryo's

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.

Waar mogelijk doen we onze experimenten met celkweekexperimenten, maar het blijkt dat cellen in celkweek vaak anders op aneuploidie reageren dan cellen in hun eigen fysiologische niche. Daarom, om tot aneuploidie-selectieve therapie te komen, is het van cruciaal belang om aneuploidie in diermodellen te onderzoeken.

We hebben het minimum mogelijk aantal dieren per groep gekozen (vermindering) en starten in alle gevallen met een klein pilotcohort om te bepalen of er meetbare verschillen tussen experiment en controledieren zijn. Daarnaast dienen de experimentdieren in dit dierproeftype als controlecohorten voor de tumorproeven onder dierproeftype 2. Daarnaast gebruiken we de experimentdieren om te leren wat de gevolgen van aneuploidie zijn in een niet getransformeerde setting. Op deze wijze beantwoorden we twee vragen met deze cohorten en verminderen we het totaal aantal benodigde dieren.

We hebben zoveel mogelijk gekozen voor weefsels waar afwijkingen relatief weinig ongerief opleveren als verfijning. Bovendien kiezen we voor een deel van de experimenten voor een weefselkweek benadering (vermindering, vervanging) en proberen meerdere dingen van dezelfde dieren te leren (bijvoorbeeld fenotypes voor stamcellen in de darm en huid kunnen we in 1 experiment tegelijk onderzoeken). Tenslotte maken we waar mogelijk gebruik van tussentijdse non-invasieve metingen in de lineage tracing experimenten (vermindering, verfijning) zodat hetzelfde dier meerder malen gemeten kan worden wat leidt tot vermindering van het totaal aantal benodigde dieren.

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.

Aangezien onze voorgaande kennis uitwijst dat aneuploïde verbazingwekkend goed getolereerd wordt in vivo, verwachten we weinig tot geen ongerief in dit type dierproef. Alle dieren in experiment zullen intensief gecontroleerd worden (dagelijkse controle door diervverzorging en minimaal 2 maal per week

intensievere controle door de onderzoekers) om uit te sluiten dat de dieren ongerief ondervinden.

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 zijn nog niet eerder uitgevoerd. Hiervoor hebben we een uitgebreide zoekopdracht op PubMed uitgevoerd en daarnaast gesproken 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?

Er wordt weining ongerief verwacht. Bovendien zullen dieren nauwgezet gevolgd worden en worden opgeofferd bij de eerste tekenen van ongerief indien die zich toch voordoen. Meer specifiek:

- Voor de modellen van het hematopoietisch systeem kan stamceldepletie optreden, wat kan leiden tot beginnende anemie (bleke oren, kortademigheid) (licht ongerief).
- Voor de modellen van het cerebellum is het mogelijk dat aneuploidie tot milde motorische afwijkingen leidt ten gevolge van neurodegeneratie (licht ongerief).
- Voor de modellen van de huid zullen dieren mogelijk een deel van hun vacht verliezen (licht ongerief).
- Voor de modellen van de mamma zullen dieren mogelijk defecten ontwikkelen in de mammaontwikkeling, dit zal niet tot direct ongerief leiden, maar hiermee dient wel rekening gehouden te worden als de vrouwtjes pups krijgen, omdat mogelijk de melkproductie hieronder leidt (licht ongerief).
- Voor de modellen van de darm kan stamceldepletie leiden tot villidegeneratie. Dit zal leiden tot verminderde voedselopname en gewichtsverlies (licht ongerief).
- Voor de modellen van de lever kan een defect in lever-regeneratie optreden. Bij een normale levensloop zal dit niet leiden tot enig ongerief omdat de lever niet hoeft te regenereren (licht ongerief).
- Verder kunnen in alle onderzochte weefsels weefsel-specifieke verouderingspathologieën optreden, zoals stamceldepletie, en/of senescence, wat uiteindelijk (in de latere tijdspunten) tot verminderde weefselfunctionaliteit zal leiden. Ook hier offeren we dieren op voordat ze licht ongerief overschrijden.
- In de laatste tijdspunten (dieren ouder dan een jaar) zullen dieren ook 'natuurlijk' verouderen. Dit kan leiden tot de bij muis bekende verouderingsaandoeningen zoals tumoren, blindheid, prolapsen, huidaandoeningen. We zullen hier de dieren niet langer dan 18 maanden houden om extreme veroudering te voorkomen en dieren opofferen voordat het ongerief 'licht' overstijgt.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Op basis van onze voorgaande kennis voorzien we dat in sommige gevallen de aneuploidie kan leiden tot stamcel depletie (we hebben dit eerder in de huid waargenomen). Stamceldepletie kan leiden tot het minder functioneren van een weefsel. Dus voor alle te onderzoeken weefsels geldt dat stamceldepletie en/of slecht functioneren van de somatische cellen kan leiden tot een verminderde functionaliteit van het weefsel. Bij de dieren ouder dan een jaar kunnen aandoeningen ook ontstaan door natuurlijke veroudering. Zoals aangegeven zal dit alles nauwlettend in de gaten gehouden worden en zullen dieren worden opgeofferd voordat ze matig of zelfs ernstig ongerief ondervinden.

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

Dieren zullen zeer regelmatig (minimaal 2 maal per week) uitgebreid geïnspecteerd worden door de verantwoordelijk onderzoeker en dagelijks door de diervoorzorg om ongerief te voorkomen. Dieren worden opgeofferd als het ongerief 'gering' overstijgt. In geval van hoger ongerief dan voorzien (gering) door bijvoorbeeld neurodegeneratie of villi-degeneratie zal de dosis van tamoxifen verlaagd worden (noodzakelijk om de knockout genen te inactiveren) om zo mozaïsche aneuploidie te provoceren (en daarmee een milder fenotype). Doordat de aneuploïde cellen bij deze weefsels ook een fluorescente reporter tot expressie brengen, kunnen we de aneuploïde cellen dan alsnog isoleren uit de weefsels.

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.

In een heel enkel geval kan het voorkomen dat een dier dusdanig ernstig ziek wordt dat het op basis van humane eindpunten opgeofferd dient te worden. Dit geldt voor alle beschreven experimenten. Het ongerief van deze dieren wordt inschat als matiger. Onze ervaring met voorgaande modellen voor aneuploidie in een niet-kanker setting leert dat deze aantallen kleiner dan 2% van de dieren betreft. In dit dierproeftype zal dit naar verwachting alleen optreden als de dieren ernstig gevochten hebben, aangezien we geen ernstige pathologie verwachten met aneuploidie alleen en we eventuele pathologie nauwgezet volgen. De te verwachten specifieke fenotypes (neurodegeneratie, darmvillidegeneratie) zullen we nauwlettend van dag tot dag volgen, zodat dieren (vrijwel) nooit dusdanig ongerief hebben dat ze moeten worden opgeofferd op basis van humane eindpunten maar altijd ruim voor die tijd. Mocht er toch een ernstiger fenotype optreden dan voorzien (dus met matig ongerief), dan zullen we de fractie aneuploide cellen in de volgende muizen verlagen door minder tamoxifen toe te dienen waardoor minder cellen aneuploide worden en het fenotype terug zal afzwakken maar licht ongerief.

De criteria die wij hanteren voor dit dierproeftype om dieren op basis van humane eindpunten op te offeren zijn als de dieren ernstige vechtwonden hebben (meest waarschijnlijk optredende reden voor terminatie op basis van humane eindpunten), moribund zijn, lethargisch zijn, >20% van hun gewicht verloren zijn (bijvoorbeeld door darmvillidegeneratie), significante neurologische afwijkingen laten zien (balansproblemen), of verouderingsafwijkingen laten zien (spontane tumoren, prolapsen, huidaandoeningen).

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

We verwachten voor deze proef dat minder dan 2% van de dieren op basis van humane eindpunten opgeofferd dienen te worden.

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.

Het cumulatief ongerief schatten we in als licht: geen van deze dieren zullen ernstige afwijkingen ontwikkelen. We verwachten dat <2% van de dieren op basis van humane eindpunten moet worden opgeofferd (zie hierboven; matig ongerief). 98% van de dieren ondervindt dus licht en 2% van de dieren ondervindt matig ongerief.

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 zullen uitgebreid worden onderzocht op macroscopische pathologie en weefsels zullen worden opgestuurd voor histologie. Verder zullen aangedane organen worden opgeslagen voor verder onderzoek (eiwit, RNA, DNA, aneuploidie metingen) zoals beschreven onder uitleesparameters.

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



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.	Volgnummer	Type dierproef
		2	Muismodellen voor aneuploidie in getransformeerde cellen

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.

In dit type dierproef onderzoeken we de relatie tussen chromosomale instabiliteit en kanker. Ons voorgaand onderzoek heeft uitgewezen dat chromosomale instabiliteit in de levensduur van een muis niet voldoende is om reproduceerbaar tot kanker te leiden (zie ook dierproeftype 1). Om beter te begrijpen hoe aneuploidie tot kanker leidt en hoe deze aneuploide kankers zich gedragen zullen we a) zoeken naar genen die samen met aneuploidie leiden tot kanker (middels genetische mutagenese (transposons, CRISPR)); zullen we b) onze bekende of nieuwe drivers voor chromosomale instabiliteit combineren met bekende tumorpredisposities (bijv. ■■■■, Ptch, Myc, Ras) of chemische mutagenese om aneuploide tumoren in diverse weefsels te veroorzaken; en c) humane en muizekankers transplanteren in de muis om te vergelijken hoe snel aneuploide en nieuw-aneuploide tumoren groeien en hoe frequent deze tumoren

chromosomen missegregeren.

Voor deelvraag a) zullen we een genetische in vivo screens uitvoeren (transposon of CRISPR) in enkele weefsels (bloed; kleine hersenen, darm en huid). Hiertoe zullen we onze conditionele knockout muizen inkruisen in een conditionele transposon of conditionele CRISPR achtergrond. Het genoom van het te targetten aneuploide weefsel zal dan worden gemutageniseerd (door transposons of CRISPR-libraries) en dieren zullen dan worden gevolgd op het ontstaan van tumoren. Zodra dieren ziek worden, zullen ze worden opgeofferd en de ontstane tumoren zullen worden geanalyseerd op driver-mutaties in de tumoren. We zullen beginnen met een eerste screen in bloed (pilot screen hiervan is al uitgevoerd onder oude vergunning) en daarin bepalen welk deel van de hits (genen die aneuploide bloedcellen veranderen in leukemiecellen) specifiek zijn voor bloedcellen en welke meer een algemene rol hebben in de celbiologie. Als er een groot deel van de significante hits weefselspecifiek zijn (dat is de verwachting), dan zullen we de transposonscreen uitbreiden naar andere weefsels (Go). We zullen die uitbreiding weefsel voor weefsel doen, waarbij we altijd eerst een pilotscreen zullen uitvoeren zoals hieronder beschreven. Mocht onze eerste transposonscreen met name 'algemene hits' opleveren, en het daarom aannemelijk is dat we geen extra hits zouden vinden in andere weefsels, dan beperken we ons tot 1 transposonscreen (No-Go).

Voor deelvraag b) zullen we ontstane tumoren in de verschillende modellen onderling vergelijken om de weefselspecifieke en algemene respons tegen aneuploidie in kaart te brengen. Onze eerste aanwijzingen uit voorgaand onderzoek laten zien dat er grote verschillen zijn tussen hoe verschillende weefsels/tumortypes reguleren op aneuploidie. Daarom willen we dit nu voor meerder weefsels goed in kaart brengen. In eerste instantie zullen we ons richten op bloed, lever, huid, (kleine) hersenen, darm en borst. [REDACTED] (en in sommige gevallen ook [REDACTED]) of nieuw te genereren conditionele allelen voor chromosomale instabiliteit zullen in een tumorpredispositieachtergrond gekruist worden (bijv. [REDACTED] (huid, bloed, lever), Ptch1 (huid, cerebellum), Myc (cerebellum), mutant Ras (huid, darm), APC (darm), Her2 (mamma). Per weefsel zullen we 1 of enkele cohorten van dieren opzetten en volgen op het ontstaan van tumoren. Dieren zullen nauwlettend worden gevolgd (minimaal 2 maal per week) op het ontstaan van tumoren door veranderingen in gedrag en gewicht te monitoren, en/of uiterlijke veranderingen zoals zichtbare (huid) of palpeerbare (mamma) tumoren. In geval van de huid zullen we ook in een cohort dieren tumoren chemisch induceren (DMBA, TPA). Dieren zullen worden opgeofferd bij de eerste tekenen van tumoren om ongerief tot een minimum te beperken. Voor deze experimenten zullen eerst 15 dieren worden ingezet als pilot en als er meetbare verschillen zijn (Go), zal dit worden uitgebreid tot maximaal 50 dieren per cohort, zo niet, dan zal dit cohort niet verder opgevolgd worden (No-Go)

Voor deelvraag c) zullen dieren (tumor)cellen ingespoten krijgen om de groeisnelheid van de cellen in vivo te bepalen, om te kijken of de cellen zich gedragen als 'echte kankercellen' en om te bepalen hoe vaak de cellen chromosomen missegregeren. In de meerderheid van de experimenten zullen dieren hematologische (tumor)cellen ingespoten krijgen in het bloed en zal gevolgd worden of deze tumoren gaan groeien in de muis. In enkele gevallen zullen muizen subcutaan tumorcellen ingespoten krijgen om te kijken of cellen maligne zijn. In dit geval zullen de muizen onderhuidse tumoren ontwikkelen.

In de dieren zullen we verschillende uitkomst parameters meten/bepalen.

De allereerste belangrijke uitkomstparameter voor dit dierproeftype is tumorlatentie en/of tumorgrootte. Waar mogelijk meten we dit met non-invasieve imaging (fluorescent gelabelde tumoren te meten middels IVIS imager)

Daarnaast zullen we in de transposon-geïnduceerde tumoren meten waar de transposons geïntegreerd zijn (middels sequencing) om te kijken hoe de aneuploide cellen veranderd zijn in kankercellen.

Om te valideren dat de dieren inderdaad aneuploidie accumuleren in de getargete weefsels zullen we deze ontstane tumoren onderwerpen aan karyotypering middels single cell sequencing, metaphase spreads en interphase FISH. Dit gebeurt op ingevroren of gefixeerde tumorcellen.

Daarnaast zullen we de tumoren onderwerpen aan een uitgebreide histologische analyse, waar noodzakelijk gecombineerd met immunohistochemie

(ingevroren en gefixeerde weefsels). Verder zullen we de respons op aneuploidie meten middels transcriptome analyse (RNA sequencing, qPCR) en middels biochemische bepalingen (Western Blots, en mogelijk mass spectrometrie op een select aantal samples (ingevroren weefsels). Tenslotte zullen we cellijnen afleiden uit diverse tumoren om verder celbiologische metingen te kunnen doen aan de tumorcellen (time-lapse microscopie, mechanistische experimenten, etc) (vers ingevroren tumoren in kweekmedium en vers in kweek genomen tumoren).

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.

Voor deelvraag a) zullen we conditioneel aneuploide muizen kruisen met stammen waarin induceerbaar transposons gemobiliseerd kunnen worden. Cre zal dan met tamoxifen geïnduceerd worden (oraal of IP, 4-5 behandelingen binnen 2 weken, of IP PolyI/PolyC, 4-5 behandelingen om de dag) waarbij het te targetten weefsel aneuploide wordt en tegelijkertijd de transposons zullen mobiliseren. Dieren zullen dan gevolgd worden op het ontstaan van tumoren. We hebben al een succesvolle pilotscreen lopen voor bloed en willen nu ook screenen in de huid en het cerebellum om weefselspecifieke drivers van aneuploide kankers in deze weefsels bloot te leggen.

Omdat we de tumorlatentie niet kennen, zullen we eerst pilotcohorts van ongeveer 15 dieren volgen, om te bepalen of de transposons in het te bestuderen weefsel in combinatie met aneuploidie leidt tot tumoren. Als dit het geval is (validatie pilot, Go), dan zullen we in overleg met de IvD een compleet cohort inzetten van 100 dieren totaal (85 extra dieren, waarbij de 15 pilot dieren het cohort compleet maken). Mocht de pilot uitwijzen dat de dieren geen of te weinig tumoren krijgen om genetische drivers van aneuploide kanker te vinden, dan zullen we de proef voor het betreffende weefsel niet uitbreiden naar een compleet cohort (No-Go).

Als een pilot voor een ander type genetische screen zullen we onze conditionele aneuploide muizen inkruisen met de conditionele CRISPR muis (Platt et al Cell. 2014;159(2):440-55). Dieren zullen dan viraal CRISPR-guideRNA libraries toegediend krijgen en gevolgd op het ontstaan van tumoren. Omdat deze technologie nog zeer jong is, zullen we hiervoor eerst 2 kleine pilots uitvoeren, 1 in hersenen en 1 in de mamma. Als dit type screen in de pilots succesvol is (de dieren ontwikkelen reproduceerbare tumoren), dan zullen we een van deze twee weefsels kiezen (met de kortste tumor latentie of minste ongerief) voor een complete screen (Go). In de pilots zullen dieren intraveneus lentiviraal virus toegediend krijgen coderend voor de guideRNAs volgens de geldende protocollen in de literatuur.

Voor deelvraag b) zullen dieren in een deel van de cohorten geen behandelingen ondergaan, dieren zullen alleen nauwlettend gevolgd worden op het ontstaan van de genetisch geïnduceerde tumoren. In een ander deel (wanneer we gebruik maken van induceerbare Cre-drivers) zullen dieren tamoxifen of PolyI/PolyC toegediend krijgen om Cre te induceren. Dieren zullen dan nauwlettend gevolgd worden op het ontstaan van tumoren. Een deel van de tamoxifen behandelde dieren (het cohort waarin we kanker in de huid bestuderen) zal naast met tamoxifen ook met TPA/DMBA (chemische carcinogenese) behandeld worden, DMBA behandeling is eenmalig, TPA behandeling is daarna wekelijks tot er tumoren ontstaan. Dieren zullen regelmatig worden geschoren om topische toediening te faciliteren. Tijdens de behandeling zullen deze laatstgenoemde dieren nauwlettend gevolgd worden op het ontstaan van huidtumoren. Ook voor deze experimenten zullen we in eerste instantie 15 dieren per cohort inzetten als pilotcohort, waarna we bepalen of er verschillen waarneembaar zijn tussen experiment en controledieren. Zo ja (Go), dan zullen we hiervan een compleet cohort maken door maximaal 35 extra dieren in te zetten (dus 50 in totaal). Als er in de pilot geen of te kleine verschillen zijn tussen de groepen, zullen we geen extra dieren gebruiken voor het betreffende pilotcohort (No-Go).

Voor deelvraag c) zullen we om de groeisnelheid van aneuploide tumoren te vergelijken met niet aneuploide tumoren muizen injecteren met aneuploide kankercellen of niet aneuploide kankercellen. Hiervoor zullen we aneuploide en niet aneuploide tumorcellen isoleren uit onze muismodellen voor T-ALL. Deze tumorcellen zullen we labelen met een genetische fluorescente reporter om ze in vivo te kunnen traceren met de IVIS imager. Op deze wijze kunnen we volgen of de donor dieren tumoren ontwikkelen. Dieren worden opgeofferd als we een tumor waarnemen (IVIS) en tumorcellen worden dan getransplanteerd in ontvanger dieren, zodat we de groeisnelheid (het ontstaan van de tumor in de recipient) kunnen vergelijken tussen aneuploide en niet aneuploide tumoren. We zullen deze methode eerst testen op een pilotcohort van 15 dieren en indien we de groeisnelheid betrouwbaar kunnen meten, dan zullen we het cohort uitbreiden tot MAXIMAAL 50 dieren of tot het aantal dieren waarbij we significante verschillen hebben gemeten tussen de experiment en controle dieren. Indien we voorzien dat we geen significante verschillen kunnen meten in een cohort van 50 dieren, dan beschouwen we het verschil als biologisch niet significant en zullen we niet meer dieren dan de pilot gebruiken (15, No-Go).

Daarnaast zullen we kandidaatgenen die samen met aneuploidie leiden tot hematologische kankers (te vinden in de onder a beschreven transposonscreen in bloed) valideren middels transplantaties van aneuploidie bloedcellen die retroviraal/lentiviraal getransduceerd zijn met kandidaatgen cDNAs of RNAis. Deze experimenten zullen dus pas plaatsvinden (Go) als we kandidaatgenen uit de transposonscreens geïdentificeerd hebben en niet worden uitgevoerd als geen van de transposonscreens werkt (No-Go). Voor de in vivo validatie van kandidaatgenen worden longterm en shortterm hematopoietische stamcellen uit onze conditionele knockuit muizen geïsoleerd (te verkrijgen via dierproeftype 1). Deze cellen worden in kweek getransduceerd met kandidaatgenen (maximaal 5 transplantaties per gen) en Cre-reporter en daarna in immuno-compromised ontvangermuizen getransplanteerd. Dieren (maximaal 5 per te testen gen, zie ook onder motivering dieren aantallen) worden dan gevolgd op de ontwikkeling van maligniteiten.

Verder zullen we kandidaatgenen valideren gevonden in de transposonscreens die leiden tot solide tumoren (darm, huid, hersenen). Aangezien dit solide tumoren zijn, zullen deze kandidaatgenen in hechtende relevante cellijnen getransduceerd worden (cDNA/RNAi, CRISPR) en subcutaan geïnjecteerd worden. Dieren worden dan gevolgd voor de vorming van subcutane tumoren (1 flank experiment, 1 flank controle) en opgeofferd als de tumoren >1 cm worden. Ook hier zullen we maximaal 5 dieren per te valideren gen gebruiken.

Tenslotte zullen we een aantal dieren gebruiken om de genomische instabiliteit en/ of frequentie van chromosoommisegregatie in getransplanteerde tumoren te quantificeren. Primaire tumorcellen zullen hiertoe worden getransplanteerd in immuno-compromised hosts. Muizen worden dan gevolgd op de ontwikkeling van maligniteiten (bloed of subcutaan) en opgeofferd om te meten hoe heterogeen de tumoren zijn. Per te analyseren tumor zullen we maximaal 5 dieren met de primaire tumor transplanteren.

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

In de meeste gevallen kennen we de latentie van de fenotypes/pathologie van de voren niet. Onze uitgebreide ervaring heeft ons geleerd, dat cohorten van 40-50 dieren per genotype voldoende zijn om een statistisch significant verschil aan te tonen tussen controle-groepen en dieren met een genetische predispositie (aneuploidie). In sommige gevallen blijken te verschillen tussen controlegroepen en experimentgroepen zo groot dat een kleiner aantal dieren volstaan had om het verschil in overleving/tumorlatentie significant aan te tonen. Om tot het minimum aantal noodzakelijke dieren te kunnen komen, zullen we daarom altijd starten met een pilotcohort van dieren (15 per groep) en deze alleen uitbreiden tot 50 dieren als er meetbare verschillen zijn tussen experiment en controledieren (Go) na overleg met de IvD. Als we geen duidelijk verschillen in een van de pilotcohorten meten zullen we het betreffende

cohort niet uitbreiden (no-Go) en concluderen dat er geen significante biologische verschillen meetbaar zijn.

In geval het volledige cohort van 50 dieren noodzakelijk is om de een significant verschil te meten zullen alle dieren (dus pilot van 15 en 35 extra dieren) als 1 experimentgroep beschouwd worden. Correctie voor multiple testing is dan ook niet noodzakelijk. Belangrijk hiervoor is wel, dat omdat alle experimenten survival curves zijn, we weinig variatie in de overleving verwachten tussen de pilot en eventueel noodzakelijke uitgebreidere cohorten. In eerste instantie dienen de eerste 15 dieren echt als pilot: we gaan ervan uit (op basis van voorgaande kennis) dat 15 dieren niet voldoende is om een significant verschil tussen dieren aan te tonen. Omdat de genotypes die we testen een onbekend fenotype hebben, kunnen we niet 100% voorspellen wat het verschil in overleving zal zijn. Mocht dit verschil groter zijn dan hier ingeschat, dan zullen we post-hoc een nieuwe power analyse uitvoeren met de dan nieuw bekende gegevens (i.e. het verschil in overleving tussen de groepen en de verdeling van experimentwaardes) om zo vast te stellen of de 15 dieren voldoende zijn voor een statistisch significant verschil of dat er nog meerdere dieren noodzakelijk zijn.

In geval van transposon screens zullen we een cohort van 100 experimentdieren volgen, waarin we transposons mobiliseren in aneuploid weefsel, en 50 controledieren, waarin we transposons mobiliseren in niet aneuploide weefsel. Deze cohortgrootte wordt bepaald door het aantal dieren noodzakelijk om genomewide de belangrijkste terugkomende integratie sites - common insertion sites of CIS - te identificeren. In elke tumor zullen op basis van sequencing de meest belangrijke integratiesites worden geïdentificeerd. Zo vinden we in elke tumor de zogenaamde 'driversmutaties' van de tumor. Omdat elke tumor 'uniek' is, zullen we daarna de integratiesites vergelijken binnen alle tumoren in het totale cohort. Op deze wijze kunnen we uitvinden welke drivermutaties vaker voorkomen binnen het cohort. Deze steeds terugkomende integratiesites (de CIS) zijn mogelijke specifieke drivers voor aneuploide tumoren en dus de kandidaatgenen die van aneuploide cellen aneuploide kankercellen maken. Onze ervaring en daarnaast de uitgebreide ervaring van onze collega's met dit type transposonscreen (zie ook (Rad et al, Nat. Gen. 2015 Jan;47(1):47-56) heeft uitgewezen dat met deze hoeveelheden dieren de meest belangrijke common insertion sites worden gevonden: de CIS worden dan voldoende vaak gevonden in de cohorten om zeker te zijn dat de belangrijkste drivers in dit type studie dan gevonden zijn.

Belangrijk om nogmaals te benadrukken is dat we deze screens sequentieel zullen uitvoeren te beginnen met het hematopoietisch systeem. Alleen als blijkt dat een groot aantal hits in de eerste screen weefselsspecifiek is, zullen we een screen in een volgend weefsel uitvoeren (zoals beschreven onder B). Na een tweede screen zullen we de overlap tussen de eerste twee screens bekijken en op basis daarvan beslissen of we in een derde en/ of vierde weefsel gaan screenen. We zullen daarnaast ook altijd beginnen met een pilotscreen om te kijken of er daadwerkelijk transposons-geïnduceerde tumoren ontstaan in het te onderzoeken weefsel.

Belangrijk: ook beschouwd vanuit een power-analyse is 40-50 dieren per cohort een reële schatting: in ons geval is de variatiecoëfficiënt sigma vooraf niet bekend; de proefgrootte wordt daarom afgelezen van een uit Owen afgeleide grafiek (Proefdieren en Dierproeven, L.F.M van Zutphen, vijfde druk, 2009, blz 211). Op basis van een onbetrouwbaarheidsdrempel (alfa) van 0.05 of een power (π) van > 0.8 en een verhouding tussen het te meten verschil ($\mu_1 - \mu_2$) en variatiecoëfficiënt van ongeveer 0.7 (dit betekent dat er bij een spreiding van bijvoorbeeld 2 maanden in de overleving binnen 1 groep een significant verschil gemeten wordt als de gemiddelde overleving tussen experiment en controlegroep 1.5 maanden uit elkaar ligt; dit zijn reële waarden die we in de praktijk vaak waarnemen) valt er uit de grafiek af te lezen dat de proefgrootte ongeveer 40-50 dieren dient te zijn.

B. De dieren

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

Alle experimenten zullen worden uitgevoerd op volwassen muizen. We maken gebruik van zowel mannen als vrouwen, tenzij we in de mamma kijken, dan gebruiken we alleen vrouwen. We verwachten namelijk geen sexe specifieke effecten. Voor dit type dierproef zullen alleen volwassen muizen uit eigen fok (heel soms bestellen we dieren vanuit extern, zoals van ██████ gebruikt worden, in sommige gevallen zullen dieren als jong volwassene al behandeld worden op Cre te activeren.

2a)

Voor de transposonscreens (bloed, huid, cerebellum en darm):

We zullen MAXIMAAL in 4 weefsels transposonscreens uitvoeren (te beginnen in bloed), zie hierboven voor fasering en Go/No-Go keuzes. Hiervoor hebben we per weefsel maximaal 100 experiment dieren en 50 controledieren (transposons zonder aneuploidie) per weefsel nodig.

Subtotaal transposonscreens: 600 dieren

Voor de CRISPR screen zullen we 2 pilot cohorten (in hersenen en mamma) uitvoeren van 15 dieren elk. Voor een van deze weefsels (afhankelijk van de uitkomst van de pilot) zullen we een volledige screen doen (ook 100 dieren + 50 controledieren (transposons zonder aneuploidie)). Bij de volledige screen zullen we de 15 dieren van de pilot voor het uiteindelijk gekozen weefsel meenemen in het totaal aantal experiment dieren (100).

Subtotaal CRISPR screen: 165 (150 voor volledige screen inclusief de dieren in een van de pilots + 15 dieren in andere pilot die niet in volledige screen uitmond).

2b)

Aneuploide lymfocyt cohorten; T-cel specifiek en geheel bloed:

Experiment aneuploid T-cel lymfocyt cohort: 50 dieren met aneuploid T-ALL, niet aneuploid controle T-cel lymfocyt cohort: 50 dieren

Experiment aneuploid bloedkanker cohort: 50 dieren, niet aneuploid controle bloedkanker cohort: 50 dieren

Subtotaal bloed: 200 dieren

Aneuploide medulloblastoma cohorten: In deze cohorten combineren we aneuploidie met een aantal bekende medulloblastoma predisposities in 4 verschillende combinaties van aneuploidie met of zonder ██████ verlies en met of zonder Myc overexpressie.

Per cohort testen we maximaal 50 dieren. Te testen genotypes: aneuploidie +Myc (50 dieren); aneuploidie + ██████ verlies (50 diern); controle tumoren: Myc (50 dieren) en ██████ verlies (50 dieren)

Subtotaal brein 200 dieren

Aneuploide squamous cell carcinoma en basal cell carcinoma cohorten: Voor basal cell carcinoma testen we een genetisch model (aneuploide gecombineerd met Ptch1 verlies) en chemische carcinogenese. Voor squamous cell carcinoma testen we alleen een genetisch model (aneuploide gecombineerd met ██████ verlies).

Voor basal cell carcinoma testen we 3 cohorten (2 experimenteel (aneuploide tumoren), 1 controle (niet aneuploide tumoren) van maximaal 50 dieren en voor squamous cell carcinoma 2 cohorten van maximaal 50 dieren (1 experimenteel (aneuploide tumoren), 1 controle (niet aneuploide tumoren), dus in totaal 5 cohorten.

Subtotaal huid: 250 dieren

Aneuploide hepatocellulair adenoma/carcinoma:

Experiment aneuploide levertumoren: 50 dieren, controle niet aneuploide levertumoren: 50 dieren
Subtotaal lever: 100 dieren

Mammatumoren (WAP-Cre):
Aneuploide mammatumoren: 50 dieren, niet aneuploide controle mammatumoren: 50 dieren
Subtotaal mamma: 100 dieren

Darmkanker: Voor het modelleren van darmkanker zullen we twee verschillende combinaties van aneuploidie met verschillende predisposities (RasV12, p53, APC) en twee controle cohorten testen met maximaal 50 dieren per cohort. Te testen: RasV12 tumoren (controle, 50 dieren) vs. RasV12+ aneuploidie (experiment (50 dieren)); ██████████ verlies (controle tumoren; 50 dieren) en ██████████ verlies met aneuploidie (experiment; 50 dieren).
Subtotaal darm: 200 dieren

Daarnaast genereren we ook enkele nieuwe conditionele modellen voor chromosomale instabiliteit (zoals beschreven in dierproef type 1). Naast dat we onder dierproef type 1 in deze modellen zullen kijken wat de effecten van de genmutaties zijn op aneuploidie in de muis, zullen we ook kijken of deze mutaties inderdaad leiden tot aneuploide kanker. Hiertoe zullen we in eerste instantie de mutaties activeren in het bloed (waar de tumorigenese in de muis in het algemeen het snelst verloopt) en misschien in huid. Omdat we deze kandidaatgenen nog in celweek aan het testen zijn, weten we de gennamen hiervan nog niet. We verwachten de komende 5 jaar ongeveer 4 van deze modellen te genereren (zie ook onder dierproef type 1). Per gen zullen we 1 tumorpredispositie (██████████ testen) in T-cellen. Het T-cel lymphoma controle tumor cohort (██████████ verlies gedreven T-ALL; zie hierboven) dubbelt hier als controle. Per gen vragen we dan ook 50 dieren aan in dit type dierproef dus 200 in totaal.
Subtotaal nieuw te testen genen: 200 dieren

2c)
Meten groeisnelheid aneuploide tumoren: ██; in T-cellen)
Om te meten of aneuploide tumoren sneller of langzamer groeien dan niet aneuploide tumoren, zullen we aneuploide tumoren isoleren uit onze twee modellen (████████████████████) voor aneuploide T-ALL. Deze tumoren zullen we transplanteren in recipient muizen en meten hoe lang het duurt voordat deze tumorcellen een nieuwe tumor vormen in vergelijking met een transplantatie van een niet aneuploide tumor. Per genotype (3 in totaal) hebben we 50 donor dieren en 50 recipient dieren nodig, 300 in totaal. Voor 2 genotypes, ██████████ en ██████████; p53 (100 dieren totaal) kunnen we de donor tumorcellen isoleren uit dieren die we ook onder 2b (aneuploide T-cel tumoren) nodig hebben (vermindering).
Subtotaal: 200 dieren

Valideren rol kandidaatgenen (uit 2a) in maligne transformatie van aneuploide cellen naar aneuploide kankercellen
We verwachten ongeveer 10 genen per weefsel (voor maximaal 4 weefsels in totaal: huid, cerebellum, darm, bloed) in vivo te moeten valideren (het merendeel van de kandidaatgenen valt af op basis van eerste in celweek validatie). Hiervoor moeten we 5 experiment (aneuploidie + kandidaatgen) en 5 controledieren (alleen kandidaatgen) per gen testen.
Subtotaal: 4 weefsels, 10 genen per weefsel, 10 dieren per gen = 400 dieren

Meten chromosomale instabiliteit en aneuploidie in tumoren:
We willen voor maximaal een 20 tumoren (10 aneuploide (experiment transplantaties) en 10 niet aneuploide (controle transplantaties)) het verloop van

chromosomale instabiliteit in ontwikkelende tumoren onderzoeken. Per tumor zullen we maximaal 5 muizen injecteren. We hebben hiervoor maximaal 100 dieren nodig.

Subtotaal aneuploidie metingen: 100 dieren.

Voor de in dit dierproeftype beschreven experimenten zullen we een aantal nieuwe muizenstammen genereren. We verwachten geen ongerief in de fok van deze dieren, maar omdat we dit van te voren niet kunnen uitsluiten gelden de eerste twee generaties als fok met ongerief. 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. Voor de hierboven beschreven cohorten zullen we in totaal 30 nieuwe genotypes genereren.

Subtotaal fok met ongerief: $30 \times 48 = 1440$ dieren.

Totaal: 4155 dieren

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.

Waar mogelijk doen we onze experimenten met celkweekexperimenten, maar het blijkt dat cellen in celkweek vaak anders op aneuploidie reageren dan cellen in hun eigen fysiologische niche. Daarom, om tot aneuploidie-selectieve therapie te komen, is het van cruciaal belang om aneuploidie in diermodellen te onderzoeken.

De nieuw te testen kandidaatgenen voor chromosomale instabiliteit zullen we eerst in weefselkweek testen, zodat alleen relevante genen in de muis getest worden (vervanging en vermindering).

Verder gebruiken we controlecohorten en het materiaal van dierproeftype 1 in dit dierproeftype voor de analyse van de effecten van aneuploïde op niet en wel getransformeerde weefsel: in dierproeftype 1 testen we de effecten van aneuploïde voor dezelfde weefsels als in dierproeftype 2, maar in dierproeftype 1 in een niet-kanker setting. De fenotypes van deze cohorten en te isoleren weefsels fungeren naast primair onderzoeksdoel in dierproeftype 1 ook als ongetransformeerde weefsel controle in dit dierproeftype. Deze controle voeren we toch maar 1 keer uit, wat leidt tot een vermindering van het aantal dieren.

In de keuze van onze weefsels die we onderzoeken, hebben we met name gekozen voor weefsels waarin tumoren snel opgemerkt worden en daarnaast en daarom tot relatief weining ongerief leiden (verfijning). Door waar mogelijk pilotexperimenten te doen alvorens gehele cohorten te volgen kunnen experimenten waarbij geen significant verschil meetbaar is, worden voorkomen (vermindering). Daarnaast zullen we de transposonexperimenten gefaseerd uitvoeren en na elk experiment bekijken of we in meer weefsels willen kijken wat mogelijk leidt tot vermindering.

Verder maken we gebruik van het genetisch fluorescent labelen van tumoren waar mogelijk, zodat we tumoren kunnen opsporen voor ze tot ernstig ongerief leiden (verfijning) en verschillende tumorstadia in kaart kunnen brengen door dezelfde muizen vaker te meten (vermindering).

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 in tumorcohorten worden minimaal 2 maal per week nauwkeurig geïnspecteerd op tekenen van ongerief. Gaande onze voortgang zullen we beter weten wanneer dieren ziek worden en rond die periode zullen we de waarnemingen intensiveren. Dieren zullen worden opgeofferd zodra ze de eerste tekenen van tumoren of ander ongerief vertonen zodat ongerief tot een minimum beperkt wordt. Hiertoe worden dieren dagelijks geïnspecteerd door medewerkers van de diervoorzorg en minimaal 2 maal per week door de verantwoordelijke onderzoeker.

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 zijn nog niet eerder uitgevoerd. Hiervoor hebben we een uitgebreide zoekopdracht op PubMed uitgevoerd en daarnaast gesproken met onze diverse collega's die dit soort modellen ontwikkelen [REDACTED]

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.

Dieren zullen bij eerste tekenen van ongerief/pljn worden opgeofferd.

☐ Ja

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

In dit dierproeftype zullen muizen beginnende tumoren ontwikkelen, die mogelijk tot matig ongerief kunnen leiden. Hieronder staat beschreven voor de verschillende type weefsels hoe dit ongerief zich kan uiten.

- In geval van leukemie (experimenten onder vragen 2a, 2b en 2c) zullen dieren last krijgen van anemie, kortademigheid, witte oren, mogelijk vergrootte milt, lymfeklieren en/of thymus. Dieren worden opgeofferd bij de eerste tekenen hiervan, zodat het ongerief 'matig' niet overschreidt.
- In geval van medulloblastoma (cerebellum) zullen dieren mogelijk last krijgen van motorische afwijkingen door het medulloblastoom. Door gebruik te maken van non-invasive imaging verwachten we dieren te kunnen opofferen voor dat deze zich manifesteren. Het ongerief van medulloblastoma wordt ingeschat als matig.
- In geval van huidtumoren (basal and squamous cell carcinoma, vragen 2a en 2b) kan er ongerief optreden door plaatselijke jeuk op de plek van de tumor. Dieren zullen worden opgeofferd voordat ze last krijgen van de tumoren (tumorgrootte tot 1 cm). Het ongerief van deze tumoren wordt ingeschat op licht tot matig.
- In geval van levertumoren (vraag 2b) zullen dieren uiteindelijk gewicht gaan verliezen. Door gebruik te maken van non-invasive imaging verwachten we de tumoren in een vroeg stadium te kunnen diagnostiseren en dieren tijdig opofferen. Het ongerief wordt ingeschat als matig.
- In geval van mammatumoren (vraag 2b) zullen dieren ongerief ondervinden van een onderhuidse massa. Dieren zullen eens per twee weken onderzocht worden op de aanwezigheid van mammatumoren middels palpatie. We verwachten daarmee de tumoren vroegtijdig op te sporen. Bij tumoren > 1cm zullen

dieren worden opgeofferd. Het ongerief schatten we in als licht-matig.

- In geval van darmtumoren (vragen 2a, 2b) zullen dieren mogelijk vermageren door minder efficiënte voedselopname. Dieren zullen daarom regelmatig (eens per 2 weken) worden gewogen om zo te voorkomen dat dieren meer ongerief dan noodzakelijk ondervinden van deze tumoren. Het ongerief voor deze dierproef wordt ingeschat als matig.

In zeer zeldzame gevallen kan het zo zijn dat de hierboven beschreven tumoren eerder of sneller ontstaan dan we verwachten (in het begin van de studie). Deze enkele dieren (verwacht <5% van de dieren) zouden dan direct (op basis van humane eindpunten) moeten worden opgeofferd. Het ongerief voor deze dieren schatten we in als matig (zie ook humane eindpunten), gezien de dieren tijdig opgeofferd worden. Uiteraard passen we onze proefopzet dan wel aan in overleg met de IvD (door bijv. eerder of vaker non-invasieve imaging toe te passen).

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Voor alle te bestuderen weefsels wordt het ongerief veroorzaakt door beginnende tumoren in de betreffende weefsels:

- Motorische afwijkingen zijn het gevolg van verdrukking van het cerebellumweefsel door de tumor
- Anemie en kortademigheid komen door verminderde aanmaak van rode bloedcellen door leukemie en eventueel door een vergrootte thymus die op de longen drukt.
- Gewichtsverlies bij lever of darmtumoren komt door een verminderd efficiënte vertering/opname van voedsel.
- Jeuk bij huidtumoren wordt veroorzaakt door lokale ontstekingen rondom de huidtumor.
- Tenslotte kunnen dieren algehele malaise ontwikkelen door weefselfalen: dit zullen we echter in verreuit de meeste gevallen ruim voor zijn door de dieren regelmatig te inspecteren en non-invasieve imaging.

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

Dieren zullen zeer regelmatig (minimaal 2 maal per week) uitgebreid geïnspecteerd worden door de verantwoordelijke onderzoeker en worden dagelijks door de dierv verzorging gecontroleerd. De onderzoekers zullen de inspecties intensiveren als dieren in de periode komen dat de tumoren zich gaan ontwikkelen. Het ontstaan van tumoren zal waar mogelijk ook gevolgd worden met fluorescente reporters en non-invasieve imaging.

Dieren zullen worden opgeofferd zodra ze licht of matig ongerief ondervinden (motorische problemen, kortademigheid, zichtbare of palpeerbare tumoren, kromme rug, etc). Verder worden dieren opgeofferd als ze lethargisch zijn, meer dan 20% gewicht verloren zijn, of ernstige verwondingen (vechten, krabben) hebben (zie ook humane eindpunten).

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.

Doordat we de dieren regelmatig controleren en dit intensiveren in de periode dat de dieren ziek worden, zal alleen in de minderheid van de gevallen dieren dusdanig ziek worden dat de op basis van humane eindpunten opgeofferd dienen te worden, in onze ervaring is dit in minder dan 5% van de gevallen. Dit zal zijn als de dieren moribund zijn, significante motorische afwijkingen hebben (omvallen, meerdere malen epileptische aanvallen krijgen (cerebellum model)) lethargisch zijn (kan optreden bij weefselfalen in bijv. laat levertumor stadium, ademnood vertonen (ernstige anemie, of grote druk op de longen door vergrootte thymus (>1.5 g)), >20% van hun gewicht verloren zijn (kan optreden bij lever- of darmtumoren) of ernstige (vecht)wonden (kan optreden na

vechten of openkrabben huidtumoren) hebben.

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

We streven ernaar dat zo min mogelijk dieren dit criterium zal halen, we verwachten minder dan 5% van de dieren op basis van onze voorgaande experimenten.

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.

Het cumulatief ongerief schatten we in als licht-matig. 35% van de dieren zal licht ongerief ondervinden (dieren t.b.v. het genereren van nieuwe lijnen) en 65% van de dieren zal matig ongerief ondervinden (dieren die tumoren ontwikkelen of opgeofferd worden op basis van humane eindpunten).

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 zullen uitgebreid worden onderzocht op macroscopische pathologie en weefsels zullen worden opgestuurd voor histologie, zie ook de hierboven beschreven te meten uitkomstparameters. Verder zullen aangedane organen worden opgeslagen voor verder onderzoek (eiwit, RNA, DNA, aneuploidiemetingen, en transposonintegratiebepaling)

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



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.	Volgnummer	Type dierproef
		3	Muismodellen voor het visualiseren van aneuploidie en chromosoomsegregatie

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.

In dit type dierproef zullen we in levende muizen chromosoommissegregatie en aneuploïdie visualiseren. Dit is belangrijk, omdat ons voorgaand werk laat zien dat aneuploidie (zoals onderzocht in de eerste twee dierproeftypes) in vivo beter getolereerd wordt dan we eerder aannamen. In dit dierproeftype willen we chromosoomsegregatie visualiseren middels intravital imaging, gebruikende van de diermodellen uit dierproeftype 1 en 2 die we inkruisen met nieuw te genereren muismodellen in samenwerking met [REDACTED]. In deze te ontwikkelen muismodellen kunnen we diverse structuren van mitotische cellen genetisch fluorescent labelen. Deze te gegenereerde conditionele muismodellen voor mitotische structuren zullen in eerste instantie worden ingekruisd met onze bestaande modellen voor weefsel-specifieke aneuploidie beschreven onder dierproeftypes 1 en 2) We zullen in eerste instantie

ons richten op het imageren van de huid, maar in tweede instantie mogelijk ook in andere orgaansystemen (bijv. darm) bekijken. Hiertoe zullen we onze nieuwe te genereren 'mitosemarkermuizen' inkruisen met enkele van onze bestaande stammen. Indien nodig, zullen we celdeling (of zelfs tumoren) induceren (genetisch dan/wel chemisch), zoals beschreven in dierproef type 2 in deze aneuploide mitosemarkermuizen. Dieren zullen dan een intravital imaging window geïmplantiseerd krijgen in huid of buikwand en dan onder verdoving gefixeerd worden onder een multi-photon microscoop opstelling zodat we individuele cellen kunnen volgen.

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.

Aneuploide en niet aneuploide mitotische marker dieren zullen window chambers geïmplantiseerd krijgen, al dan niet na inductie van celdeling met TPA (2 x per week, enkele weken voorafgaande aan het imaging experiment; of DMBA (1x) + TPA, 2 keer per week totdat er tumoren ontstaan). DMBA (7,12-dimethylbenz[a]anthracene) dient als mutagen om mutaties in de huid aan te brengen, TPA (12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate) leidt tot een ontstekingsreactie en daarmee celdeling tot celdeling: deze tweestapscarcinogenese is een efficiënte manier om huidtumoren in de muis te provoceren (Filler et al, CSH Protoc. 2007 Sep 1;2007:pdb.prot4837). DMBA en TPA zullen topisch worden aangebracht volgens een standaard huidmutagenese protocol (Filler et al, CSH Protoc. 2007 Sep 1;2007:pdb.prot4837). Door dit protocol treedt er alleen mutagenese lokaal in de huid op.

Voor imaging zullen de dieren gesedeeerd worden en onder sedatie voor enkele uren gefixeerd worden onder de microscoop om individuele celdelingen te visualiseren en aneuploidie te quantificeren in vivo. De exacte protocollen zullen worden overgenomen van en geleerd bij het lab [REDACTED]

[REDACTED] heeft protocollen waarbij de window chambers meerdere weken goed blijven zitten zonder ongerief voor de muizen: deze protocollen zullen we leren van de biotechnici bij [REDACTED] en hier implementeren.

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

Per weefseltype en genotype (eventueel met/zonder behandeling, zie toelichting dieren) zullen we maximaal 10 dieren monitoren, met maximaal 4 metingen per dier met minimaal 1 week tussen de individuele metingen. In deze opzet krijgen we in totaal per genotype 40 metingen (4 per dier, 10 dieren totaal), wat voldoende is om biologische verschillen significant aan te tonen: zie ook statistische toelichting onder dierproef types 1 en 2). Per genotype zullen we tot 2 types mitosemarker-muizen testen (met verschillende kleurcombinaties, verschillende (mitose) markers), daarom vragen we 20 dieren per genotype aan. We zullen ons in eerste instantie richten op imaging in de huid en darm (2 goed toegankelijke weefsels) en indien succesvol (Go) in tweede instantie ook op imaging van de mamma, en daarna mogelijk ook de lever.

In de aanloop zullen we 20 dieren gebruiken om de intravital imaging methodieken te leren ([REDACTED]) en te optimaliseren. We zullen pas de 'echte metingen' starten als we de imaging methodiek geoptimaliseerd hebben (Go), maar zijn vrij zeker dat dit zal lukken, omdat dit type imaging al routinematig gedaan wordt in het [REDACTED]

B. De dieren

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

Alle experimenten zullen worden uitgevoerd op volwassen transgene muizen. We maken gebruik van mannen en vrouwen, omdat we geen verschillen verwachten tussen de sexes. Voor dit type dierproef zullen alleen volwassen muizen uit eigen fok (heel soms bestellen we dieren vanuit extern, zoals van [REDACTED]) gebruikt worden, in sommige gevallen zullen dieren als jong volwassene al behandeld worden op Cre te activeren. Binnen dit type dierproef

zullen we de volgende cohorten volgen:

Optimaliseren imaging (mitose-marker): 20 dieren
Subtotaal 20 dieren

Huid:

Controle muizen; 2 te testen mitose-markers: 20 dieren
Aneuploide muizen; 2 te testen mitose-markers: 20 dieren
Controle muizen; inductie celdeling met TPA; 2 te testen mitose markers: 20 dieren
Aneuploide muizen; celdeling inductie met TPA; 2 te testen mitose markers: 20 dieren
Controle muizen; huidtumor inductie met DMBA/TPA; 2 te testen mitose markers: 20 dieren
Aneuploide muizen; huidtumorinductie met DMBA/TPA, 2 te testen mitose markers: 20 dieren
Subtotaal 120 dieren

Darm:

Controle muizen, 2 te testen mitose markers: 20 dieren
Aneuploide muizen, 2 te testen mitose markers: 20 dieren
Subtotaal 40 dieren

Indien imaging in huid en darm succesvol is zullen we ook nog in mamma en/of lever kijken. We hebben dan de bestaande mitosemarkers goed geanalyseerd en gebruiken hier dan alleen de meest geschikte mitosemarkermuis. We hebben hier dan 20 dieren per weefsel, 10 experiment, 10 controle voor nodig. Deze experimenten vinden plaats in nauw overleg met en met advies van [REDACTED].
Subtotaal 40 dieren.

Om alternatieven voor intravital imaging dierproeven te exploreren zullen we vanuit een aantal dieren organoids afleiden uit de darm en cerebellum. Hiervoor zullen we maximaal 10 reporterdieren opofferen per genotype voor 4 genotypes in maximaal 2 weefsels: 2 mitosemarkers, 10 experiment (genotype 1) en 10 controle (genotype 2) dieren: 80 dieren totaal. Deze organoids zullen we dan imageren als alternatief voor het imageren in dieren. Dit experiment kan aanleiding vormen om in een vervolgaanvraag meer experimenten in organoids te doen en minder in dieren.
Subtotaal 80 dieren

Subtotaal imaging: 300 dieren.

Voor deze experimenten zullen we een aantal nieuwe muizenstammen genereren. Dit betreft stammen waarin we weefsel-specifiek diverse fluorescent gelabelde mitosemarkers tot expressie kunnen brengen. Deze nieuw te genereren mitosemarkermuizen (worden gegenereerd door [REDACTED]) worden dan ingekruist met stammen beschreven onder dierproeftype 1 en 2 (muismodellen voor weefsel-specifieke aneuploidie en aneuploide kanker; huid, lever, cerebellum, mamma en darm), dit zijn de nieuw te genereren stammen. We verwachten geen ongerief in de fok van deze dieren, maar omdat we dit van tevoren niet kunnen uitsluiten gelden de eerste twee generaties als fok met ongerief. 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. Voor de hierboven beschreven cohorten zullen we ongeveer 10 nieuwe genotypes genereren.

Subtotaal fok met ongerief: $10 \times 48 = 480$ dieren.

Totaal aangevraagd voor dierproeftype 3: 780 dieren.

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.

Waar mogelijk zullen we i.p.v. dieren organoids (dus in weefselkweek) imager (vervanging, vermindering) en bekijken of we in de toekomst meer met organoids kunnen als vervanging van dierproeven. Dieren zullen passende pijnstilling krijgen waar noodzakelijk (verfijning). Verder zullen we dezelfde dieren meerdere malen bekijken, wat dus leidt tot vermindering van het aantal proefdieren. Tenslotte zullen we de minst invasieve window chambers gebruiken: verfijning.

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.

Gedurende het feitelijke imager onder de microscoop (enkele uren) zullen de muizen gesedeeerd zijn, zodat ze geen ongerief ondervinden van het imager. Dieren zullen tijdens en na de operatie van passende pijnstilling voorzien worden. Tenslotte zullen de dieren met imaging chambers nauwgezet gevolgd worden op de eventuele ontwikkeling van complicaties van de window chamber (lokale ontsteking) en hiervoor behandeld worden en opgeofferd worden indien dit te ernstig is/ niet behandelbaar is. De ervaring van [REDACTED] leert dat de imaging chambers zonder ongerief meerdere weken blijven zitten.

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 zijn nog niet eerder uitgevoerd. Hiervoor hebben we een uitgebreide zoekopdracht op PubMed uitgevoerd en daarnaast gesproken met onze diverse collega's die dit soort modellen ontwikkelen [REDACTED]

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?

Alle dieren onder dit dierproeftype (behalve de dieren die worden opgeofferd voor organoids) ondervinden ongerief (licht) van de ingreep om het imaging window te implanteren en er mee rond te lopen. Deze procedure leren we van het lab van [REDACTED]. In enkele gevallen kan rondom het imaging window een ontsteking ontstaan. Deze kan in eerste instantie lokaal behandeld worden met antibioticum en als dit niet werkt zal het dier worden opgeofferd.

Verder zal een deel van de dieren huidtumoren ontwikkelen (deze kunnen jeuk geven) of darmtumoren ontwikkelen (die kunnen leiden tot gewichtsverlies). In geval de intravital imaging succesvol is, zullen we ook imaging pilots uitvoeren op mamma en levertumoren. Deze dieren kunnen beginnend ongerief ondervinden van lever/mamma tumoren (gewichtsverlies). Het ongerief van de verschillende type tumoren wordt ingeschat als matig. Het cumulatief ongerief van de intravital imaging (window implantatie, tumor en sedatie voor imaging) wordt ingeschat als matig.

Voor de organoid experimenten zullen dieren worden opgeofferd als ze beginnende darmtumoren of beginnend medulloblastoma hebben. Het ongerief voor deze dieren wordt ingeschat als matig.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De chirurgische ingreep leidt tot licht ongerief. Als er een ontsteking ontstaat bij het imaging window schatten we het cumulatief ongerief in als matig. De ontstane tumoren kunnen aanleiding geven tot matig ongerief: huidtumoren leiden tot jeuk, darmtumoren leiden tot verminderde voedselopname en gewichtsverlies, levertumoren kunnen leiden tot verstoorde voedselvertering en dus gewichtsverlies, mammatumoren kunnen dieren beperken in hun beweging, cerebellumtumoren (medulloblastoma voor de organoids) kan tot motorische afwijkingen leiden door verdrukking van het gezonde cerebellumweefsel. De combinatie van imaging en tumoren schatten we in als matig ongerief.

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

Dieren met imaging windows zullen om de dag geïnspecteerd worden door onderzoekers en dagelijks door diervverzorgers om te controleren of er geen ontstekingen ontstaan. Gedurende het feitelijke imageren (immobilisatie onder de microscoop, enkele uren) worden dieren constant in de gaten gehouden om te waarborgen dat ze goed verdoofd zijn en geen ongerief ondervinden. Dieren waarin tumoren kunnen ontstaan worden minimaal 2 maal per week uitgebreid gecontroleerd en daarnaast regelmatig gecontroleerd middels non-invasieve IVIS imaging. Op deze wijze kunnen we dieren imageren op het moment dat de tumoren goed waarneembaar zijn (microscopisch), maar nog niet veel ongerief geven.

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.

In de minderheid van de gevallen (<5%) zullen dieren dusdanig ziek worden dat de op basis van humane eindpunten opgeofferd dienen te worden. Deze humane eindpunten zouden bereikt kunnen worden als dieren een niet te behandelen infectie rondom het imaging window ontwikkelen, als dieren sneller dan verwacht grote tumoren (bijv. in de darm of lever) ontwikkelen en daardoor snel gewicht verliezen (>20% van hun gewicht), als dieren letharisch/moribund zijn of als dieren ernstige krab- of vechtwonden hebben. Omdat we het ontstaan van de tumoren nauwgezet zullen volgen met non-invasieve (IVIS) imaging voor we window chambers implanteren is de kans erg klein dat de dieren met tumoren op basis van humane eindpunten moeten worden opgeofferd. Verder,

door nauw samen te werken met het lab van [REDACTED], zullen we de kansen op lokale ontstekingen door de window chambers tot een minimum beperken. Zo verwachten we het aantal op te offeren muizen op basis van humane eindpunten <5% te houden.

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

We verwachten dat minder dan 5% van de dieren moet worden getermineerd vanwege dit criterium.

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.

Het cumulatief ongerief schatten we in als licht-matig: 62% van de dieren ondervindt licht ongerief, dit betreft dieren in nieuw te genereren stammen. 38% van de dieren ondervindt matig ongerief ten gevolge van het implanteren van imaging windows, intravital imaging, eventuele tumorontwikkeling het het voortijdig opofferen van dieren op basis van humane eindpunten.

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.

Na de intravital imaging experimenten zullen dieren uitgebreid worden onderzocht op macroscopische pathologie en weefsels zullen worden opgestuurd voor histologie. Verder zullen aangedane organen worden opgeslagen voor verder onderzoek (eiwit, RNA, DNA, en single cell sequencing in enkele gevallen). De histologie van de weefsels zal worden vergeleken met de intravital imaging data.

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

Van: [REDACTED]
Verzonden: donderdag 12 mei 2016 10:26
Aan: Info-zbo; [REDACTED]
CC: Secretariaat DEC
Onderwerp: RE: AVD105002016465_aanhouden.beoordelen
Bijlagen: Bijlage_1 [REDACTED]_r_AVD105002016465.doc; Bijlage_2 [REDACTED]_AVD105002016465.doc;
 Bijlage_3 [REDACTED]_AVD105002016465.doc; NTS_Foijer_AVD105002016465.docx;
 Projectvoorstel [REDACTED]_AVD105002016465.docx

Beste [REDACTED]

Dank voor Uw email aangaande onze CCD aanvraag AVD105002016465. Wij hebben alle vragen zo goed mogelijk proberen te beantwoorden: zie ook hieronder. Daarnaast hebben we de tekst van de aanvraag aangepast zoals toegelicht en verzocht. De aangepaste bestanden zijn bijgevoegd. We hopen dat de onduidelijkheden hiermee zijn verhelderd en horen het graag als U nog vragen heeft.

Zou U willen bevestigen of U de bestanden en antwoorden in goede orde heeft ontvangen?

Vragen/onduidelijkheden:

1) In bijlage 1 beschrijft u onder A dat "In geval van HSC transplantaties zijn 25 dieren per groep in onze ervaring voldoende". In de proef onder B waarin u donor en ontvangerdieren beschrijft, spreekt u echter over 50 dieren per groep. Kunt u dit verhelderen?

Antwoord: Dit is een vergissing van mijn zijde die door onze DEC en mijzelf over het hoofd is gezien. Excuses hiervoor. We willen inderdaad voor transplantatiestudies 25 dieren per groep bestuderen, 1 controle groep en 1 experiment groep (dus 50 dieren). De tumoren worden 1:1 getransplanteerd, we hebben dus ook een zelfde aantal recipient dieren nodig (50). In totaal vragen we voor dit experiment 100 dieren (en niet de eerder beschreven 200) aan. Het totaal aantal aan te vragen dieren daalt hierdoor met 100; dit is aangepast in bijlage 1 en de NTS.

2) In bijlage 2 beschrijft u dat u controlecohorten en het materiaal daaruit gebruikt voor verschillende dierproeftypes. In bijlage 2 beschrijft u echter voor elke proef alsnog een controlecohort. Dit lijkt dubbel. Kunt u dit verhelderen?

Antwoord: Dit was inderdaad niet duidelijk uitgelegd. Het dubbel gebruik van controlecohorten waarnaar verwezen wordt als zijnde 'vermindering' zijn de aneuploide en niet aneuploide niet-kanker weefsels uit dierproeftype 1, dit is nu beter uitgelegd onder 'vermindering, verfijning, vervanging'. De controles die nog wel worden opgevoerd onder dierproeftype 2 zijn niet aneuploide tumor controles. Dit is nu beter benoemd voor alle experimenten beschreven onder 'dieren' in dierproeftype 2.

3) In de NTS heeft u de ongeriefsclassificatie uitgesplitst van licht tot ernstig. In de bijlagen dierproeven spreekt u over licht dan wel matig ongerief. Kunt u de ongeriefsclassificatie in de projectaanvraag beter uitsplitsen?

Antwoord: Dit was inderdaad verwarrend. Het ongerief is nu per te onderzoeken weefseltype gespecificeerd en gekwantificeerd (licht, matig, ernstig) voor alle drie de dierproeftypes.

4) Hiermee samenhangend willen wij u vragen beter te onderbouwen waardoor het ongerief bij de verschillende muismodellen wordt veroorzaakt.

Antwoord: Naast een uitsplitsing van de types ongerief voor de verschillende experimenten zijn ook de oorzaken van het ongerief nu per weefsel benoemd voor alle drie de dierproeftypes.

5) De humane eindpunten die u beschrijft zijn algemene humane eindpunten. Is het mogelijk deze voor de verschillende modellen specifiek te maken?

Antwoord: Aan de beschrijving van de humane eindpunten zijn nu ook model-specifieke parameters toegevoegd naast de algemene humane eindpunten.

6) In bijlage 3 beschrijft u dat u gebruik maakt van diermodellen uit bijlage 1 en 2, maar u voert ook het genereren van nieuwe muizenstammen op. Kunt u dit verhelderen?

Antwoord: Dit is nu beter toegelicht in dierproeftype 3: de nieuw te genereren lijnen betreft de muizen die de mitosemarkers conditioneel tot expressie brengen. Deze worden in samenwerking met de UMCG Mouse Clinic gemaakt. Om aneuploidie in deze lijnen te induceren, zullen deze lijnen gekruist worden met de muismodellen voor weefsel specifieke aneuploidie (en aneuploïde kanker) zoals die beschreven zijn in dierproeftypes 1 en 2. De nieuwe stammen betreft dus de mitosemarker muizen en de combinatiestammen van mitosemarker met conditionele aneuploidie.

7) In bijlage 3, vraag D schrijft u: "Gedurende het gehele experiment zullen de muizen gesedeerd zijn,...". Wij nemen aan dat u bedoelt dat de dieren tijdens het imagen gesedeerd zijn. Kunt u dit bevestigen?

Antwoord: Dit is inderdaad een verwarrende formulering, een verkeerde definitie van experiment van mijn zijde. Ik heb dit aangepast in het dierproeftype 3: inderdaad, zoals U stelt zijn de dieren alleen enkele uren tijdens het imagen gesedeerd.

Hartelijke groeten,

■

Van: Info-zbo [info@zbo-ccd.nl]

Verzonden: maandag 9 mei 2016 17:02

Aan: ■

CC: ■

Onderwerp: AVD105002016465_aanhouden.beoordelen

Beste ■

Bijgevoegde brief wordt u niet meer per post gezonden.

In principe heeft u 14 dagen de tijd om deze vragen te beantwoorden. Als u echter uiterlijk donderdag 12 mei reageert, kan uw aanvraag in de eerstvolgende CCD vergadering behandeld worden.

Met vriendelijke groet,

■

Centrale Commissie Dierproeven

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.



Centrale Commissie Dierproeven

> 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
AVD105002016465

Bijlagen

1

26 MEI 2016

Datum

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 16 maart 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "De rol van aneuploidie in kanker" met aanvraagnummer AVD105002016465. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 12 mei 2016, 20 mei 2016 en 23 mei 2016 heeft u uw aanvraag aangevuld. Deze informatie betrof consistentie tussen de NTS en het projectvoorstel op het vlak van ongerief-inschatting en doelcategorie. Daarnaast heeft u uitleg gegeven over de mogelijkheid te starten met dit project indien een parallel ingediende aanvraag niet of later vergund zou worden.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de algemene voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. De voorwaarde betreffende afstemming van de go/no-go momenten met de IvD is om te voorkomen dat dieren onnodig in proeven worden ingezet.

De algemene voorwaarde betreffende artikel 10, lid 1 sub a van de wet wordt gesteld bij vergunningen met een langere looptijd. Dit om te voldoen aan datgene wat volgt uit dit artikel. U kunt met uw project "De rol van aneuploidie in kanker" starten. De vergunning wordt afgegeven van 25 mei 2016 tot en met 31 maart 2021.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-RUG gevoegd. Dit advies is opgesteld op 15 maart 2016. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie, nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering, met toevoeging van twee algemene voorwaarden. Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Bezwaar

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

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

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

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

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

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

Meer informatie

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

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



Ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD105002016465

Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Rijksuniversiteit Groningen

Adres: A. Deusinglaan

Postcode en plaats: 9713AV GRONINGEN

Deelnemersnummer: 10500

deze projectvergunning voor het tijdvak 24 mei 2016 tot en met 31 maart 2021, voor het project "De rol van aneuploidie in kanker" met aanvraagnummer AVD105002016465, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-RUG. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Universitair docent. Voor de uitvoering van het project is Universitair docent verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 16 maart 2016
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 23 mei 2016;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 23 mei 2016;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 15 maart 2016, ontvangen op 16 maart 2016.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 12 mei 2016, 20 mei 2016 en 23 mei 2016.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
Muismodellen voor aneuploidie in niet getransformeerde cellen	Muizen (Mus musculus) /	2636	100% Licht	2236 volwassen dieren, 400 embryo's
Muismodellen voor aneuploidie in getransformeerde cellen	Muizen (Mus musculus) /	4155	35% Licht 65% Matig	
Muismodellen voor het visualiseren van aneuploidie en chromosoomsegregatie	Muizen (Mus musculus) /	780	62% Licht 38% Matig	

Voorwaarden

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

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat go/no go momenten worden afgestemd met de IvD.

In artikel 10, lid 1 sub a 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 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 13d volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

In artikel 13c is vastgesteld dat proefdieren geadopteerd kunnen worden, teruggeplaatst in hun habitat of in een geschikt dierhouderijsysteem, als de gezondheidstoestand van het dier het toelaat, er geen gevaar is voor volksgezondheid, diergezondheid of milieu en er passende maatregelen zijn genomen om het welzijn van het dier te waarborgen.

De Minister heeft vrijstelling ontheffing verleend volgens artikel 13c, die de afwijkende methode van doden op basis van wetenschappelijke motivering ten minste even humaan acht als de in de richtlijn opgenomen passende methoden.