

Inventaris Wob-verzoek W17-09										
nr.	document NTS 2016728	wordt verstrekt				weigeringsgronden				
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1	
1	Aanvraagformulier				x		x	x		
2	NTS	x								
3	Projectvoorstel				x			x		
4A	bijlage animal procedure 1				x			x		
4B	bijlage animal procedure 2				x			x		
4C	appendix animal procedures			x						
5	Ontvangstbevestiging				x		x	x		
6A	Mail verzoek om aanvullende informatie				x		x	x		
6B	brief verzoek om aanvullende informatie				x		x	x		
7	Mail aanvullende vragen DEC				x		x	x		
8	reactie aanvullende informatie				x		x	x		
9	DEC advies				x		x	x		
10	Advies CCD		x							x
11	Beschikking en vergunning				x		x	x		



27 MRT 2017

## 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](http://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?  
*Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.*
- Ja > Vul uw deelnemernummer in 80100 KNAW  
plaats van uitvoering: [REDACTED]
- Nee > U kunt geen aanvraag doen
- 1.2 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.
- Naam instelling of organisatie [REDACTED]-KNAW
- Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde [REDACTED]
- KvK-nummer 54667089
- 1.3 Vul de gegevens van het postadres in.  
*Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.*
- Straat en huisnummer [REDACTED]
- Postbus 19121
- Postcode en plaats 1000GC Amsterdam
- IBAN [REDACTED]
- Tenaamstelling van het rekeningnummer [REDACTED]
- 1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.
- (Titel) Naam en voorletters [REDACTED]  Dhr.  Mw.
- Functie Groepsleider
- Afdeling [REDACTED]
- Telefoonnummer [REDACTED]
- E-mailadres [REDACTED]
- 1.5 *(Optioneel)* Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.
- (Titel) Naam en voorletters [REDACTED]  Dhr.  Mw.
- Functie [REDACTED]
- Afdeling [REDACTED]
- Telefoonnummer [REDACTED]
- E-mailadres [REDACTED]

- 1.6 *(Optioneel)* Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- (Titel) Naam en voorletters  Dhr.  Mw.
- Functie
- Afdeling
- Telefoonnummer
- E-mailadres
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- Ja > *Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag*
- Nee

## 2 Over uw aanvraag

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?
- Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3
- Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2
- Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3
- 2.2 Is dit een *wijziging* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?
- Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier
- Nee > Ga verder met vraag 3
- 2.3 Is dit een *melding* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?
- Nee > Ga verder met vraag 3
- Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 15 - 4 - 2017
- Einddatum 15 - 04 - 2022
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Single-cell quantification of the regulation of gene expression in the first stages of early embryonic development
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Het begrijpen hoe een totipotente cel ontstaat en hoe de eerste celttype-specifieke beslissingen worden genomen kort na bevruchting van de eicel
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC DEC-KNAW
- Postadres
- E-mailadres

## 4 Betaalgegevens

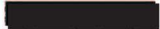
- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1287 Lege  
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.  
*Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*  
 Via een eenmalige incasso  
 Na ontvangst van de factuur

## 5 Checklist bijlagen

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

## 6 Ondertekening


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

Naam 

Functie 

Plaats Amsterdam

Datum 18 - 3 - 2017

Handtekening 



## Form Project proposal

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

### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 80100 – KNAW [REDACTED]
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen [REDACTED]
- 1.3 Provide the title of the project. Single-cell quantification of the regulation of gene expression in the first stages of early embryonic development.

### 2 Categories

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

### 3 General description of the project

#### 3.1 Background

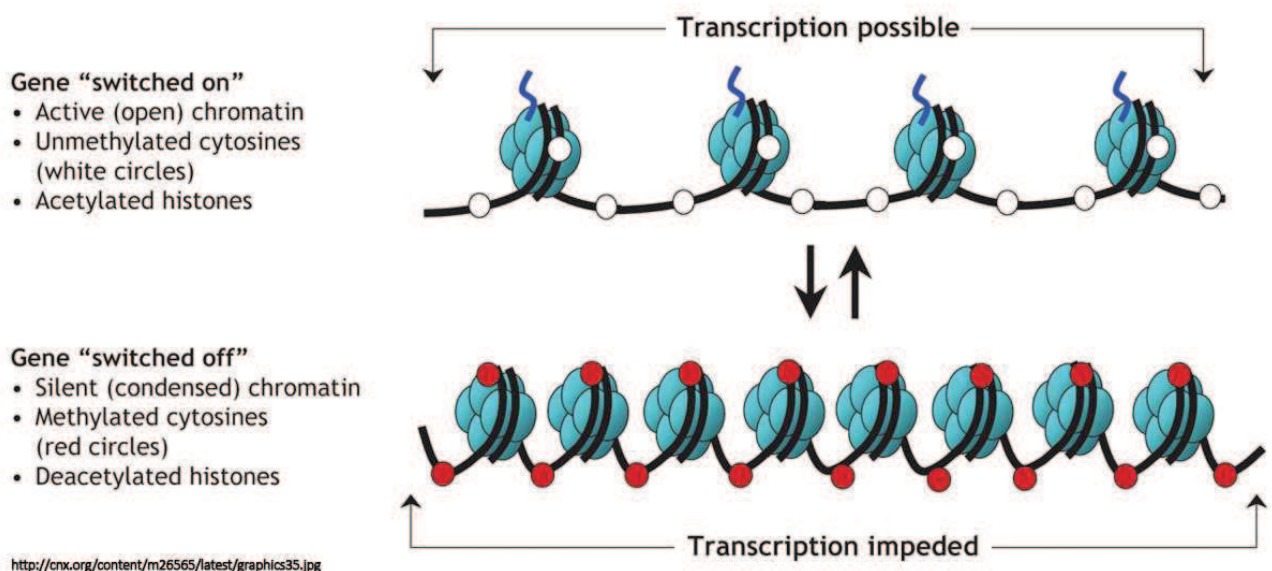
Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.

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

When it was first discovered that the DNA of a cell contains the genetic instructions for all cellular

functions, it was believed that diversification in cellular functions arose through the differential distribution of subsets of genetic material to the different cell types. Nowadays we know that this is not the case; almost all cells in multicellular organisms are endowed with the same DNA sequence, and the differences in cellular functions are not caused by a selective distribution of DNA over cells with different functions, but by the selective cell type-specific activation of subsets of the DNA or genes. The selective activation of cell type-specific gene-expression patterns are regulated through more, or less tight wrapping of DNA into proteins called histones. This DNA-protein assembly is collectively called chromatin and the mechanisms that are involved in opening and closing the chromatin are called epigenetics.

The field of epigenetics deals with the inheritance of traits or phenotypes (e.g. the activity of a certain set of genes), without modifications to the genetic material. The term epigenetics comes from the prefix “epi” in Greek that literally means “on top of” or “in addition to”, and thus, epigenetics refers to a mechanism that acts on top of the classical inheritance of genetic material, the DNA. Epigenetics works by marking or flagging genes, which results in the heritable turning on, or turning off of the activity of that gene. Examples of epigenetic modifications are DNA cytosine methylation (Figure 1) and histone post-transcriptional-modifications (PTMs). Thus, the identity of a cell is determined by the selective cell type-specific activation of subsets of the genes, and these differences in activities are caused by differential epigenetic flagging of the DNA or the chromatin. Therefore, an in depth understanding of epigenetic mechanisms is essential to understand how different cell types arise and how complex multicellular organisms develop from a single fertilized oocyte.



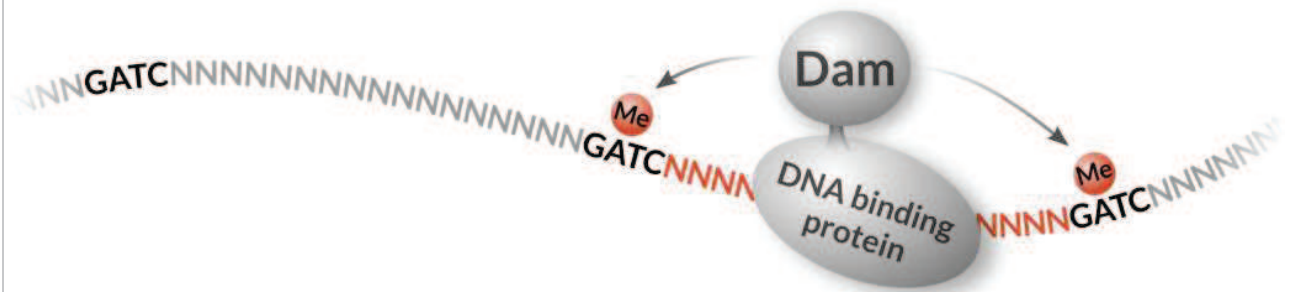
**Figure 1:** Example of the epigenetic switching on (top) or off (bottom) of DNA. Blue: histones; red: DNA cytosine methylation.

Epigenetics is an actively studied research field, which resulted in extensive knowledge of the epigenetic mechanisms that are involved in the specification of cells starting from 4.5 days post fertilization. The reason for this is, that at this stage of development, embryonic stem (ES) cells can be derived from the inner-cell-mass of the blastocyst. Stem cells can be grown in culture, easily expanded to large numbers and differentiated in all the different cell-types of the embryo proper.

The work on ES cells have provided invaluable information in the epigenetic mechanisms involved in cellular specification of cells starting with the implantation of the embryo in the uterus (post implantation embryo), however, on the other hand, we do know very little of the epigenetic mechanisms preceding implantation of the embryo (pre-implantation embryo).

From primarily microscopy based studies, we know that epigenetics is profoundly different in pre-implantation embryos compared to post-implantation embryos. These differences in epigenetics are likely to reflect the differences in differentiation potential between ES cells and pre-implantation cells. While ES cells are capable of differentiating into all cell types of the embryo proper (this is called pluripotent), the zygote (fertilized oocyte) and the 2-cell stage embryo are able to generate all embryonic tissues, including extra-embryonic tissues such as the placenta (this is called totipotent). Therefore, epigenetic understanding of preimplantation development will likely provide novel insights into the molecular concept behind cellular plasticity, differentiation and reprogramming. In particular, epigenetic knowledge of pre-implantation development, will likely identify epigenetic barriers that currently obstruct efficient cellular reprogramming via somatic cell nuclear transfers, which will be key in unlocking the full potential of stem cell and tissue regenerative strategies.

Up to date, detailed information is lacking because state-of-the-art techniques are insufficient to extract information from the limiting cell material that can be obtained from pre-implantation embryos. Thus, to obtain in dept knowledge in the epigenetic mechanisms behind cellular decision-making in pre-development, it is essential to apply and develop tools to study epigenetics at the single-cell level. In our lab, we have recently developed the first single-cell method to study epigenetics genome-wide at high resolution. This method is based on the DamID technique. DamID is based on DNA adenine methylation of a fusion protein of *E. coli* DNA adenine methyltransferase (Dam) and a protein of interest (POI). DamID can be thought of as a molecular stamping mechanism where the Dam-enzyme leaves a “stamp” on those genes to which the POI is bound (Figure 2). The stamp comes in the form of a methyl group that is placed on the adenine position in the DNA, a DNA mark that is normally not found in higher eukaryotes. Next, those adenine-methyl marked genes are specifically amplified followed by next-generation sequencing which will then reveal the places on the DNA to which the POI is bound. By fusing Dam to different proteins (e.g. various DNA and chromatin binding proteins), this technique can be used to determine the epigenetic binding maps of many different epigenetic components.



**Figure 2:** The principle of the DamID technique. The Dam enzyme will place a methyl group (orange circles) on adenines in DNA in close vicinity to the DNA binding-site of the POI (here a DNA binding protein).

This approach is especially powerful for measuring epigenetics in single cells because it involves minimal sample handling (no loss of material due to pipetting), and the procedure is performed in very small reaction volumes. This makes DamID an ideal technique to study epigenetics in pre-implantation development. For this project, we plan to apply the DamID technique, to take various

epigenetic measurements of all the stages of pre-implantation development. **The overall aim of this project is to obtain basic knowledge on the epigenetic mechanisms that underlie cellular specification during pre-implantation development.**

---

### 3.2 Purpose

---

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

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

The main objective of this project is to deepen our understanding of the epigenetic mechanisms behind the first cell-fate decisions during preimplantation development of the mouse. To reach this goal we follow a straightforward research strategy that is described in detail under 3.4.1. The project involves four inter-related sub-goals each contributing to the main objective.

1. Test and optimize DamID in ES cells (no animal experiment)
2. Identify the epigenetic players that direct cell-fate decisions during the first four cleavage stages of pre-implantation development → via mRNA injections
3. Obtain more detailed insight in the role of several key epigenetic players in driving cell-fate allocation at all stages of preimplantation development → via generation of GMM
4. Identify genomic regions and genes that are involved in the first lineage specification events during preimplantation development → via manipulation with CRISPR/Cas9

There are several reasons why we are confident that we can achieve our aim:

Our group is embedded in a research institute that is a center-of-excellence on developmental biology, and stem cell research. The Hubrecht Institute provides core facilities for various high-end techniques such as, high throughput sequencing, histology, fluorescent imaging, flow cytometry and a single-cell sequencing facility. Within our research institute there are many groups that have a lot of experience with performing mouse experiments and the animal facility is operated by a highly dedicated staff that monitors the regular housing of the animals and support and counsels the scientist in their experiments. This environment ensures that animal experiments are performed, and scientist are trained, in accordance with the highest standards.

Furthermore, the single-cell techniques required to achieve our aim are developed by us and we are therefore ideally positioned to cope with any technical difficulties that may arise during the different stages of the project.

Part of the research described here was included in research proposals that were reviewed by experts in the field and granted for funding (ERC starting, NWO/ALW Open and NWO/ALW Vidi grants).

Our embedment in an excellent scientific environment, our unique techniques and approaches, and our previous achievement makes it very likely that with the experiments described in this project we will make large contributions to our main research question.

---

### 3.3 Relevance

---

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

To understand how heterogeneity in gene-expression arises it is pivotal to study the underlying

---



heterogeneity in the epigenome through the development of novel single-cell techniques. The application of these methods to study lineage specification and totipotency in preimplantation development will provide basic insight in the molecular mechanisms behind cellular specification. Although, not within the scope of this proposal, insight in the epigenetic mechanism of cellular specification during early embryogenesis, will also contribute to the development of more efficient re-generative strategies, such as the more efficient production of induced pluripotent (or totipotent) stem cells. Moreover, the establishment of novel techniques to study single-cell epigenetics will provide a very powerful new tool set for the scientific community to study biological processes that involve limiting cell material, rare cell types and/or heterogeneous cell population that e.g. arise during tumorigenesis.

### 3.4 Research strategy

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

The main aim of the proposal is to deepen our understanding of the epigenetic mechanism behind early cell-fate decisions in embryonic development. To this end we have designed an experimental strategy that will follow a simple basic outline (see figure 3).

All projects will follow the same basic workflow which correspond to the subgoals of section 3.2.

- 1) Test and optimize DamID in standard ES cell lines
- 2) Take epigenetic measurements of the first four cleavage stages via mRNA injections in the zygote
- 3) Take epigenetic measurements of all stages via the generation of GMM expressing DamID constructs
- 4) Validate the results ex vivo through CRISPR/Cas9 manipulation

The considerations of the choices will be explained in more detail below.

#### **1) Test and optimize DamID in ES cells (no animal experiment)**

First, we will optimize different Dam-POI constructs to measure various epigenetic features in mES cells. Next, we will test for the sensitivity of the DamID constructs in capturing the desired genomic targets in single cells. The latter involves optimizing the expression levels of the constructs and possible changing the affinity of the constructs for their targets. These experiments will be performed in standard mES cell lines. Only after having established the optimal conditions for DamID in mES cells, we will continue with the successful constructs to step 2 (see below).

#### **2) Take epigenetic measurements of the first four cleavage stages via mRNA injections**

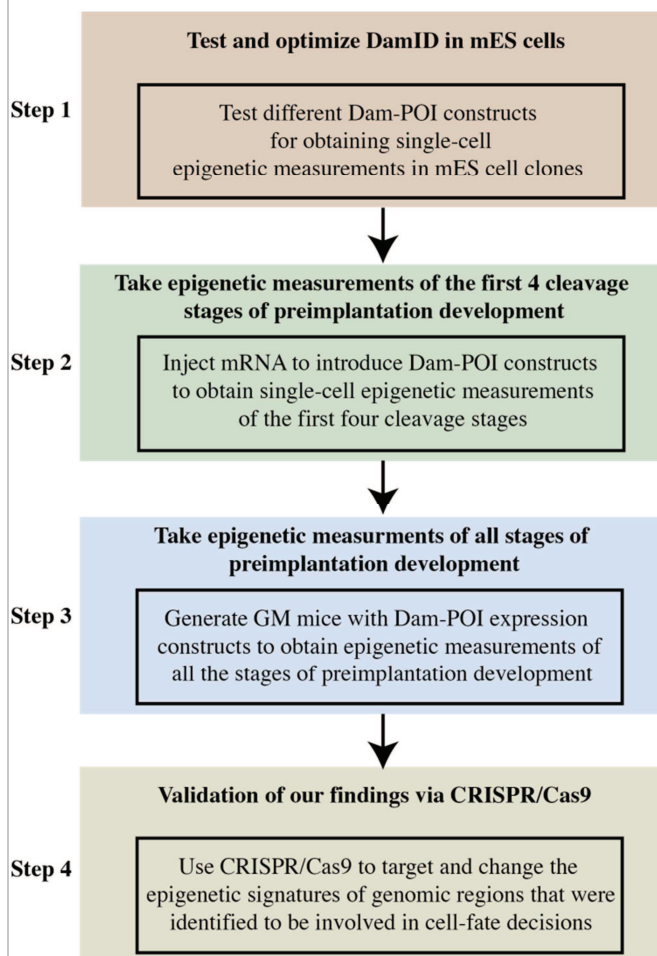
The successful DamID-constructs that emanate from the optimization process in mES cells, will be used to obtain epigenetic measurements of the first four cleavage stages of preimplantation development. In order to obtain epigenetic measurements via DamID, the Dam-POI constructs need to be introduced in oocytes and zygotes obtained from wildtype mothers. The introduction of the Dam-POI constructs will proceed via mRNA injections. The mRNA will be translated in the cell to produce a functional Dam-POI fusion protein. Next, the Dam-POI protein will mark the DNA at genomic sites in correspondence with the DNA-binding preferences of the POI (Figure 2). The oocytes and zygotes will be obtained from mothers after superovulation and mating (see appendix 3.4.4.1). The zygotes are cultured and injected with mRNA ex vivo. Because mRNA levels will decrease with consecutive cleavages due to degradation and dilution, it is only possible to obtain DamID measurements with this method until the 8-cell stage. To obtain measurement beyond the 8-

cell stage, we need to generate GMM carrying DamID expression constructs (step 3). (Animal experiment type 3.4.4.1). For the testing phase of these experiments we will choose a mouse strain that produces high numbers of eggs upon superovulation. For the data-collection phase of the experiment we will use a hybrid mouse background in order to determine allele-specific epigenetic differences based on single-nucleotide-polymorphisms (SNPs).

### 3) Take epigenetic measurements of all stages via the generation of GMM expressing DamID constructs

To obtain single-cell measurements of all stages of preimplantation development we will generate GM mice that carry a DamID expression cassette (see appendix 3.4.4.2). We do not expect that the DamID expression cassette will affect the phenotype of the mouse and we do not plan to perform mouse experiments that will have an adverse effect on the phenotype of the mouse. The decision to generate GMM always follows after completion of step 2. Only those epigenetic DamID constructs that show most promise and appear to be involved in directing cell-fate decisions during the first four cleavage stages of preimplantation development, will be continued for obtaining single-cell measurements beyond the 8-cell stage. To optimize the DamID measurements (e.g. the duration of induction) we first plan to establish organoid cultures of the GMM mice. These organoids can be

maintained and expanded as tissue culture lines and thus provide a valuable source to optimize the procedure before we start obtaining measurements in preimplantation development. The single-cell DamID experiments in preimplantation development will follow the same procedure as described for step 2 with the exception that there will be no DamID mRNA injections involved. (Animal experiment type 3.4.4.2). The regulation of gene-expression via epigenetics is common for all cellular processes in embryo and adult mice. The generation of these GM mice will be a valuable asset to a broad scientific community to study epigenetic mechanisms in many different research fields. The mouse model will be designed such that the epigenetics can be studied in all cells of the mouse independent of the cellular origin.



### 4) Validate the results ex vivo through CRISPR/Cas9 manipulation

We plan to validate our DamID results through manipulations by employing the CRISPR/Cas9 system. To validate our findings from step 3, we plan to change the epigenetic signatures of those genomic regions

**Figure 3:** flowchart describing the research strategy

that we find involved in the first lineage specification events, to see whether we can manipulate cell fate decisions during preimplantation development. Such candidate genomic regions, can comprise of genes or non-coding regulatory sequences (e.g. enhancers) or a combination of both. Targeted changes of epigenetic signatures of candidate genomic regions will proceed via the expression of epigenetic enzymes coupled to enzymatically inactive Cas9. Next, Cas9 will direct these epigenetic enzymes to genomic locations of interest via co-injections of specific guide RNAs. These experiments involve ex vivo injections of the CRISPR/Cas9 system in zygotes of the GMM of step 3. Like for step 3, we plan to first test and optimize the CRISPR/Cas9 approach in organoid cultures derived from the GMM. The CRISPR/Cas9 injected embryos will not be used for the generation of GMM. (Animal experiment type 3.4.4.1).

---

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

---

The mouse experiments involved for every step are described in appendix 3.4.4.1 and 3.4.4.2.

To decide to perform an animal experiment is based on two choices:

- A) The technical quality of the DamID data
- B) How insightful the data is in pre-implantation development

I will explain the considerations of the choices to perform animal experiments for every subgoal separately.

### **1: Test and optimize DamID in ES cells**

Not every Dam-POI construct provides high quality data. This depends on the variables:

- 1: interference between Dam and the POI
- 2: expression level of the Dam-POI
- 3: prevalence of the epigenetic mark in the genome
- 4: width of the epigenetic domain

In ES cells the different Dam-POI fusion proteins will be optimized based on these four variables. To decide whether the technical quality of a Dam-POI is sufficient to perform mRNA injections (described under 3.4.4.1) the data will be compared to epigenetic data obtained with an alternative method (chromatin-immuno-precipitation (ChIP) at ENSEMBL). If DamID and ChIP show sufficient correspondence in binding profiles, we will continue with the mRNA injection of the Dam-POI in oocytes and zygotes. The experiments described under step 1 do not involve animal experiments.

### **2: Take epigenetic measurements of the first four cleavage stages via mRNA injections**

For step 2, to decide whether the data quality is sufficient we will compare the data quality obtained in the 8-cell embryo to the data obtained in step 1 with ES cells. Obtain DamID data from the 8-cell stage embryo involves mRNA injections in the zygote (described under 3.4.4.1). We will look at 8-cell embryo first because 1) it is closest to the ES cell stage and 2) we can obtain most material from a single oocyte donor. If the data quality looks similar to the ES data generated at step 1, we will continue measuring epigenetics with this DamID construct in the oocyte, zygote 2- and 4-cell stage of pre-implantation development (described under 3.4.4.1). The decision to continue to generate GMM of step 3 described under protocol 3.4.4.2. depends on whether the obtained epigenetic data is insightful. Data is insightful when differences in epigenetic modifications are

observed in genomic regions or genes involved in cell-fate decisions. E.g. if at the 8-cell stage differences between the individual cells become apparent that are found in regions or genes that are specific for either the ICM or the trophoctoderm (extra embryonic tissue). To track these regions beyond the 8-cell stage up until the blastocyst stage, mRNA injections are insufficient. For this, we will continue by generating GMM as described in 3.4.4.2.

### **3: Take epigenetic measurements of all pre-implantation stages via the generation of GMM expressing DamID constructs**

This step requires the generation of a GMM to express Dam-POI constructs (described in 3.4.4.2) and the collection of oocytes and zygotes from the mothers of these GM mice (described in 3.4.4.1). The zygotes will then be cultured *ex vivo* to the blastocyst stage. Here we will again determine whether the data quality is sufficient based on the aforementioned criteria. Epigenetic regions that are found most closely associated with regions and/or genes involved in driving cell fate decisions (see also step 2) will be selected for validation as described in step 4. The criteria for selecting a genomic region for CRISPR/Cas9 epigenetic editing are 1) these regions should differ in epigenetic markings between the cell types of the blastocyst and 2) those regions should show differences at earlier stages of pre-implantation development and could thus be considered potential master regulator sites. For optimization of the DamID measurements, we will need to kill one GM mice for each Dam-POI construct to obtain tissue for organoid cultures.

### **4: Validate the results *ex vivo* through CRISPR/Cas9 manipulation**

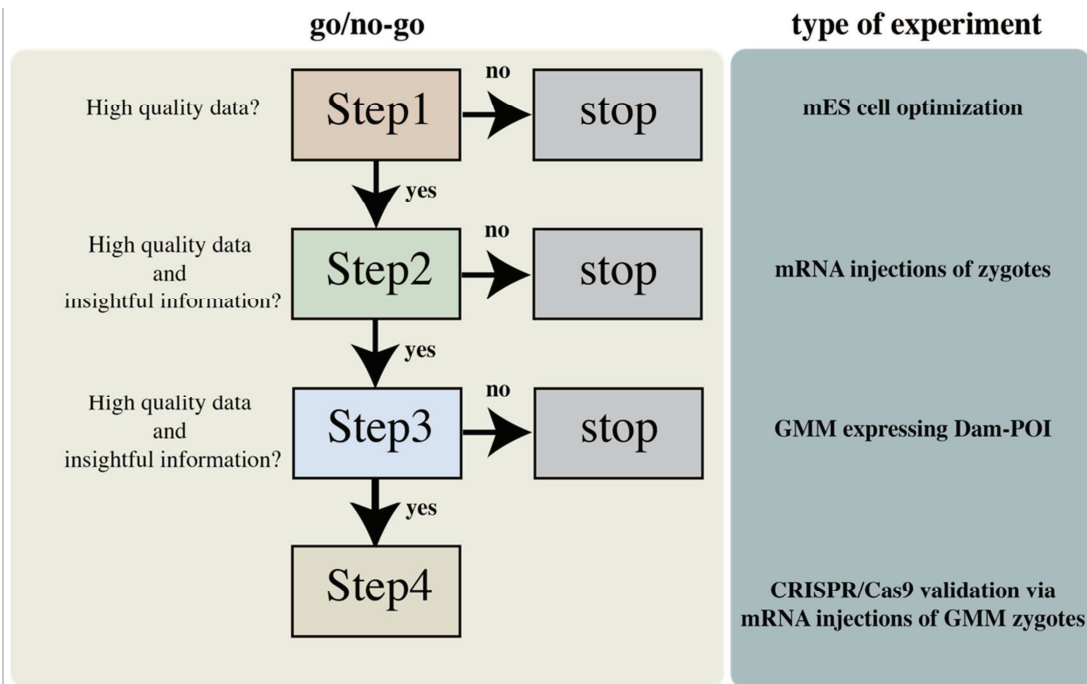
This step requires *ex vivo* CRISPR/Cas9 mRNA injections of oocytes or zygotes obtained from the GMM mothers from step 3. Injections are described under protocol 3.4.4.1. Also these zygotes will then be cultured *ex vivo* to the blastocyst stage. The optimization and testing of the CRISPR/Cas9 technique will be performed on the organoid cultures obtained for step 3 and does not require additional mice.

---

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

For the different steps of the projects see 3.4.1. All projects follow the same trajectory, and we will only pursue with the most insightful projects to steps 2, 3 and 4. For every experiment, we design the experiment with clear go-no-go decisions (see figure 4). The first milestones can be tested in mES cells. The first mile stone involves testing whether the single-cell experiments provide sufficient signal-over-noise levels and measurements that are comparable to patterns obtained in population studies that match what is described in literature. The second milestone will involve testing whether the mRNA injections in oocytes and zygotes reflects the patterns obtained with injections in mES cells. Only if the quality criteria of steps 1 and 2 are met, we will consider generating GMM.

---



**Figure 4:** flowchart describing the go/no go points for all steps of the project.

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

Serial number	Type of animal procedure
1	Collection of zygotes and oocytes from wildtype and GMM female donors
2	Generation of Genetically Modified Mice
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 80100-KNAW
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen [REDACTED]
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.  
*Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*
- | Serial number | Type of animal procedure  |
|---------------|---|
| 3.4.4.1       | Collection of zygotes and oocytes from wildtype and GMM female donors |

#### 2 Description of animal procedures

##### A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

Our aim is to obtain different epigenetic measurement at different stages of preimplantation development. Insight in preimplantation development can only be obtained through the use of mouse models. The choice of the genomics technique to be applied in preimplantation development will be preceded by thorough trials in cell culture of mES cells and organoids (see below)

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

Superovulation.

- Administration of gonadotropin's (2 times) by subcutaneous or intraperitoneal injections followed by mating. Males are used from the colony of the research institute.
- Pregnant mothers will be killed for the isolation of oocytes, zygotes or tissue for organoid cultures.

Animals are killed by CO2/O2 method.

For this appendix, we will not use mice with harmful phenotypes.

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

The number of pregnant mothers required for each epigenetic DamID measurement will be determined based on test experiments in mES and organoid cultures. To this end, experiments will be designed with dilution series of mES cells up to the technical and biological variability which will be different for the measurements of every new epigenetic measurement. In order to keep the technical variability to a minimum, the experiments will first be optimized in mES and organoid cultures. This involves tuning the expression levels and determining the duration of induction of the Dam-POI constructs. To obtain an estimate of the biological variation, we plan to first perform a pilot experiment in 8-cell stage embryos. 8-cell stage embryos are chosen because the biological variation is likely the highest at this stage and because this requires the least number of zygote donors (1 mother =  $10 \times 8 = 80$  8-cell stage cells). The DamID procedure has proven to be efficient to collect single-cell measurements at the first four cleavage stages in pilot experiments that were performed previously.

## **B. The animals**

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

Mus musculus: genetically modified and wild type adult mice. All vasectomized males which will be obtained from a registered commercial company, all other mice are obtained from our own Institute, a NVWA-licensed breeder, or from a registered commercial company.

All animal studies in this project will exclusively involve mice. Up to today, there are no alternative methods to study epigenetics in preimplantation embryos. For the majority of the proposed studies, the mouse is the most appropriate animal model because: (1) like humans, mice are mammals; (2) physiology is more extensively characterized; (3) mice are amenable to transgenic modification; (4) a broad collection of preimplantation genome-wide datasets exist for comparative studies.

### **Wildtype female donors**

For the type of experiments described in this procedure, it is difficult to calculate the exact number of animals, since for various experimental setups different numbers of female donors are required, and the variation and outcome of the experiments are unknown. Also, the nature of the DamID-constructs determines the number of samples required per project, which can differ substantially. Based on previously performed pilot experiments, we had to generate 400 single-cell profiles of the first four cleavage stages and oocytes of preimplantation development to obtain enough power to reach significant conclusions. Including the embryos that do not properly develop ex-vivo, the number comes down to ~750 embryos per set-up (400 oocytes, 200 2-cell stage, 100 4-cell stage and 50 8-cell stage), which translates into ~75 zygote donors. In the next five years, we plan to conduct approximately 50 different epigenetic set-ups (in our pipeline we can process 10 epigenetic measurements per year) which translates into maximal 37.500 embryos obtained from **3750 female donors**.

### **GM female donors to obtain epigenetic measurements**

For this experiment, we plan to obtain epigenetic measurements of all stages of preimplantation development not just of the first four cleavage stages as described above. To obtain 400 single-cell measurements of all stages until the 64-cell stages we will also require 50 female GM mice. We plan to generate 10 GMM, thus we estimate to require a maximum of **500 female GM donors**. We plan to grow organoid cultures of the female donors that are killed for zygote or oocyte collection. This requires no additional mice.

### **GM female donors for validation by CRISPR/Cas9**

For the validation, we expect to manipulate 2-4 genomic regions for all 10 GMM. The read-out of

the experiments will be the same as above and will be performed at the same developmental stages as described for the wildtype female donors. Thus, for 4 CRISPR/Cas9 experiments per embryonic stage, per GMM we expect to require a maximum of 4 (CRISPR/Cas9 experiments) \* 50 (female donors) \* 10 (GMM) = **2000 GM female donors** for the validation experiments. The CRISPR/Cas9 injected embryos will not be used for the generation of GMM.

### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

### D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement:

No cell culture systems exist to study developmental stages before the blastocyst. Also, the Animal studies are unavoidable if we seek comprehensive insight in the epigenetic mechanisms behind cell-fate decisions in preimplantation development.

Reduction:

Prior to obtaining epigenetic measurements in preimplantation development, we will first test the new Dam-ID constructs in mES cells or organoid systems. Only after passing strict selection criteria (signal over noise, reproducibility and applicability to small cell numbers), we will proceed to produce epigenetic measurements in preimplantation development. To test for technical and biological variation pilot experiments will be performed at the 8-cell stage of preimplantation development. At the 8-cell stage, 1 zygote donor (maximum of 160 cells) should be sufficient to get a good estimate of the total number of embryos required for the experiment.

Refinement:

All animal studies in this project will exclusively involve mice. Up to today, there are no alternative methods to study epigenetics in preimplantation embryos. For the majority of the proposed studies, the mouse is the most appropriate animal model because: (1) like humans, mice are mammals; (2) physiology is more extensively characterized; (3) mice are amenable to transgenic modification; (4) a large number of relevant transgenic and knock out lines are already available; (5) a broad collection of preimplantation genome-wide datasets exist for comparative studies.

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

All possibilities to reduce pain, fear or suffering will be used. There are no negative environmental effects.

## Repetition and duplication

### E. Repetition



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

The experiments in this project are not carried out due to legal requirements.

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

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

No

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

### G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

### I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

We don't expect to find other adverse effect. Action will be taken immediately if unexpectedly any adverse effect will show up.

Explain why these effects may emerge.

Not expected

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

Daily monitoring of the mice ensures early detection of discomfort after which immediate action will be undertaken to reduce or relief the discomfort.

### J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

Indicate the likely incidence.

### **K. Classification of severity of procedures**

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

Moderate discomfort is caused by the induction of superovulation and mating with a relative large male. 100% moderate

## **End of experiment**

### **L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

All animals are killed to obtain oocytes and early embryos for ex vivo analyses. Animals are killed by CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> method.

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

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

Yes



## Appendix

### Description animal procedures

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

#### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 80100-KNAW
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen [REDACTED]
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.  
*Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*
- | Serial number | Type of animal procedure                      |
|---------------|---|
| 3.4.4.2       | Generation of genetically modified mice (GMM) |

#### 2 Description of animal procedures

##### A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

Creation of GM mice via DNA/RNA injection into oocyte, injection of genetically modified ES cells into blastocysts and/or via the CRISPR/Cas9 system. The GM mice will be used to generate epigenetic profiles in pre-implantation development through the generation of Dam-POI expressing GM mice (see project proposal 3.4.1).

Welfare assessment will proceed according to the Consensus document on genetically altered animals (<https://www.centralecommissiedierproeven.nl/actueel/nieuws/16/10/13/handreiking-genetisch-gewijzigde-dieren>). Newly created transgenic lines generated via classical methods and/or novel combinations of these aforementioned lines will be monitored for 2 generations to determine the absence or presence of a harmful phenotype with constitutional discomfort. We will daily check the mice on several parameters like overall appearance, size, growth, coat conditions and clinical signs. We will not continue to work with, or use mice with harmful phenotypes.

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

Generation of new lines:

1) Superovulation.

a) Administration of gonadotropin's (2 times) by subcutaneous or intraperitoneal injections followed by mating.

b) Animals will be killed for the isolation of early embryos.

2) Embryo recipients.

a) Recipients for embryo transfer will be rendered pseudo-pregnant by mating with a sterile (vasectomized) male.

b) Genetically modified embryos will be implanted surgically or non-surgically into the reproductive tract.

c) Embryo recipients, not as part of an experiment, will be killed after weaning of the pups at three weeks of age.

3) Weaned pups at 3 weeks of age: Tissue sampling for genotyping and/or identification via tail and ear-cut, respectively, under anesthesia (isoflurane).

Welfare assessment:

We daily check the mice on several parameters (overall appearance, size, confirmation and growth, coat condition, behavior, clinical signs, relative size and numbers) as has been described in the Directive 2010/63/EU: corrigendum of 24 Jan. 2013. These animals are not part of the license.

Breeding genetically modified mice:

Mice will be housed under normal conditions with free access to food and water. Start breeding with a minimum of 8 weeks old mice. Breeding will be retaining for a maximum of 6 months.

These animals are part of the license.

Killing animals:

In case of discomfort or surplus animals (mice who don't have the right genotype), animals will be euthanized by CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> method or by isoflurane and will be confirmed by cervical dislocation.

---

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

Statistical analysis doesn't play a role for these types of experiments. We will use state of the art techniques. All techniques are proven to be effective in generating GM mice with a minimum number of mice possible.

---

## **B. The animals**

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

Mus musculus: genetically modified and wild type adult mice. All vasectomized males which will be obtained from a registered commercial company, all other mice are obtained from our own Institute, an establishment licensed breeder by the NVWA, or from a registered commercial company.

Generation of GG mice: we expect to generate max. 10 new lines over the next 5 years. For the creation of a new GM mouse line we will use on average max. 150 mice (according to the besluit biotechnologie). Therefore, in total max. **1500 mice**.

---

## **C. Re-use**

Will the animals be re-used?

---

No, continue with question D.

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

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

No

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

#### **D. Replacement, reduction, refinement**

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

Before we consider the generation of a new GM mice, we will first conduct an extensive literature search to exclude the possibility that the GM mouse already exists. Then, before we generate the GMM, we will extensively analyze cell lines, and/or organoids (see project proposal). Only if the in vitro experiments provide sufficient information that our techniques will significantly contribute to the research question/hypothesis, we will consider the generation of a novel GM mice.

Animal studies are unavoidable if we seek comprehensive insight in the epigenetic mechanisms behind cell-fate decisions in preimplantation development.

mRNA injections in oocytes and zygotes to introduce the expression constructs makes the generation of GM mice superfluous. Only when the research question requires tracing cells up to the blastocyst stage, GM mice are required. This strongly reduce the number of mice used for the generation and/or breeding of GM mice.

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

All possibilities to reduce pain, fear or suffering will be used. There are no negative environmental effects; all mice will be housed under strict D1 conditions

### **Repetition and duplication**

#### **E. Repetition**

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

The experiments in this project are not carried out due to legal requirements.

### **Accommodation and care**

#### **F. Accommodation and care**

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

No

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

#### **G. Location where the animals procedures are performed**

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

### I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

We don't expect to find other adverse effect. Action will be taken immediately if unexpectedly any adverse effect will show up.

Explain why these effects may emerge.

We don't expect to find other adverse effect

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

Daily monitoring of the mice combined with an experimental design aiming at reducing the discomfort of the animals.

### J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

Indicate the likely incidence.

### K. Classification of severity of procedures

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

Donors: moderate 100%

Fosters: moderate 100%

For monitoring of the mice, we do not expect above threshold discomfort. We will not generate or use mice with harmful

## End of experiment

### L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

The donor females will be killed as part of the experiments. The foster females will be killed after the experiment (at weaning of the pups)

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

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

Yes

## Overzicht aantal dieren voor AVD 80100 2016 728

## Appendix 3.4.4.1

3.4.4.1a	WT female donors:	3750	moderate discomfort
3.4.4.1b	GM female donors	500	moderate discomfort
3.4.4.1c	GM female donors for validation	2000	moderate discomfort

## Appendix 3.4.4.2

3.4.4.2	Generation of GMM lines	1500	moderate discomfort
---------	-------------------------	------	---------------------

Total 7750 mice –adult – 100% moderate discomfort





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Kon. Ned. Academie van Wetenschappen (KNAW)

Postbus 19121

1000 GC AMSTERDAM



**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  
AVD801002016728

**Bijlagen**

2

Datum 22 maart 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 22 maart 2017. Het gaat om uw project "Single-cell quantification of the regulation of gene expression in the first stages of early embryonic development". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD801002016728. 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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

**Datum:**

22 maart 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD801002016728

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

**Datum:**  
22 maart 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD801002016728

### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 80100  
Naam instelling of organisatie: Kon. Ned. Academie van Wetenschappen (KNAW)  
Naam portefeuillehouder of  
diens gemachtigde: ██████████  
KvK-nummer: 54667089  
Postbus: 19121  
Postcode en plaats: 1000 GC AMSTERDAM  
IBAN: NL47DEUT0436465302

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: ██████████  
Functie: Groepsleider  
Afdeling: ██████████  
Telefoonnummer: ██████████  
E-mailadres: ██████████

**Over uw aanvraag**

Wat voor aanvraag doet u?

- Nieuwe aanvraag  
 Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn  
 Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

**Datum:**

22 maart 2017

**Aanvraagnummer:**

1001002016728

**Over uw project**

Geplande startdatum:

15 april 2017

Geplande einddatum:

15 april 2022

Titel project:

Single-cell quantification of the regulation of gene expression in the first stages of early embryonic development

Titel niet-technische samenvatting:

Het begrijpen hoe een totipotente cel ontstaat en hoe de eerste celtype-specifieke beslissingen worden genomen kort na bevruchting van de eicel

Naam DEC:

DEC-KNAW

Postadres DEC:

[REDACTED]

E-mailadres DEC:

[REDACTED]

**Betaalgegevens**

De leges bedragen:

€ 1.287,-

De leges voldoet u:

na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

Verplichte bijlagen:

- Projectvoorstel  
 Beschrijving Dierproeven  
 Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

- DEC-advies

**Ondertekening**

Naam:

[REDACTED]

Functie:

[REDACTED]

Plaats:

Amsterdam

Datum:

18 maart 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Kon. Ned. Academie van Wetenschappen (KNAW)

Postbus 19121

1000 GC AMSTERDAM



**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  
AVD801002016728

**Bijlagen**

2

Datum 22 maart 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 22 maart 2017

Vervaldatum: 21 april 2017

Factuurnummer: 170728

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD801002016728	€ 1.287,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL29INGB 070.500.1512 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.

Info-zbo (extern)

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** vrijdag 31 maart 2017 16:09  
**Aan:** [REDACTED]  
**CC:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** aanvullende informatie AVD801002016728  
**Bijlagen:** Aanvullende informatie AVD801002016728.pdf

Geachte [REDACTED],

Op 22 maart 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Single-cell quantification of the regulation of gene expression in the first stages of early embryonic development." met aanvraagnummer AVD801002016728. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In de bijgaande brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Om uw aanvraag in de eerstvolgende CCD vergadering te kunnen bespreken ontvangen we uw reactie graag uiterlijk donderdag 6 april 2017.

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]  
*Uitvoeringsexpert*

**Centrale Commissie Dierproeven** [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

**T: 0900 2800028**

**E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)**



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

KNAW  
t.a.v. [REDACTED]  
Postbus 19121  
1000GC Amsterdam  


**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  
AVD801002016728

Datum 31 maart 2017  
Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

**Bijlagen**  
1

Geachte [REDACTED],

Op 22 maart 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Single-cell quantification of the regulation of gene expression in the first stages of early embryonic development." met aanvraagnummer AVD801002016728. 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) U geeft in de bijlagen dierproeven aan gesteriliseerde mannelijke muizen bij een commerciële leverancier te willen bestellen. Worden deze muizen speciaal op uw verzoek gesteriliseerd? Onder welke vergunning worden deze muizen gesteriliseerd?

Indien de operatie op verzoek van u wordt uitgevoerd zouden deze muizen onder deze vergunning vallen en dan moeten ze in de huidige aanvraag worden mee gerekend.

**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. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn 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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

**Datum**

31 maart 2017

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVD801002016728

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](http://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.*

<input type="checkbox"/>	
<input type="checkbox"/>	
<input type="checkbox"/>	

### 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		

Info-zbo (zbo)

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** vrijdag 31 maart 2017 16:14  
**Aan:** [redacted]  
**Onderwerp:** ter info: aanvullende informatie AVD801002016728

Geachte [redacted],

Op 22 maart 2017 heeft DEC KNAW advies uitgebracht op een projectaanvraag met titel 'Single-cell quantification of the regulation of gene expression in the first stages of early embryonic development' en aanvraagnummer AVD801002016728.

De volgende vraag is aan de aanvrager voorgelegd:

1) U geeft in de bijlagen dierproeven aan gesteriliseerde mannelijke muizen bij een commerciële leverancier te willen bestellen. Worden deze muizen speciaal op uw verzoek gesteriliseerd? Onder welke vergunning worden deze muizen gesteriliseerd?

Indien de operatie op verzoek van u wordt uitgevoerd zouden deze muizen onder deze vergunning vallen en dan moeten ze in de huidige aanvraag worden mee gerekend.

Indien u hierop wil reageren horen we het graag uiterlijk donderdag, 6 april 2017.

Met vriendelijke groet,

[redacted]  
*Uitvoeringsexpert*

**Centrale Commissie Dierproeven [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)**

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

.....  
**T: 0900 2800028**

**E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)**

Verzoek tot aanvullende informatie: AVD 80100 2016 728  
Datum 31 maart 2017

5 April 2017

Vraag 1) U geeft in de bijlagen dierproeven aan gesteriliseerde mannelijke muizen bij een commerciële leverancier te willen bestellen. Worden deze muizen speciaal op uw verzoek gesteriliseerd? Onder welke vergunning worden deze muizen gesteriliseerd? Indien de operatie op verzoek van u wordt uitgevoerd zouden deze muizen onder deze vergunning vallen en dan moeten ze in de huidige aanvraag worden mee gerekend.

Antwoord verantwoordelijk onderzoeker:

De gevastomeerde dieren zijn commercieel verkrijgbaar en worden niet speciaal op verzoek gesteriliseerd. Deze dieren worden voor meerdere experimenten binnen het instituut gebruikt tot hun gewicht te hoog is, wat tot ongewenst ongerief kan leiden bij de fosters. De sterilisatie van de muizen valt binnen de vergunning van de leverancier (Charles River).

Ik hoop dat we u hiervan van de gevraagde informatie hebben voorzien.

Met vriendelijke groeten mede namens de verantwoordelijk onderzoeker,

██████████  
Secretaris DEC-KNAW

# Format DEC-advies

---

*Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de Praktische Handreiking: Ethisch Toetsingskader voor proefdiergebruik. Voor voorbeelden, zie bijlage I.*

*Herhaling van antwoorden is niet nodig. Indien van toepassing kan verwezen worden naar een bij een eerdere vraag verstrekt antwoord.*

## A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: **AVD80100 2016 728**
2. Titel van het project: **Single-cell quantification of the regulation of gene expression in the first stages of early embryonic development**
3. Titel van de NTS: **Het begrijpen hoe een totipotente cel ontstaat en hoe de eerste celtype-specifieke beslissingen worden genomen kort na bevruchting van de eicel**
4. Type aanvraag:
  - nieuwe aanvraag projectvergunning**
  - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
  - naam DEC: **KNAW**
  - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
  - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
  - ontvangen door DEC: **15-02-2017**
  - aanvraag compleet: **08-03-2017**
  - in vergadering besproken: **23-02-2017**
  - anderszins behandeld: **niet van toepassing**
  - termijnonderbreking(en) van **24-02-2017** tot **08-03-2017**
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: **niet van toepassing**
  - aanpassing aanvraag: **finale herziene versie ontvangen op 08-03-2017**
  - advies aan CCD: **22-03-2017**
7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.  
**De IvD geeft aan dat de aanvrager de aanvraag met de IvD heeft afgestemd en dat de aanvraag de instemming heeft van de IvD** [REDACTED]

*Bij de punten 8 t/m 10 kan worden volstaan met 'n.v.t.' wanneer de betreffende acties niet aan de orde zijn geweest. Bij vragen die gericht zijn op het compleet maken van de aanvraag (aanvullingen achtergrond informatie etc) kan bij punten 8 en 9 worden volstaan met de vermelding van het type vragen en de vermelding dat de aanvraag op de desbetreffende onderdelen is aangepast of dat de antwoorden in de aanvraag zijn verwerkt. Bij vragen die gericht zijn op het verkrijgen van verklaringen voor keuzes die door de aanvrager gemaakt worden, kan niet worden volstaan met het weergeven van de strekking van de antwoorden tenzij de antwoorden volledig in de aanvraag zijn opgenomen. Als dat*

*het geval is, moet dat in het DEC advies worden benoemd en in de aanvraag inzichtelijk worden gemaakt.*

8. Eventueel horen van aanvrager:
  - Datum: **23-02-2017**
  - Plaats: **Amsterdam**
  - Aantal aanwezige DEC-leden: **6**
  - Aanwezige (namens) aanvrager: **de aanvrager**
  - Gestelde vraag / vragen: **mondeling gestelde vragen zijn later tevens schriftelijk aan de aanvrager gestuurd**
  - Verstrek(e) antwoord(en): **zie onder vraag 9**
  - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag **wel; zie onder vraag 9**
  
9. Correspondentie met de aanvrager
  - Datum: **24-02-2017**
  - Gestelde vraag/vragen: **Aanvullende vragen ter completering van de aanvraag. De aanvrager gevraagd naar de geschiktheid van de eicellen na gebruik van een superovulatie. Welke muizenstammen worden gebruikt? Wat is het belang van het project voor regeneratieve doeleinden? Mogelijk gebruik van de gegenereerde GM lijnen voor ander onderzoek?**
  - Datum antwoord: **08-03-2017**
  - Verstrek(e) antwoord(en): **De aanvrager heeft de aanvraag gecomplementeerd en de gevraagde aanpassingen doorgevoerd.**
  
  - De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag: **wel**
  
10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): **niet van toepassing**
  - Aard expertise
  - Deskundigheid expert
  - Datum verzoek
  - Strekking van het verzoek
  - Datum expert advies
  - Advies expert

## **B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)**

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is.  
*Indien niet vergunningplichtig, ga verder met onderdeel E. Advies.*  
**Het project is vergunningplichtig.**
  
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag / een wijziging op een bestaande vergunning.  
**Nieuwe aanvraag – Zie A4**
  
3. Is de DEC competent om hierover te adviseren?  
**Ja**
  
4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom.  
**Er zijn geen DEC-leden uitgesloten van de behandeling en het opstellen van het advies.**

## C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft (*Zie handreiking 'Invulling definitie project'; zie bijlage I voor toelichting en voorbeeld*).  
**Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling, te weten: het vergroten van de fundamenteel wetenschappelijke kennis over epigenetische mechanismen betrokken bij de eerste celtype-specifieke beslissingen kort na de eicel bevruchting. De aanvraag is naar de mening van de DEC te typeren als een project. De aanvraag omvat vier verschillende subdoelen of fasen van het project die elk in voldoende mate zijn uitgewerkt. Na een eerste fase waarbij de benodigde assay wordt geoptimaliseerd (geen dierproven) volgen fase 2 (injectie in geïsoleerde zygoten), fase 3 (metingen in transgene dieren) en fase 4 (validatie van de verkregen resultaten). De DEC komt tot de conclusie dat de aanvraag overeen komt met voorbeeld 1 van de handreiking 'Invulling definitie project'. De proeven voor de individuele subdoelen vertonen een logische tijds- en uitkomstafhankelijke opeenvolging en zijn verbonden door duidelijke go/no go momenten. Het bereiken van de subdoelen leidt uiteindelijk tot het bereiken van het hoofddoel. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en dat er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien het bovenstaande komt de DEC tot de conclusie dat de aanvraag voldoende samenhang heeft en daarmee toetsbaar is.**
2. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Wet Natuurbescherming).  
**Dit valt buiten de taakstelling van de DEC als beschreven in artikel 18a.2.b van de Wod. Naar deze specifieke informatie wordt in het aanvraagformulier en de bijbehorende toelichting niet gevraagd en de aanvrager heeft deze informatie dan ook niet verstrekt. Het is voor de DEC daarom niet mogelijk om op dit punt een onderbouwde uitspraak te doen. De DEC wil erop wijzen dat mocht dit in sommige omstandigheden wel het geval zijn dat de CCD in een procedure voorziet waarin de aanvrager inzage krijgt en verweer kan voeren.**
3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel.  
**De doelcategorie sluit aan bij de hoofddoelstelling.**

### **Belangen en waarden**

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C4; zie bijlage I voor voorbeeld*).  
**Het directe doel van het project is het vergroten van de fundamenteel wetenschappelijke kennis over epigenetische mechanismen betrokken bij de eerste celtype-specifieke beslissingen kort na de eicelbevruchting. De nieuwe inzichten zullen ook bijdragen aan het ontwikkelen van efficiëntere regeneratieve strategieën zoals een betere productie van geïnduceerde**

**stamcellen. Daarnaast zullen de nieuwe "single-cell" methoden die in het project worden ontwikkeld andere biologen in staat stellen onderzoek te doen aan biologische processen in kleine heterogene populaties van cellen bijvoorbeeld de subpopulaties cellen die ontstaan tijdens tumorvorming.**

**De DEC is ervan overtuigd dat het doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld. De aanvrager heeft duidelijk gemaakt wat de status van het onderzoeksveld is, wat de bijdrage van het al verrichte werk van de onderzoeksgroep is geweest, en wat de bijdrage van dit project aan het onderzoeksveld naar verwachting zal zijn. Uit de aanvraag blijkt dat de fundamenteel wetenschappelijke kennis over epigenetische mechanismen betrokken bij de eerste celtype-specifieke beslissingen kort na de eicel bevruchting op dit moment nog beperkt is.**

**Het directe wetenschappelijke belang van de resultaten is naar opvatting van de DEC groot. Daarnaast is het reëel te verwachten dat de resultaten ook van groot belang zullen zijn buiten het directe veld van de vroege embryonale ontwikkeling en dat de nieuwe technische analysemethoden een brede toepassing zullen vinden binnen het biologisch onderzoek.**

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld*)
- De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn: (i) de proefdieren, (ii) de betrokken onderzoekers, (iii) doelgroepen in veld van de embryologie en moleculaire biologie en (iv) de doelgroepen in de maatschappij. Naar de opvatting van de DEC zijn de volgende waarden in het geding:**
- i. Waarden voor de proefdieren: De integriteit van de dieren zal worden aangetast. De dieren worden kortdurend beperkt in hun natuurlijk gedrag en zullen ongerief ondervinden. Uiteindelijk zullen ze in het kader van het onderzoek gedood worden. De dieren hebben er belang bij hiervan gevrijwaard te blijven.**
  - ii. Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: De onderzoekers zullen een substantiële toename in kennis en vaardigheden verkrijgen. De carrièremogelijkheden van de onderzoekers zullen verbeteren door publicaties. Ook de kans op het behouden en verkrijgen van nieuwe onderzoeksmogelijkheden, veelal deels gebaseerd op een goede wetenschappelijke reputatie, zal toenemen. Deze waarden zijn naar opvatting van de DEC echter van gering gewicht in de ethische afweging.**
  - iii. Waarden die voor doelgroepen in het veld van de embryologie en moleculaire biologie worden bevorderd zijn: Dit onderzoek is in de eerste plaats fundamenteel van aard. Het zal resulteren in een toename van de kennis over epigenetische mechanismen betrokken bij de eerste celtype-specifieke beslissingen kort na de eicel bevruchting. Deze kennis is ook van belang voor het onderzoek naar regeneratie-therapieën door stamcel-inductie. De in het project ontwikkelde technieken zullen van belang zijn voor andere onderzoekers die epigenetische veranderingen bestuderen in heterogene populaties van cellen bijvoorbeeld in de tumorbiologie.**
  - iv. Waarden die voor doelgroepen in de maatschappij worden bevorderd zijn: Dit onderzoek zal op den duur tot nieuwe inzichten kunnen leiden op basis waarvan nieuwe (stamcel) therapieën kunnen worden geformuleerd of op basis waarvan tumor heterogeniteit en de epigenetische identiteit van metastaserende cellen in kaart kan worden gebracht. Dit zal ertoe leiden dat de kwaliteit van leven voor verschillende patiëntengroepen zal verbeteren.**

6. Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken?

**Nee**

### **Proefopzet en haalbaarheid**

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe. (Zie *Praktische handreiking ETK: Stap 1.C5*).

**De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en de geschikte voorzieningen beschikt om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren. De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager voldoende expertise heeft om gedurende het project te kunnen blijven voldoen aan de 3V's.**

8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe. (Zie *Praktische handreiking ETK: Stap 1.C6*).

**De DEC is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen van het project en bij recente wetenschappelijke inzichten. De DEC acht het reëel om te veronderstellen dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten beschreven in het project, nieuwe en/of aanvullende kennis zal worden verkregen en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak zal leiden tot het behalen van de doelstelling van het project.**

**Tijdens de uitvoering van het project zullen de in de aanvraag beschreven kaders, inclusief de kaders van ongerief, nauwgezet door de IvD bewaakt worden.**

**De keuze van de te gebruiken modellen, de keuze voor de muis als proefdieren en de indeling in de verschillende Type Dierproeven is duidelijk en goed onderbouwd.**

**Daarnaast zijn de gegevens uit het vooronderzoek verkregen in muizen en biedt de continuering van het onderzoek muizen een grotere kans op het behalen van de doelstellingen.**

### **Welzijn dieren**

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor voldoende wetenschappelijk is onderbouwd en of de aanvrager voldoet aan de in de Wet op de Dierproeven (Wod). voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw beoordeling toe (Zie *Praktische handreiking ETK: Stap 1.C1; zie bijlage I voor toelichting en voorbeelden*).

- Bedreigde diersoort(en) (10e, lid 4)
- Niet-menselijke primaten (10e)
- Dieren in/uit het wild (10f)
- Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
- Zwerfdieren (10h)
- Hergebruik (1e, lid 2)
- Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)



- Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
- Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c, lid 3)

**Er is geen sprake van bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.**

10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe.  
**De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn.**
11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*).  
**De DEC heeft zich ervan verzekerd dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen.  
Het ongerief is door de onderzoekers ingeschat als matig ongerief. Voor het merendeel van de dieren wordt het ongerief veroorzaakt door het opwekken van een superovulatie en paring met een relatief groot mannelijk dier. De dieren worden gedood ter verkrijging van weefsel voor ex vivo onderzoek. Gegeven de zorgvuldige beschrijving van de procedures in de verschillende bijlagen Type Dierproeven is de DEC van mening dat het genoemde ongerief een realistische inschatting is.**
12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*). (*zie bijlage I voor voorbeeld*).  
**De integriteit van de dieren zal in geringe mate worden aangetast tijdens de uitvoering van de proeven. De jonge vrouwelijke dieren zullen paren met een relatief groot mannelijk dier. De genetische modificaties zullen naar verwachting niet tot een aangetast fenotype leiden. De commissie is van mening dat er sprake is van een beperkte aantasting van de integriteit.**
13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).  
**De humane eindpunten zijn voor elk van de bijlagen dierproeven duidelijk gedefinieerd. De DEC is het met de aanvrager eens dat de kans klein is dat de dieren een humaan eindpunt zullen bereiken. De aanvrager zal gedurende de gehele uitvoering van de proef monitoren. De DEC is daarom van mening dat de aanvrager, indien de dieren toch een humaan eindpunt bereiken, tijdig in kan grijpen om onnodig lijden te voorkomen.**
- 3V's**
14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).  
**De DEC is van mening dat de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen vervangingsalternatieven zijn. Om de fundamenteel wetenschappelijke kennis te vergroten over epigenetische mechanismen**

**betrokken bij de eerste celtipe-specifieke beslissingen kort na de eicel bevruchting, is het noodzakelijk om bevruchte eicellen ex vivo te bestuderen. Hiervoor bestaan geen alternatieven op basis van (stam)cellijnen of computermodellen. Het gebruik van humane bevruchte eicellen stuit op ethische en praktische bezwaren.**

15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).
- De DEC is van mening dat het maximale aantal te gebruiken dieren realistisch is geraamd en proportioneel is ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. Er is sprake van een gefaseerde aanpak waarbij begonnen wordt met het opzetten van de analyse methoden in mES cellen gevolgd door mRNA injecties in eicellen en zygoten. Als de resultaten veelbelovend zijn worden Genetisch Gemodificeerde Muislijnen gemaakt voor vervolg onderzoek in latere stadia van de embryonale ontwikkeling en ter validatie van de resultaten. Door de gefaseerde aanpak wordt optimaal gebruik gemaakt van de proefdieren.**
16. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).
- De DEC heeft zich ervan verzekerd dat de aanvrager al het mogelijke heeft gedaan om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen. De verwachting is dat humane eindpunten zelden zullen worden bereikt.**
17. Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. Licht uw beoordeling toe.

*Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef*

**Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek. Alle dieren in proef worden na afloop gedood en het weefsel wordt voor ex-vivo studies gebruikt.**

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3; zie bijlage I voor voorbeeld*).
- De aanvrager gebruikt voornamelijk vrouwelijke dieren omdat eicellen nodig zijn voor het onderzoek.**
19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Indien van toepassing, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).
- De aanvrager geeft aan dat het noodzakelijk is de dieren te doden om zo de eicellen of zygoten te verkrijgen. Dit is cruciaal voor het bereiken van de**

**doelstelling. De aanvrager gebruikt methodes die beschreven is in bijlage IV van de richtlijn waarvoor geen aanvullende voorwaarden gelden.**

Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is.

**Niet van toepassing.**

**NTS**

20. Is de niet-technische samenvatting een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd?

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

## D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.A*).

**Rechtvaardigt het vergroten van de kennis over epigenetische mechanismen betrokken bij de eerste celtype-specifieke beslissingen kort na de eicel bevruchting het matige ongerief dat dieren wordt aangedaan in het voorliggende project de subdoelen daarbij in aanmerking nemend?**

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn, ten opzichte van elkaar af. Om dit proces te vergemakkelijken, kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel. Geef aan waarom de DEC bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (kosten) voor de andere belanghebbende (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.B; zie bijlage I voor voorbeelden*).

**De volgende waarden/belangen zijn in het geding (zie onderdeel C5):**

- i. **Waarden/belangen met betrekking tot de proefdieren: maximaal matig nadeel.**
- ii. **Waarden/belangen met betrekking tot de onderzoekers: veel voordeel.**
- iii. **Waarden/belangen met betrekking tot de doelgroepen binnen het veld van de embryologie en moleculaire biologie: veel voordeel.**
- iv. **Waarden/belangen met betrekking tot de maatschappij (patiëntengroepen, andere wetenschapsgebieden): gering voordeel maar op termijn mogelijk veel voordeel.**

3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden. Maak daarnaast gebruik van de volgende moreel relevante feiten: belang onderzoek (C4), kennis en kunde van betrokkenen (C7), haalbaarheid doelstellingen (C8), categorieën en herkomst dieren (C9), 3V's (C14-C18), ongerief (C10-13 en C19) en relevante wet en regelgeving (C2). Onderbouw hoe al deze elementen zijn meegewogen bij de beantwoording van de centrale morele vraag, zodanig dat het navolgbaar is zonder gedetailleerde kennis te hebben van het projectvoorstel (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.C; zie bijlage I voor voorbeeld*).

**De DEC is van mening dat de benoemde belangen van de wetenschap en samenleving in dit project zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren. De volgende overwegingen hebben bijgedragen tot deze conclusie:**

- **Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit resulteren in een aanmerkelijke toename de fundamenteel wetenschappelijke kennis over epigenetische mechanismen betrokken bij de eerste celtype-specifieke beslissingen kort na de eicel bevruchting. Dit betreft een zeer belangrijk biologische mechanisme onderliggend aan het tot stand komen van de eerste stadia van differentiatie tijdens embryonale ontwikkeling. Epigenetische mechanismen spelen een belangrijke rol in cel differentiatie en de-differentiatie.**
- **De DEC is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en recente wetenschappelijke inzichten en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.**
- **Het is aannemelijk dat de doelstellingen behaald zullen worden. Om dit doel te bereiken is het nodig proefdieren te gebruiken. De onderzoekers doen er echter alles aan om het lijden van de dieren te beperken waardoor het uiteindelijk ongerief van elk individueel dier, naar verwachting, beperkt blijft tot matig ongerief.**
- **De DEC is overtuigd van het belang van de wetenschappelijke doelstelling en het belang van de nieuwe kennis.**
- **De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager voldoende kennis en kunde heeft om de doelstellingen te behalen, en tijdens de uitvoering van het project te kunnen voldoen aan de 3V-beginselen.**
- **De DEC is van mening dat de aanvrager bij de uitvoering van het project alle mogelijke maatregelen treft om het ongerief van de dieren te beperken en het aantal dieren tot een minimum te beperken.**

**Gezien bovenstaande overwegingen is de DEC van opvatting dat het bereiken van de doelstelling, op de wijze zoals beschreven in deze projectaanvraag, het gebruik van proefdieren rechtvaardigt.**

## **E. Advies**

### 1. Advies aan de CCD

#### **■ De DEC adviseert de vergunning te verlenen.**

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

2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC. Indien gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, specificeer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.A; zie bijlage I voor voorbeeld*).  
**Het advies is unaniem**
3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.B*).  
**De DEC heeft geen dilemma's gesignaleerd die binnen of buiten de context van het project vallen.**



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Kon. Ned. Academie van Wetenschappen (KNAW)

Postbus 19121

1000 GC AMSTERDAM



**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

AVD801002016728

**Bijlagen**

1

Datum 25 april 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 22 maart 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Single-cell quantification of the regulation of gene expression in the first stages of early embryonic development" met aanvraagnummer AVD801002016728. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 5 april 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. U heeft de vraag van de CCD over de gesteriliseerde mannetjes beantwoord.

### **Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning.

Met het oog op artikel 10a, lid 1, zijn er algemene voorwaarden gesteld.

U kunt met uw project "Single-cell quantification of the regulation of gene expression in the first stages of early embryonic development" starten. De vergunning wordt afgegeven van 25 april 2017 tot en met 15 april 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-KNAW gevoegd. Dit advies is opgesteld op 22 maart 2017. 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. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld. Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

**Datum:**  
25 april 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD801002016728

#### **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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:

  
Algemeen Secretaris

#### **Bijlagen:**

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



# Projectvergunning

## gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

**Naam:** Kon. Ned. Academie van Wetenschappen  
(KNAW)  
**Adres:** Postbus 19121  
**Postcode en plaats:** 1000 GC AMSTERDAM  
**Deelnemersnummer:** 80100

deze projectvergunning voor het tijdvak 25 april 2017 tot en met 15 april 2022, voor het project "Single-cell quantification of the regulation of gene expression in the first stages of early embryonic development" met aanvraagnummer AVD801002016728, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-KNAW. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Groepsleider.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 22 maart 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 22 maart 2017;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 22 maart 2017;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 22 maart 2017, ontvangen op 22 maart 2017.
  - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 5 april 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
<b>3.4.4.1 Collection of zygotes and oocytes from wildtype and GMM female donors</b>				
	Muizen (Mus musculus) /	6.250	100% Matig	
<b>3.4.4.2 Generation of genetically modified mice (GMM)</b>				
	Muizen (Mus musculus) /	1.500	100% Matig	

### Voorwaarden

*Op grond van artikel 10a1 lid 2 van de Wet op de dierproeven zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen*

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



**Aanvraagnummer:**  
AVD801002016728

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 afstemming met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.



**Aanvraagnummer:**

AVD801002016728

## Weergave wet- en regelgeving

### **Dit project en wijzigingen**

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

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

### **Verzorging**

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

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

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

### **Pijnbestrijding en verdoving**

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

**Aanvraagnummer:**

AVD801002016728

kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

**Einde van een dierproef**

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijvende schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

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

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

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

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.