

Inventaris Wob-verzoek W17-17		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	Documenten 20171767	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	Aanvraagformulier				x		x		
2	Projectvoorstel				x	x		x	
3	Niet-technische samenvatting oud			x					
4	Bijlage dierproeven				x	x		x	
5	DEC-advies				x		x		
6	Ontvangstbevestiging				x		x		
7	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x		
8	Niet-technische samenvatting nieuw	x							
9	Adviesnota CCD		x						x
10	Beschikking en vergunning				x		x		



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 10612 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	Universiteit Leiden
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	
		KvK-nummer	27 36 89 29
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer	Rapenburg 70
		Postbus	9502
		Postcode en plaats	2300 RA Leiden
		IBAN	
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Leiden / Faculteit W&N
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|----------------|
| Startdatum | 1 - 1 - 2018 |
| Einddatum | 31 - 12 - 2022 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Constructie en fok van genetisch gemodificeerde zebravislijnen met potentieel ongerief ten behoeve van onderzoek naar het immuunsysteem
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- De zebravis als model voor onderzoek naar het immuunsysteem
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|---|
| Naam DEC | [REDACTED] |
| Postadres | [REDACTED] LUMC
Postbus 9600
2300 RC Leiden |
| E-mailadres | [REDACTED] |

4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 568,- Lege

Wijziging € Lege

4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen. Via een eenmalige incasso

Na ontvangst van de factuur

Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

Projectvoorstel

Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

Melding Machtiging

6 Ondertekening

6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:

- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
- dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
- dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
- dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam

Functie

Gemandateerd vergunninghouder

Plaats

Leiden

Datum

- 25-7-2017

Handtekening



Format

Projectvoorstel dierproeven

- Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie over het projectvoorstel vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul de titel van het project in.

2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*
- Fundamenteel onderzoek
- Translationeel of toegepast onderzoek
- Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier
- Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- Hoger onderwijs of opleiding
- Forensisch onderzoek
- Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

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

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

opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

De zebravis is een wetenschappelijk belangrijk modelorganisme voor onderzoek naar humane ziekten.

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]. Als modelorganisme biedt de zebravis een aantal specifieke voordelen ten opzichte van bijvoorbeeld de muis, waardoor nieuwe inzichten kunnen worden verkregen. De externe ontwikkeling en optische transparantie van de zebravisembryo's maken dit model bij uitstek geschikt voor de bestudering (en experimentele manipulatie) van vroege ontwikkelingsaspecten van immuniteit. Hierbij worden embryo's en larven gebruikt die zich nog niet zelfstandig voeden (tot maximaal 5 dagen na bevruchting; geen proefdieren volgens richtlijn 2010/63/EU). Tijdens de ontwikkeling van het zebravisembryo zijn de twee componenten van het immuunsysteem, de aangeboren immuniteit (innate immunity, met macrofagen en neutrofielen als belangrijkste celtypen) en de verworven immuniteit (adaptive immunity, afhankelijk van T- en B-cellen), niet meteen beide actief. De macrofagen en neutrofielen (innate immunity) functioneren al vanaf de eerste dag van de ontwikkeling, terwijl T- en B-cel-functies pas na enkele weken volledig ontwikkeld zijn. Het zebravisembryomodel is daarom een geschikt in vivo model om specifiek de functie van het aangeboren immuunsysteem te onderzoeken ([REDACTED]). Omdat de genetische componenten van het immuunsysteem tussen zebravis en andere vertebraten in grote mate geconserveerd zijn, biedt het gebruik van de zebravis als modelsysteem voor immuniteit een meerwaarde bij wetenschappelijke vraagstellingen die in andere vertebraten onderzoekstechnisch moeilijk te beantwoorden zijn. De zebravisonderzoeksgemeenschap heeft daarom in de afgelopen jaren zwaar geïnvesteerd in de ontwikkeling van tal van transgene lijnen waarin de verschillende celtypen van het immuunsysteem of onderdelen daarvan fluorescent gelabeld zijn en transgene lijnen die fluorescente reporter genen bevatten waarmee de activatie van verschillende componenten van de immunerespons kan worden gevisualiseerd. Met behulp van deze transgene lijnen kan de interactie van immuuncellen met pathogenen (in infectiemodellen) of met kankercellen (in tumorimplantatiemodellen) zeer gedetailleerd bestudeerd worden. De zebravisembryo's zijn bovendien erg geschikt voor het ontwikkelen van nieuwe methoden voor drug screening. Bij onderzoek naar de genoemde immuun-gerelateerde ziekten zijn mutanten voor belangrijke genen van het immuunsysteem onmisbaar. Bovendien is het belangrijk om transgene modellen voor deze immuun-gerelateerde ziekten te ontwikkelen. Genetische modificatie van zebravissen vindt plaats middels injectie van DNA of RNA (CRISPR-technologie) in extern bevruchte embryo's (zygoten) en is geen dierproef in de zin van de Wet. Echter, de fok wordt vergunningplichtig (fok met ongerief) als er bij monitoring t/m de F2-generatie sprake blijkt te zijn van een aangetast fenotype. In vergelijking met de muis, waarbij al zeer veel knockout-mutanten en transgene modellen gebruikt worden, zijn er voor de zebravis nog weinig mutanten en transgene modellen voor immuun genen beschreven. Dit project draagt bij aan de ontwikkeling hiervan t.b.v de onder punt 3.2 genoemde onderzoeksdoelen en t.b.v. uitwisseling met de internationale onderzoeksgemeenschap.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

Het doel van dit onderzoek is het maken van nieuwe genetisch gemodificeerde zebravismodellen om het aangeboren immuunsysteem te bestuderen. Hiermee verwachten wij nieuwe inzichten te kunnen verkrijgen in de moleculaire mechanismen die ten grondslag liggen aan stress- en immuun-gerelateerde ziekten, waaronder infectieziekten, ontstekingsziekten, metabole ziekten (zoals diabetes) en kanker. Een

beter begrip van deze mechanismen zal mogelijk leiden tot de identificatie van targets (doelwitgenen) voor nieuwe therapeutische strategieën.

De haalbaarheid van dit projectvoorstel is gewaarborgd door de expertise van de betrokken onderzoekers en dierverzorgers alsmede door uitstekende faciliteiten en de benodigde financiering voor het onderzoek.

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]. Om up-to-date te blijven en ervaringen uit te wisselen bezoeken zij ook regelmatig andere faciliteiten en congressen over de kweek van zebravissen. Binnen de zebraonderzoeksgemeenschap is er nauwe samenwerking waardoor wij goed op de hoogte zijn van het onderzoek dat bij andere instituten wordt uitgevoerd. [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED]). Onze samenwerkingspartners werken met infectiemodellen voor andere pathogenen of aan andere immuungerelateerde ziekten en onderzoeksvragen zodat er een wederzijds voordeel is om genetisch gemodificeerde zebra-lijnen tussen instituten uit te wisselen en de constructie ervan niet te dupliceren. Zebra-lijnen kunnen eenvoudig geïmporteerd of geëxporteerd worden door het opsturen van embryo's. [REDACTED].

3.3 Belang

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

Bij infectieziekten, ontstekingsziekten, kanker, en diverse andere ziekten speelt het immuunsysteem een grote rol. Het zebra-model biedt nieuwe mogelijkheden voor het bestuderen van deze ziekten in meerdere stadia van immuniteit (zowel tijdens de ontwikkeling als bij een volledig ontwikkeld immuunsysteem), waarbij gebruik gemaakt kan worden van transgene vissen met fluorescent gemarkeerde immuuncellen en van collecties van mutanten voor genetisch onderzoek ([REDACTED]). Op het gebied van infectieziekten heeft de zebra met name in tuberculose-onderzoek de meerwaarde al laten zien ([REDACTED]). Het gebruik van zebra-embryo's heeft tot belangrijke nieuwe inzichten geleid in de rol van macrofagen en neutrofielen bij de vorming van granulomen, de kenmerkende structuren waarin tuberculose-verwekkende bacteriën in hun gastheer kunnen overleven. Tuberculose staat hoog op de prioriteitenlijst van de WHO (1/3 van de wereldbevolking is besmet en jaarlijks zijn er 1.5 miljoen doden). De opkomst van multidrug-resistente stammen maakt het extra belangrijk om beter inzicht te krijgen in de mechanismen waarmee deze pathogeen aan het immuunsysteem kan ontsnappen en om nieuwe screeningsmethoden voor anti-tuberculose drugs te ontwikkelen. [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED] Nieuwe therapieën tegen tuberculose zijn hard nodig omdat er steeds vaker antibioticum-resistenties optreden en er nog altijd geen goed vaccin is. Stoffen die de eigen afweer stimuleren zouden in combinatie met antibiotica kunnen worden toegepast. [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED]. Het zebra-embryomodel biedt ook nieuwe mogelijkheden voor het bestuderen van de interacties tussen kankercellen en het immuunsysteem. [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED]). Mutanten in centrale genen van het

immuunsysteem en transgenenmodellen zijn belangrijke onderzoeksobjecten die helpen om meer inzicht te krijgen in de moleculaire mechanismen die betrokken zijn bij de functie van immuuncellen en de pathologie van immuun-gerelateerde ziekten. Dit onderzoek wordt uitgevoerd in grotere Nederlandse en Europese samenwerkingsverbanden die kennisoverdracht en kennisbenutting bevorderen.

Deze TLR-eiwitten spelen een cruciale rol bij de herkenning van pathogenen door het aangeboren immuunsysteem en defecten in deze genen en hun onderliggende signaalroutes hebben belangrijke relaties tot infectieziekten, ontstekingsziekten, auto-immuunziekten zoals reuma en asthma, en kanker (Nobelprijs voor geneeskunde in 2011). Myd88 is een adaptoreiwit dat wordt gerecruiteerd door bijna alle Toll-like receptoren (de uitzondering is TLR3 betrokken bij herkenning van virussen) na herkenningen van pathogenen of andere signalen. Myd88 geeft het signaal vervolgens door aan eiwitkinases en uiteindelijk resulteert dit in de activatie van centrale transcriptiefactoren die de immuunrespons reguleren. Recent is gebleken dat autofagie een belangrijk proces is dat door TLR-Myd88 signaling wordt gereguleerd.

. De activering van Dram1 is deels afhankelijk van Myd88, maar het is nog onbekend welke andere signaalroutes van het immuunsysteem Dram1 kunnen activeren. Ook het moleculaire werkingsmechanisme van Dram1 is nog onbekend. Een beter begrip van zowel de activatie- als de werkingsmechanismen is belangrijk voor het onderzoek naar Dram1 als een potentieel drug target.

Gezien de reeds genoemde onderzoekstechnische voordelen van het zebnavismodel-systeem kunnen studies in dit organisme nieuwe inzichten verschaffen over het immuunsysteem van vertebraten en de connecties tussen autofagie, tuberculose en diabetes.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Hiermee is de basis gelegd voor de selectie van kandidaatgenen voor de constructie van genetisch gemodificeerde zebnavislijnen t.b.v. functioneel onderzoek. Bij de keuzes die wij hierin maken spelen literatuurstudie (zoals informatie over genetische associaties met humane ziekten) en onze eerdere onderzoekresultaten tevens een belangrijke rol.

). Deze myd88-mutant heeft een defect in de signaalroute (Toll-like receptor signaling) die essentieel is voor de herkenning van en reactie op micro-organismen of op lichaamseigen signaalstoffen die tijdens een infectie of in de omgeving van tumoren geproduceerd worden. Ons onderzoek naar deze mutant heeft geleid tot een belangrijke nieuw inzicht in de afweer tegen infecties.

Autofagie betekent "zelf eten" en is al heel lang bekend als een mechanisme dat cellen gebruiken om verouderde of kapotte onderdelen op te ruimen en om energie vrij te maken onder stress. Pas vrij recent is duidelijk geworden dat autofagie ook een zeer belangrijke rol speelt in het immuunsysteem en momenteel staat deze anti-bacteriële functie van autofagie enorm in de belangstelling. Het was al bekend dat Dram1 een rol speelt bij autofagie na DNA-schade, vandaar de naam: DNA-damage regulated autophagy modulator. Bovendien was er al aandacht voor de rol van Dram1 in kanker.

willen wij zebnavislijnen gebruiken met genetische modificaties in Dram1 of andere componenten van de autofagiemachinerie die samenwerken met Dram1. Bij dit onderzoek zal ook de myd88-mutant gebruikt blijven worden alsmede andere lijnen met genetische modificaties in signaalroutes die betrokken zijn bij herkenning van pathogenen en het activeren van afweermechanismen waaronder autofagie. Autofagie speelt ook een

belangrijke rol in de pathogenese van metabole ziekten (zoals diabetes), ontstekingsziekten en kanker. Patiënten met dergelijke ziekten zijn ook vaak gevoeliger voor infecties. Bijvoorbeeld, diabetes-patiënten hebben een 3x groter kans om tuberculose te krijgen (). Tuberculose is een door mycobacteriën veroorzaakte infectieziekte ().

Wij willen daarom ook zebrawismutanten onderzoeken in immuunogenen die geassocieerd zijn met zowel diabetes als tuberculose.

Voor functioneel onderzoek naar de signaalroutes betrokken bij het immuunsysteem is het vaak nodig om deze routes zowel te inhiberen (door genen in de route te muteren – “loss-of-function”) als te activeren (door genen in de route tot overexpressie te brengen – “gain of function”). Hiervoor worden verschillende genetisch gemodificeerde zebrawislijnen gebruikt die op de volgende wijzen verkregen worden:

- 1) Import vanuit een stockcentrum of ander onderzoeksinstituut
- 2) CRISPR/Cas-mutagenese, gebaseerd op de injectie van RNA in het 1-cellige stadium (zygote) van zebrawisembryo's. Deze mutagenesetechniek wordt eventueel gecombineerd met homologe recombinatie om een specifieke variant van een gen of een fluorescente merker in het genoom te introduceren. De eerste generatie van vissen (F0) die met deze techniek gegenereerd wordt is mozaïek voor de mutatie. Deze worden gekruist tegen wildtype om stabiele lijnen te genereren die de mutatie aan de nakomelingen overdragen.
- 3) Transgenese, gebaseerd op de injectie van DNA in het 1-cellige stadium (zygote) van zebrawisembryo's. Deze techniek wordt gebruikt om zebrawismodellen te genereren die overexpressie van kandidaatgenen. Hierbij worden induceerbare overexpressiesystemen gebruikt (zoals Gal4, Cre of heat shock promotor) zodat de overexpressie specifiek geïnduceerd kan worden in de embryo's/larven waarmee experimenten worden uitgevoerd om de immuunafweer te bestuderen. Daarom valt met deze technieken in principe geen fenotype bij de volwassen vissen te verwachten. Transgenese wordt tevens gebruikt voor het genereren van fluorescente reporterlijnen (merkers voor activering van genen betrokken bij de immuunrespons). De eerste generatie van transgene vissen (F0) is mozaïek voor het transgen. Deze worden gekruist tegen wildtype om stabiele lijnen te genereren die het transgen aan de nakomelingen overdragen.
- 4) Kruisingen van verschillende mutanten en transgene lijnen. Voor de functionele analyse van een specifieke signaalroute kan het nodig zijn om meerdere genen uit te schakelen. Het zou bijvoorbeeld kunnen dat een essentiële regulator wordt gecodeerd door meerdere isovormen die voor elkaars functie kunnen compenseren. In dat geval worden er meervoudige mutanten gemaakt door de lijnen met enkelvoudige mutaties te kruisen. Ook worden mutanten gekruist met fluorescente reporterlijnen (merkers voor immuunceltypen of activering van genen betrokken bij de immuunrespons).

Er worden onder dit projectvoorstel geen experimenten uitgevoerd met vrijzwemmende larven of volwassen zebrawissen van bovengenoemde genetisch gemodificeerde lijnen; de lijnen worden uitsluitend gebruikt voor de productie van embryo's t.b.v. experimenten waarvan het eindpunt op maximaal 5 dagen na bevruchting ligt. Het gaat hier dus alleen om de constructie van nieuwe genetisch gemodificeerde lijnen (waarbij een aantal dieren wordt gedood t.b.v. fenotypering) en de reguliere kweek van vissen waarbij sommige lijnen mogelijk vanwege een zwakker immuunsysteem vatbaarder zijn voor infecties. In een aquarium is het onvermijdelijk dat de vissen in aanraking komen met verschillende microorganismen die in het water leven. Bacteriële filters zijn immers noodzakelijk voor het opruimen van de afvalstoffen van de vissen en dus een belangrijke bepalende factor voor de waterkwaliteit en het algemene welzijn van de vissen. Tussen de bacteriële filters en toestroom van het water naar de aquariumbakken zit een UV-filter waarmee de groei van ongewenste microorganismen in het water zoveel mogelijk wordt beperkt, maar dit geheel voorkomen is onmogelijk. De vissen worden dagelijks op gezondheid gecontroleerd door de diervorzorgers en zij zullen de dieren euthanaseren indien hier aanleiding toe is (humane eindpunten).

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

Dit project betreft de constructie en fok van genetisch gemodificeerde zebrawislijnen met potentieel ongerief (volgnummer 3.4.4.1). Deze lijnen worden gebruikt om embryo's/larven te produceren waarmee de functie wordt onderzocht van genen die betrokken zijn bij de aangeboren immuunafweer tegen

infecties. Deze experimenten worden beëindigd voordat de larven het stadium bereiken waarbij zij zich zelfstandig kunnen voeden (5 dagen na bevruchting). De fok van de genetisch gemodificeerde lijnen die voor de productie van embryo's nodig zijn zal in sommige gevallen gepaard kunnen gaan met ongerief. De uitschakeling van genen van het aangeboren immuunsysteem kan namelijk leiden tot een verhoogde vatbaarheid voor infecties. Het is belangrijk om hierbij op te merken dat de mutaties die wij introduceren niet tot een algehele immuundeficiëntie zullen leiden. Vissen hebben namelijk net als de mens zowel een aangeboren immuunsysteem (afhankelijk van de activiteit van fagocyten, zoals macrofagen en neutrofielen) als een adaptief immuunsysteem (afhankelijk van T- en B-cellen). Het adaptieve immuunsysteem ontwikkelt zich tussen de periode van 5 dagen en 3 weken na bevruchting, dus juveniele en volwassen vissen die wij kweken hebben wel bescherming van het adaptieve immuunsysteem. Wij verwachten dat de mutaties die wij willen bestuderen slechts in enkele gevallen tot een verhoogde uitval bij de kweek zullen leiden. Er is namelijk veel redundantie in het immuunsysteem waardoor een mutatie in een bepaald gen deels of geheel gecompenseerd kan worden door andere genen met een parallele functie. Het is daarom waarschijnlijk dat in er in de meeste gevallen geen effect van de mutatie wordt gevonden tijdens de reguliere kweek en dat een immuun-gerelateerd fenotype pas gedetecteerd wordt tijdens infectie-experimenten met de embryo's van deze lijnen. Lijnen met een mutatie in een enkele Toll-like receptor () of bijvoorbeeld in een TLR-adaptor (die alleen bij de tlr2-afhankelijke signaalroute betrokken is vertonen geen verschillen in de kweek in vergelijking met wild type vissen. Ook hebben wij geen ongerief geconstateerd bij verschillende mutanten in genen die betrokken zijn bij de afweer middels autofagie () of bij mutanten in genen die betrokken is bij chemokinesignaling ().

Voor nieuwe genetisch gemodificeerde lijnen zal door monitoring van het welzijn over twee generaties beoordeeld worden of er sprake is van fok met ongerief. Ook bestaande lijnen die door import worden verkregen zullen over twee generaties in onze faciliteit gemonitord worden. De monitoring bestaat uit een dagelijkse controle op symptomen van ziekte (zoals openstaande schubben, afwijkend zwemgedrag, huidlaesies) en vergelijking van de overlevingspercentages tussen gemodificeerde lijnen en wild type controles. Indien er redenen zijn om aan te nemen dat een genetische modificatie tot een fenotype zou kunnen leiden, dan zal een beperkt aantal van de fokdieren worden gedood voor nadere karakterisering van het effect van de mutatie (bijvoorbeeld middels RNA-sequencing en profiling van eiwitten en metabolieten). Voor genotypering van de lijnen wordt vinknippen toegepast (afknippen van stukje van de staartvin wat zich weer herstelt door regeneratie).

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

De selectie van kandidaatgenen voor genetische modificatie wordt gebaseerd op literatuurstudie en eerder onderzoek zoals beschreven onder 3.2. Bij elke nieuwe genetisch gemodificeerde lijn zal moeten worden bepaald of deze dieren geschikt zijn voor het onderzoek naar het immuunsysteem en of er sprake is van fok met ongerief. Vissen die ernstige afwijkingen vertonen (bijvoorbeeld abnormaal zwemgedrag) zijn niet bruikbaar voor immunologisch onderzoek en zullen worden gedood (humaan eindpunt). Tevens zijn lijnen met een ernstige verminderde fertiliteit ongeschikt voor het onderzoek, aangezien hiervoor efficiënte productie van embryo's noodzakelijk is.

Om te bepalen of een mutant homozygoot gefokt kan worden zullen de embryo's/larven afkomstig van een kruising van heterozygote ouders eerst tijdens de eerste 5 dagen van de ontwikkeling worden gevolgd. Als tijdens deze periode geen verminderde overleving of ontwikkelingsafwijkingen worden geconstateerd, dan zullen de dieren verder opgekweekt worden tot volwassenheid en zal op een leeftijd van 2-3 maanden een genotypering worden uitgevoerd via vinknippen. Bij afwijking van Mendelische segregatie (minder dan 25% homozygote dieren) is het aannemelijk dat de homozygote mutanten een verminderde levensvatbaarheid hebben en zal de verdere fok van homozygote dieren beschouwd worden

als fok met ongerief. Ook als er geen afwijking is van Mendelische segregatie zullen de lijnen nog verder gemonitord worden door dagelijks gecontroleerd worden op symptomen van ziekte (zoals openstaande schubben, afwijkend zwemgedrag, huidlaesies). Indien er bij een genetisch gemodificeerde lijnen vaker uitval door ziekte optreedt dan bij de corresponderende wild type lijn zal de verdere fok beschouwd worden als fok met ongerief. Zoals beschreven onder 3.4.2 verwachten wij dat dit slechts in enkele gevallen van toepassing zal zijn, [REDACTED]. Bij overexpressie van immuungenen worden induceerbare expressiesystemen gebruikt zodat geen fenotypen te verwachten zijn, maar zal desondanks ook dezelfde monitoring plaatsvinden als bij mutanten. In geval van fok met ongerief worden de dieren zoveel mogelijk als heterozygote lijnen aangehouden en alleen in periodes dat er veel embryo's nodig zijn voor experimenten zullen er kleine families van homozygote vissen worden gekweekt (20-50, afhankelijk van de behoefte). Deze families zullen worden gekweekt tot een leeftijd van maximaal 1,5 jaar, aangezien bij oudere vissen de kans op ziekte door infecties toeneemt (i.p.v. 2 jaar zoals gebruikelijk bij de reguliere fok i.v.m. verminderde fertiliteit na deze leeftijd) .

N.B. Kweek met ongerief [REDACTED] en constructie van CRISPR-mutanten worden momenteel uitgevoerd onder een eerder goedgekeurde DEC-protocol (Kweek van zebravismutanten voor onderzoek naar het immuunsysteem) dat loopt t/m 31/12/2017. Wanneer een vergunning voor dit project is verkregen, zal vanaf 1/1/2018 de kweek van de myd88-mutant en de constructie van nieuwe genetisch gemodificeerde zebravislijnen worden voortgezet onder deze nieuwe vergunning.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Constructie en fok van genetisch gemodificeerde zebravislijnen met potentieel ongerief
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Format

Niet-technische samenvatting

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

1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	De zebravis als model voor onderzoek naar het immuunsysteem
1.2 Looptijd van het project	1-1-2018 t/m 31-12-2022
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	afweermechanismen, aangeboren immuniteit, infectie, ontsteking, genetische modificatie

2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project. <i>U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Fundamenteel onderzoek
	<input checked="" type="checkbox"/> Translationeel of toegepast onderzoek
	<input type="checkbox"/> Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
	<input type="checkbox"/> Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid
	<input type="checkbox"/> Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
	<input type="checkbox"/> Hoger onderwijs of opleiding
	<input type="checkbox"/> Forensisch onderzoek
	<input type="checkbox"/> Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	Het doel van dit onderzoek is het maken van genetisch gemodificeerde zebravismodellen voor onderzoek naar de functie van het aangeboren immuunsysteem bij infectieziekten en andere immuungerelateerde ziekten, waaronder ontstekingsziekten, metabole ziekten (zoals diabetes) en kanker. Het immuunsysteem van de zebravis vertoont grote overeenkomsten met dat van de mens. De zebravisembryo's zijn zeer geschikt voor microscopische onderzoek, omdat deze zich buiten de moeder ontwikkelen en doorzichtig zijn. Door de immuuncellen met fluorescerende kleuren te markeren kan de rol bij ziekteprocessen zeer gedetailleerd bestudeerd worden. Bovendien bestaan er relatief eenvoudige genetische technieken voor functioneel onderzoek naar genen betrokken bij immuunreacties.
---	---

- | | |
|---|--|
| 3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang? | Het onderzoek levert fundamenteel wetenschappelijke kennis op die belangrijk is om infectieziekten en andere immuungerelateerde ziekten beter te begrijpen in mensen en zodoende aanknopingspunten te vinden voor nieuwe behandelingsstrategieën. Het wordt uitgevoerd in (inter)nationale samenwerkingsverbanden die kennisoverdracht en kennisbenutting bevorderen. |
| 3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt? | De zebravislijnen worden over verschillende generaties gemonitord om te beoordelen of genetische modificaties een effect hebben op het welzijn. Voor de karakterisering en fok met potentieel ongerief zijn maximaal 7500 zebravissen (<i>Danio rerio</i>) nodig in de periode van 5 jaar. |
| 3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren? | Genetische modificatie van immuungerelateerde genen kan mogelijk leiden tot een grotere vatbaarheid voor infecties. Op grond van eerdere onderzoekservaring verwachten wij dat dit bij slechts enkele nieuw te genereren zebravislijnen zal optreden. Jaarlijks zal de fok met ongerief maximaal 5% van de totale fok van genetische gewijzigde zebravissen in onze faciliteit bedragen. |
| 3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst? | De genetisch gemodificeerde vissen worden uitsluitend gebruikt voor de fok (3500 vissen) of direct gedood (2500 vissen) voor karakterisering van het fenotype. Deze vissen ondervinden mogelijk licht ongerief van niet-waarneembare effecten van het verzwakte immuunsysteem en van afname van weefsel (vinknip) voor genotypering of afname van sperma voor invriezing. De fok kan bij sommige dieren tot matig ongerief leiden door het optreden van ziektesymptomen, bijvoorbeeld huidlaesies, openstaande schubben of afwijkend zwemgedrag. Op grond van onze ervaring wordt dit geschat op 30% van de totale fok met ongerief (1500 vissen). Waarneembare ziektesymptomen zullen zich niet langer dan één dag voordoen vanwege dagelijkse inspectie en tijdige euthanasie. |
| 3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop? | Fokdieren worden aanhouden zolang zij gezond en fertiel zijn, tot maximaal 1,5 jaar. Een deel van de fokdieren wordt gedood voor nadere karakterisering van het effect van de genetische modificatie. |

4 Drie V's

- | | |
|--|--|
| 4.1 Vervanging
Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet | Fok van genetisch gemodificeerde zebravissen is noodzakelijk voor productie van embryo's, die gebruikt worden om het aangeboren immuunsysteem te bestuderen. Het onderzoek kan niet gerealiseerd worden met celkweek of orgaanculturen, omdat het complexe ziekten betreft en de interactie daarvan met het immuunsysteem. De zebravislijnen met een verzwakt immuunsysteem kunnen in de toekomst mogelijk vervangen worden als er |
|--|--|

gebruikt kunnen worden.

methoden ontwikkeld worden om de benodigde genetische modificaties induceerbaar te maken, zodat geen fok met ongerief meer valt te verwachten.

4.2 **Vermindering**

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

Fok met ongerief wordt geminimaliseerd, o.a. door aanhouden van heterozygote stocks en invriezen van sperma. Er worden geen zebravislijnen met algehele immuundeficiëntie gekweekt.

4.3 **Verfijning**

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

Het gebruik van zebravisembryo's als modelsysteem voor immuniteit biedt een meerwaarde bij wetenschappelijke vraagstellingen die in andere gewervelde dieren onderzoekstechnisch moeilijk te beantwoorden zijn. Ontwikkelingen op gebied van genetische modificatie en zebravisaquariummanagement worden nauwlettend gevolgd om mogelijke verbeterpunten te signaleren.

Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.

Waterkwaliteit wordt zorgvuldig bewaakt en gezondheid wordt dagelijks gecontroleerd. Bij ziektesymptomen wordt euthanasie toegepast om ongerief te beperken en besmetting van andere vissen te voorkomen. Stress wordt beperkt door een strikte bedrijfsvoering en beleid met betrekking tot gebruik van oude dieren.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10612				
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Leiden				
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in. <i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	<table><thead><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr></thead><tbody><tr><td>3.4.4.1</td><td>Constructie en fok van genetisch gemodificeerde zebravislijnen met potentieel ongerief</td></tr></tbody></table>	Volgnummer	Type dierproef	3.4.4.1	Constructie en fok van genetisch gemodificeerde zebravislijnen met potentieel ongerief
Volgnummer	Type dierproef					
3.4.4.1	Constructie en fok van genetisch gemodificeerde zebravislijnen met potentieel ongerief					

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Genetisch gemodificeerde zebravislijnen worden gegenereerd en gefokt om embryo's/larven te produceren waarmee de functie wordt onderzocht van genen die betrokken zijn bij de aangeboren immuunafweer tegen infecties. Deze experimenten worden beëindigd voordat de larven het stadium bereiken waarbij zij zich zelfstandig kunnen voeden (5 dagen na bevruchting). De fok van de genetisch gemodificeerde lijnen die voor de productie van embryo's nodig zijn zal in sommige gevallen gepaard kunnen gaan met ongerief, met name vanwege een mogelijke verhoogde vatbaarheid voor ziekten.

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

Om genetisch gemodificeerde zebravislijnen te genereren wordt DNA/RNA en eventueel eiwit geïnjecteerd in 1-cellige zebravisembryo's (zygoten). Om het aantal benodigde dieren te beperken wordt de meest efficiënte methode gebruikt. Bijvoorbeeld, de injectie van RNA voor een CRISPR guide sequentie in combinatie met RNA voor Cas9 of in combinatie met recombinant Cas9-eiwit is op dit moment de meest gebruikte en meest efficiënte methode om een mutatie (deletie of insertie) te genereren. De meest efficiënte methode voor het genereren van een transgene lijn is de injectie van plasmide-DNA dat het transgen bevat, samen met RNA voor Tol2-transposase, dat de integratie in het zebravisgenoom bevordert. De geïnjecteerde embryo's, die mozaïek zijn voor de genetische modificatie, worden opgekweekt tot volwassen dieren (3 maanden). Deze F0-vissen worden uitgekruist tegen wild-type. Overerving van de mutatie wordt bepaald door genotypering van de nakomelingen of door de expressie van een transgen te monitoren (in geval van een fluorescente merker). Genotypering wordt uitgevoerd door genomisch DNA te isoleren uit een stukje van de staartvin dat onder verdoving wordt afgeknipt (vinknip). Draggers van de genetische modificatie worden uitgekruist tegen wild type (of bestaande genetisch gemodificeerde lijnen,

bijvoorbeeld fluorescente reporterlijnen voor immuuncellen) om een F2 te genereren en vervolgens ingekruist om homozygote dieren te verkrijgen. Cryopreservatie van sperma wordt ingezet om backups van de lijnen te maken en om de onderhoudsfok te kunnen beperken.

Nieuwe genetisch gemodificeerde lijnen, kruisingen van bestaande lijnen of lijnen die door import worden verkregen zullen over twee generaties gemonitord worden om te bepalen of er een verhoogde vatbaarheid voor ziekten of ander teken van ongerief is. In principe valt dit alleen te verwachten bij homozygote kweek van mutanten.

Om te bepalen of een mutant homozygoot gefokt kan worden zullen de embryo's/larven afkomstig van een kruising van heterozygote ouders eerst tijdens de eerste 5 dagen van de ontwikkeling worden gevolgd. Als tijdens deze periode geen verminderde overleving of ontwikkelingsafwijkingen worden geconstateerd, dan zullen de dieren verder opgekweekt worden tot volwassenheid en zal op een leeftijd van 2-3 maanden een genotypering worden uitgevoerd via vinknippen. Bij afwijking van Mendelische segregatie (minder dan 25% homozygote dieren) is het aannemelijk dat de homozygote mutanten een verminderde levensvatbaarheid hebben en zal de verdere fok van homozygote dieren beschouwd worden als fok met ongerief. Ook als er geen afwijking is van Mendelische segregatie zullen de lijnen nog verder gemonitord worden door dagelijkse controle op symptomen van ziekte. Indien er bij een genetisch gemodificeerde lijnen vaker uitval door ziekte optreedt dan bij de corresponderende wild type lijn zal de verdere fok beschouwd worden als fok met ongerief. Deze families zullen worden gekweekt tot een leeftijd van maximaal 1,5 jaar, aangezien bij oudere vissen de kans op ziekte door infecties toeneemt. Dit is 6 maanden eerder dan de gebruikelijke leeftijd van ongeveer 2 jaar die wij hanteren voor onze reguliere fok, omdat de fertiliteit na deze leeftijd sterk afneemt.

Homozygote fok zal alleen worden uitgevoerd met vissen die geen ernstige afwijkingen vertonen. ██████████. Deze mutant heeft geen zichtbare afwijkingen, maar gemiddeld worden er vaker zieke vissen bij deze lijn aangetroffen dan bij onze andere lijnen. Bij herkenning van symptomen (zoals afwijkend zwemgedrag, lethargie, vermagering, huidlaesies, openstaande schubben) waarop dagelijkse controle plaatsvindt worden deze vissen onmiddellijk geëuthanaseerd. Vissen die ernstigere afwijkingen vertonen (bijvoorbeeld een structureel abnormaal zwemgedrag) of fertiliteitsproblemen zijn niet bruikbaar voor immunologisch onderzoek en zullen niet homozygoot worden gekweekt.

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

Wij zullen per lijn ongeveer 150 eieren injecteren, hetgeen een gemiddeld aantal van 100 volwassen zebravissen (F0) zal opleveren die mozaïek zijn voor de genetische modificatie. Naar verwachting draagt gemiddeld 20% van de F0-vissen de modificatie over via de kiembaan. De volgende generatie wordt heterozygoot gefokt met wildtype dieren. Deze F1 vissen (ca. 100) worden getest op aanwezigheid van de mutatie en zo geselecteerd voor verdere heterozygote onderhoudsfok. Wij verwachten dat heterozygote dragers van mutaties geen ongerief hebben. Bij transgene modellen verwachten wij ook geen ongerief omdat hierbij induceerbare expressiesystemen en/of onschadelijke fluorescente reporters worden gebruikt. Heterozygote dieren worden minimaal 2 generaties gevolgd (F2 en F3) om er zeker van te zijn dat er geen fenotype/ongerief is. Alleen in het onwaarschijnlijke geval dat heterozygote dieren wel een fenotype blijken te hebben dan zullen deze dieren tellen als dierproef/fok met ongerief. Per generatie worden er gemiddeld 50 vissen gekweekt, wat leidt tot een totaal van 100 heterozygote vissen per lijn voor welzijnsbeoordeling. Voor de kweek van homozygote mutanten wordt eerst in het larvale stadium (5 dagen oude larven) bepaald of er normale Mendelische segregatie is (zie de onderbouwing van de gekozen aanpak hierboven). Indien er in het larvale stadium geen afwijkingen worden geconstateerd, dan worden families van gemiddeld 50 homozygote vissen gemonitord over minimaal 2 generaties, wat leidt tot een totaal van 100 homozygote vissen voor welzijnsbeoordeling. Tot nu toe hebben wij bij slechts 1 mutante lijn (██████████) van ongeveer 10 lijnen met immuun-gerelateerde mutaties een verhoogde vatbaarheid voor ziekten geconstateerd. Wij verwachten daarom dat er bij niet meer dan 10% van de homozygote mutanten sprake zal zijn van fok met ongerief. In dat geval worden de dieren zoveel mogelijk als heterozygote lijnen aangehouden en alleen in periodes dat er embryo's nodig zijn voor experimenten zullen er kleine families van homozygote vissen worden gekweekt (20-50, afhankelijk van de behoefte). De experimenten met embryo's zijn praktisch niet uitvoerbaar met legsels van heterozygote vissen. Dit zou namelijk leiden tot een verdubbeling van het aantal embryo's dat geanalyseerd moet worden en dat is niet haalbaar vanwege de complexe injectie- en

imagingtechnieken die hierbij gebruikt worden.

B. De dieren

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

Zebravis (*Danio Rerio*), eigen fok

De zebravis als modelsysteem voor immuniteit biedt een meerwaarde bij wetenschappelijke vraagstellingen die in andere vertebraten onderzoekstechnisch moeilijk te beantwoorden zijn. Mutanten in genen van het immuunsysteem worden bijvoorbeeld gekruist met verschillende transgene lijnen waarin de macrofagen en neutrofielen of onderdelen van deze cellen (bijvoorbeeld autofagosomen die een belangrijke rol spelen bij de afweer tegen pathogenen) fluorescent gelabeld zijn. De lijnen worden gegenereerd/gekweekt in ons eigen instituut of verkregen van samenwerkende instituten. De transparante embryonale en larvale stadia van vissen met combinaties van de mutaties en de genoemde fluorescente markers worden vervolgens gebruikt om nieuwe inzichten te krijgen in de functie van genen die betrokken zijn bij signaaltransductieprocessen en mechanismen zoals autofagie die een belangrijke rol spelen bij infectieziekten, kanker en diabetes.

Micro-injectie van RNA/DNA t.b.v. de constructie van nieuwe lijnen wordt uitgevoerd met 1-cellige embryo's. Volwassen vissen worden gekweekt voor het onderhoud van de lijnen en om embryo's te produceren voor gebruik in experimenten, waarbij de leeftijd van maximaal 5 dagen na bevruchting het eindpunt is (i.e. voordat de larven in staat zijn zich zelfstandig te voeden).

Er zijn veel signaalroutes betrokken bij de functie van het immuunsysteem. Kandidaatgenen voor genetische modificatie worden geselecteerd zoals beschreven in het projectvoorstel. Pas indien bij welzijnsmonitoring een fenotype wordt geconstateerd dat gepaard gaat met ongerief, is hier sprake van dierproeven in wettelijke zin. Indien er redenen zijn om aan te nemen dat de genetische modificatie tot een fenotype zou kunnen leiden, dan zal een beperkt aantal dieren worden gedood voor nadere karakterisering van het effect van de mutatie (bijvoorbeeld middels RNA-sequencing en profiling van eiwitten en metabolieten). Deze fenotyperingen verwachten wij per jaar bij maximaal 10 lijnen uit te voeren met gemiddeld 50 vissen per lijn (totaal maximaal 500 per jaar, maximaal 2500 in 5 jaar).

Bij 1 bestaande lijn in onze faciliteit () is er sprake van fok met ongerief. Het ongerief betreft een verhoogde vatbaarheid voor ziekte. Bij slechts een deel van deze vissen (gemiddeld niet meer dan 30%) treden waarneembare ziektesymptomen op. De overige vissen (70%) kunnen mogelijk wel licht ongerief ondervinden van het verzwakte immuunsysteem (subklinische symptomen). Door toepassing van de humane eindpunten zullen de vissen niet langer dan 1 dag waarneembare ziektesymptomen ondervinden. De en de nieuw te genereren mutanten worden gefokt in combinatie met verschillende fluorescente reportergenen of andere genetische modificaties. Op grond van onze ervaring (zie toelichting onder A) verwachten wij dat er bij niet meer dan 10% van de nieuwe homozygote mutanten die wij zullen genereren sprake zal zijn van fok met ongerief vergelijkbaar met dat van de *myd88*-mutant. Deze lijnen zullen niet allemaal tegelijk nodig zijn dus kunnen voor het merendeel van de tijd heterozygoot worden aangehouden. De totale kweek met ongerief (nieuwe genetisch gewijzigde dieren) schatten wij op maximaal 1000 vissen per jaar, i.e. maximaal 5000 vissen over een periode van 5 jaar. Dit betreft circa 5% van de totale jaarlijkse kweek van genetische gewijzigde dieren in onze faciliteit.

In geval dat onder deze vergunning gemaakte zebravissen met potentieel ongerief nodig zijn voor een andere dan aan het immuunsysteem gerelateerde onderzoeksvraag, dan zullen de daarvoor benodigde dieren inclusief de fok met potentieel ongerief worden opgenomen onder een nieuwe aanvraag.

Samengevat:

Max. 2500 zebravissen worden gedood t.b.v. fenotypering

Max. 5000 zebravissen worden gekweekt met ongerief (70% licht, 30% matig) t.b.v. productie van embryo's voor experimenten

In totaal: 7500 zebravissen

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

geacht.

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging:

De constructie van genetisch gemodificeerde zebravislijnen en fok met potentieel ongerief is gericht op onderzoeksvragen waarbij de vroege ontwikkelingsstadia van de zebravis (embryo's en niet vrij zwemmende larven) gebruikt kunnen worden, die vanwege hun transparantie bijzonder geschikt zijn voor niet-invasieve microscopische imagingstudies waarbij nieuwe inzichten in de functies van immuuncellen verkregen kunnen worden. Andere proefdieren, zoals de muis, hebben geen externe embryo-ontwikkeling en hierbij zijn dergelijke imagingstudies zonder invasieve technieken niet mogelijk. Bovendien is het in zebravisembryo's/larven mogelijk om de interactie van pathogenen met cellen van het aangeboren immuunsysteem te bestuderen voordat het adaptieve immuunsysteem actief is. Daarmee vormen zebravisembryo's/larven een goed model voor het bestuderen van opportunistische infecties die voorkomen bij patiënten met een verzwakt immuunsysteem. Dit onderzoek is niet mogelijk zonder gebruik van genetisch gemodificeerde proefdieren om embryo's te produceren. Vervanging door cel-of orgaanweken is niet mogelijk, omdat het hier onderzoek betreft naar complexe ziekten en de interactie met het immuunsysteem *in vivo*. Er bestaat met de huidige technologie nog geen alternatief voor de fok met ongerief van genetische gemodificeerde zebravislijnen met een verzwakt immuunsysteem, maar deze lijnen kunnen in de toekomst mogelijk vervangen worden door conditionele transgen/knockout-lijnen, waarbij geen fok met ongerief valt te verwachten.

Vermindering:

De effectiviteit van iedere CRISPR wordt eerst in embryo's/larven (tot max. 5 dagen na bevruchting) beoordeeld, alvorens wordt besloten of de CRISPR geschikt is om een mutante lijn te genereren. CRISPRs kunnen bovendien direct geïnjecteerd kunnen worden in een gewenste transgene achtergrond (bijvoorbeeld een lijn met fluorescent gelabelde macrofagen en een fluorescente marker voor autofagie), dus kweek benodigd voor het inkruisen van de mutatie in verschillende transgene achtergronden kan hiermee worden beperkt.

Er zullen geen lijnen gekweekt worden met een algehele immuundeficiëntie (zoals bijvoorbeeld bij SCID-muizen). Het onderzoek richt zich op genen die betrokken zijn bij de aangeboren immuunsysteem waarbij slechts een gering effect op de algehele gezondheid te verwachten valt vanwege redundantie in het immuunsysteem en omdat defecten in het volwassen stadium ook gecompenseerd zullen worden door de functie van het adaptieve immuunsysteem dat actief wordt tijdens de eerste 3 weken na bevruchting.

De lijnen zullen als heterozygote stocks aangehouden worden en alleen in periodes dat er veel mutante embryos nodig zijn voor experimenten zullen er kleine families van homozygote vissen worden aangehouden. De fok van weinig gebruikte lijnen zal worden geminimaliseerd.

Verfijning:

Het is aannemelijk dat stressfactoren een negatieve invloed hebben op het immuunsysteem, daarom worden maatregelen genomen om deze zoveel mogelijk te beperken. Het opzetten van kruisingen ten behoeve van de productie van embryo's voor experimenten wordt maximaal 1x per week gedaan.

Naast stress, is veroudering een andere factor die effect kan hebben op het immuunsysteem. De families van vissen die onder fok met ongerief vallen worden gekweekt zullen daarom worden aangehouden tot een leeftijd van maximaal 1,5 jaar, in plaats 2 jaar zoals gebruikelijk is bij wild type lijnen.

Om mogelijke verbeterpunten voor de kweek van zebravissen te signaleren onderhouden de diervverzorgers contacten met andere zebravisfaciliteiten en bezoeken regelmatig workshops over facility management. In de afgelopen jaren hebben wij een nieuw protocol voor het opkweken van larven geïntroduceerd. In plaats

van met droogvoer (fijn stofvoer) worden de larven nu in de eerste 2 weken gevoerd met rotiferen. De larven zijn hierbij na 2 weken zichtbaar groter dan bij het oude protocol en de overlevingspercentages liggen hoger. Iedere mogelijke maatregel die onze standaardkweek nog verder zou kunnen verbeteren zal ook ten goede komen aan de kweek van de mutante lijnen. Onze diervverzorgers hebben recentelijk een training in cryopreservatie gehad zodat wij in de nabije toekomst de onderhoudsfok verder kunnen terugbrengen door van lijnen die tijdelijk niet gebruikt worden sperma in te vriezen.

Wij zullen de ontwikkelingen op het gebied van mutagenese- en transgenesetechnieken nauwlettend volgen (via literatuurstudie, congressen) om de meest efficiënte methoden toe te passen en waar mogelijk verbeterde strategieën voor de productie van conditionele transgenexpressie/mutatie introduceren, waarmee de fok met ongerief mogelijk kan worden teruggebracht.

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

Er wordt gebruik gemaakt van de best mogelijke waterzuiveringsfilters. Het is in een aquarium echter onvermijdelijk dat de vissen in aanraking komen met verschillende microorganismen die in het water leven. Bacteriële filters zijn immers noodzakelijk voor het opruimen van de afvalstoffen van de vissen en dus een belangrijke bepalende factor voor de waterkwaliteit en het algemene welzijn van de vissen. Tussen de bacteriële filters en toestroom van het water naar de aquariumbakken zit een UV-filter waarmee de groei van ongewenste microorganismen in het water zoveel mogelijk wordt beperkt, maar dit geheel voorkomen is onmogelijk. De vissen worden dagelijks op gezondheid gecontroleerd door de diervverzorgers en zij zullen de dieren euthanaseren indien hier aanleiding toe is (zie humane eindpunten). Wij staan in contact met een bedrijf dat specialistische service in pathologisch onderzoek kan bieden, zodat wij in geval van een mogelijke ziekte een snelle route hebben om de vissen te laten onderzoeken en ongewenste besmetting van grotere aantallen dieren te voorkomen.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Niet van toepassing

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

Dieren worden verdoofd in 0,004% tricaine bij vinknippen t.b.v genotypering en bij afname van sperma t.b.v. cryopreservatie. Bij symptomen van ziekte worden de humane eindpunten toegepast.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Mogelijke verhoogde vatbaarheid voor ziekten.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De zebravissen hebben mogelijk een grotere vatbaarheid voor infecties vanwege een verminderd functioneren van de aangeboren immuunrespons.

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

De vissen worden dagelijks gecontroleerd. Humane eindpunten zijn gedefinieerd.

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

openstaande schubben, huidlaesies, kromme rug, ernstige vermagering, gezwollen buik, afwijkend zwemgedrag, lethargie, zakken naar de bodem; deze symptomen mogen zich niet langer dan 1 dag voordoen.

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

In de huidige situatie is er 1 mutant die met ongerief wordt gefokt. Bij deze mutant loopt gemiddeld 30% van de vissen de kans om de criteria voor toepassing van een humaan eindpunt te halen. De verwachting is dat fok met ongerief bij minder dan 10% van nieuw te genereren genetische gemodificeerde lijnen (met mutaties in genen betrokken bij de immuunafweer) van toepassing zal zijn en dat bij deze lijnen eveneens 30% van de vissen kans loopt om de criteria te halen. Waarneembare ziektesymptomen zullen zich niet langer dan 1 dag voordoen i.v.m. dagelijkse inspectie.

K. Classificatie van ongerief

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

Het vinknippen t.b.v. genotypering en het doden van vissen t.b.v. fenotypering (zonder waarneembare ziektesymptomen) wordt geclassificeerd als mild ongerief. In geval van fok met ongerief verwachten wij (op basis van ervaring [redacted]) dat gemiddeld niet meer dan 30% van de vissen die worden gekweekt tot een leeftijd van maximaal 1,5 jaar waarneembare ziektesymptomen zullen vertonen

(zoals gedefinieerd onder humane eindpunten) of dood worden gevonden terwijl er geen eerdere indicaties voor ziekte waren. Aangezien de dieren dagelijks geïnspecteerd worden zullen waarneembare symptomen zich niet langer dan een dag voordoen. Het ongerief wordt daarom geclassificeerd als matig. Voor de overige vissen van dezelfde families (70%), die mogelijk subklinische symptomen dragen, is de classificatie licht ongerief.

Overzicht:

Beschrijving negatieve effecten	aantal	classificatie
wel/geen vinknip & doden t.b.v. fenotypering	2500 zebravissen	licht
wel/geen vinknip, wel/geen sperma-afname & fok met subklinische symptomen	3500 zebravissen	licht
wel/geen vinknip, wel/geen sperma-afname & fok met klinische symptomen	1500 zebravissen	matig

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

De fokdieren worden gebruikt om embryo's te produceren t.b.v. het onderzoek naar het aangeboren immuunsysteem. Deze dieren worden aanhouden zolang zij gezond zijn en fertiel. De fokdieren worden gedood in geval van ziektesymptomen of bij het bereiken van een leeftijd van 1,5 jaar omdat oudere vissen gevoeliger zijn voor infecties en minder fertiel. Indien er redenen zijn om aan te nemen dat een genetische modificatie tot een fenotype zou kunnen leiden, dan zal een beperkt aantal van de fokdieren worden gedood voor nadere karakterisering van het effect van de mutatie.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

De dieren worden gedood met een overdosis verdovingsmiddel (i.e. een methode uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU) of in een bad van ijswater. Deze laatste methode verdient de voorkeur in geval dat het verdovingsmiddel zou kunnen interfereren met fenotypering (bijvoorbeeld metabole analyses). Voor toepassing van de ijswatermethode zal een ontheffing worden aangevraagd bij de NVWA (zoals al verleend aan andere instituten in Nederland).

Ja

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD1060020171767
2. Titel van het project: Constructie en fok van genetisch gemodificeerde zebravislijnen met potentieel ongerief ten behoeve van onderzoek naar het immuunsysteem.
3. Titel van de NTS: De zebravis als model voor onderzoek naar het immuunsysteem.
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: DEC Leiden
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
 - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: 22-06-2017
 - aanvraag compleet: 22-06-2017
 - in vergadering besproken: 06-07-2017
 - anderszins behandeld: via emailronde
 - termijnonderbreking(en) van 11-07-2017 t/m 14-07-2017
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 14-07-2017
 - advies aan CCD: 18-07-2017
7. De IvD geeft aan dat de aanvrager de aanvraag met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD
8. Eventueel horen van aanvrager
N.v.t.
9. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: 11-07-2017
 - Strekking van de gestelde vragen:
De DEC heeft bij de aanvrager aanvullende informatie ingewonnen met betrekking tot de titel, het doel van de aanvraag, vervanging, verfijning, de humane eindpunten en de omvang van de NTS.
 - Naar aanleiding van deze vragen is het projectvoorstel inclusief bijlage en NTS naar tevredenheid door de aanvrager aangepast.
10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)
N.v.t.

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

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

2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om over deze projectaanvraag te adviseren. De benodigde expertise op dit wetenschappelijke terrein is aanwezig binnen de DEC.
4. Geen van de DEC leden is betrokken bij het betreffende project.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. Het betreft een project voor de constructie en fok van genetisch gemodificeerde zebravislijnen met potentieel ongerief. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.
2. Voor zover de DEC kan beoordelen is er geen sprake van tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van dit project is het maken van nieuwe genetisch gemodificeerde zebravismodellen om het aangeboren immuunsysteem te bestuderen. Het uiteindelijke doel is het verkrijgen van nieuwe inzichten in de moleculaire mechanismen die ten grondslag liggen aan stress- en immuun-gerelateerde ziekten, waaronder infectieziekten, ontstekingsziekten, metabole ziekten en kanker. De DEC is van mening dat er een duidelijke relatie is tussen het directe en uiteindelijk doel. De aanvrager heeft helder gemaakt wat de status is van het onderzoeksveld en wat de bijdrage van dit project aan het onderzoeksveld zal zijn.). Omdat de genetische componenten van het immuunsysteem tussen zebravis en andere vertebraten in grote mate geconserveerd zijn, biedt het gebruik van de zebravis als modelsysteem voor immuniteit een meerwaarde bij wetenschappelijke vraagstellingen die in andere vertebraten onderzoekstechnisch moeilijk te beantwoorden zijn. Er is de afgelopen jaren veel geïnvesteerd in de ontwikkeling van tal van transgene lijnen waarin de verschillende celtypen van het immuunsysteem of onderdelen daarvan fluorescent gelabeld zijn en transgene lijnen die fluorescente reportergenen bevatten waarmee de activatie van verschillende componenten van de immuunrespons kan worden gevisualiseerd. Met behulp van deze transgene lijnen kan de interactie van immuuncellen met pathogenen of met kankercellen zeer gedetailleerd bestudeerd worden. De zebravisembryo's zijn bovendien erg geschikt voor het ontwikkelen van nieuwe methoden voor drug screening. De DEC is van mening dat het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.
5. De belangrijkste belanghebbenden in dit project dat gericht is op het genereren en fokken van genetisch gemodificeerde zebravislijnen om embryo's/larven te produceren waarmee de functie wordt onderzocht van genen die betrokken zijn bij de aangeboren afweer tegen infecties zijn de proefdieren, de onderzoekers, en patiënten met stress- en immuungerelateerde ziektes.
Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal

worden aangetast, de dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en zullen mogelijk ongerief ondervinden als gevolg van het fenotype. Waarden die voor de onderzoekers bevorderd worden: Het zebravismodel biedt nieuwe mogelijkheden voor het bestuderen van deze ziekten in meerdere stadia van immuniteit, waarbij gebruik gemaakt kan worden van transgene vissen met fluorescent gemarkeerde immuuncellen en van collecties van mutanten voor genetisch onderzoek. Hierdoor zullen de wetenschappers kennis verkrijgen. Ook zullen de carrièremogelijkheden van de wetenschappers verbeteren door publicaties.

Waarden die voor de patiënten bevorderd worden: Een beter begrip van de onderliggende mechanismen bij stress- en immuungerelateerde ziektes zal mogelijk leiden tot de identificatie van targets voor nieuwe therapeutische strategieën voor bijvoorbeeld tuberculose, diabetes of kanker.

6. Voor zover de DEC kan beoordelen is er geen sprake van substantiële milieueffecten.

Proefopzet en haalbaarheid

7. Naar de overtuiging van de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie binnen de gevraagde termijn te realiseren. [REDACTED]

[REDACTED]. Om up-to-date te blijven en ervaringen uit te wisselen worden regelmatig andere faciliteiten en congressen over de kweek van zebravissen bezocht. Daarnaast is er binnen de zebraonderzoeksgemeenschap een nauwe samenwerking waardoor men goed op de hoogte is van het onderzoek dat bij andere instituten wordt uitgevoerd en kennisuitwisseling op dit onderzoeksgebied wordt bevorderd. Tevens beschikt men over ruime financiering uit verschillende bronnen.

8. De DEC is er van overtuigd dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten en geen hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten in de weg zullen staan. De voorgestelde strategie is logisch en helder gekozen en kan naar de mening van de DEC leiden tot het behalen van de doelstelling binnen de looptijd van het project.

Welzijn dieren

9. Alle dieren worden gefokt bij een geregistreerd fokbedrijf voor het gebruik in dierproeven, er is geen sprake van afwijkende huisvesting en/of hergebruik. Er is geen sprake van bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, zwerfdieren en/of dieren uit het wild. De toegepaste methoden voor anesthesie, analgesie en euthanasie zijn conform de Richtlijn. De keuze voor het doden dmv ijswater is naar inziens van de DEC voldoende onderbouwd.

10. De DEC is ervan overtuigd dat de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn. [REDACTED] en uitsluitend bevoegd en competent personeel zal zorg dragen voor de verzorging van de dieren.

11. De DEC heeft zich ervan verzekerd dat de aanvrager al het mogelijke heeft gedaan om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen. Naar inziens van de DEC ondervindt het merendeel van de vissen cumulatief maximaal mild ongerief als gevolg van de vinknip, spermaafname of subklinische symptomen van het fenotype. Een deel van de vissen zal echter cumulatief maximaal matig ongerief ondervinden als gevolg van klinische symptomen van het fenotype. Deze inschatting is in overeenstemming met het

niveau van het ongerief ingeschat door de onderzoekers.

12. De integriteit van dieren wordt fysiek aangetast doordat de dieren genetisch gemodificeerd zijn. De integriteit zal ook gedragsmatig worden aangetast. Gedurende het project worden de dieren namelijk beperkt in hun bewegingsvrijheid. Hierdoor zullen de dieren minder natuurlijk gedrag kunnen vertonen.
13. Naar mening van de DEC zijn de humane eindpunten zorgvuldig beschreven en is de inschatting van de incidentie met betrekking tot het bereiken van een humaan eindpunt eveneens zorgvuldig beschreven in de projectaanvraag.

3V's

14. In het project wordt de keuze voor de diermodellen duidelijk onderbouwd. De betrokken dieren en het gekozen diermodel zijn het meest geschikt voor deze studieopzet. De desbetreffende dierproef berokkent de dieren het minste pijn, lijden, angst of blijvende schade. Als modelorganisme biedt de zebravis een aantal specifieke voordelen ten opzichte van bijvoorbeeld de muis. De externe ontwikkeling en optische transparantie van de zebravisembryo's maken dit model bij uitstek geschikt voor niet-invasieve microscopische imagingstudies waarbij nieuwe inzichten in de functies van immuuncellen verkregen kunnen worden. Andere proefdieren, zoals de muis, hebben geen externe embryo-ontwikkeling en hierbij zijn dergelijke imagingstudies zonder invasieve technieken niet mogelijk. De bestudering van vroege ontwikkelingsaspecten van immuniteit. De DEC is ervan overtuigd dat er geen alternatieven beschikbaar zijn voor het voorgestelde gebruik van intacte dieren om de doelstelling van dit project te realiseren. Vervanging door cel-of orgaankweken is niet mogelijk, omdat het hier onderzoek betreft naar complexe ziekten en de interactie met het immuunsysteem *in vivo*.
15. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereisten van vermindering van dierproeven. Voor het genereren van de genetisch gemodificeerde zebravislijnen zal de meest efficiënte methode gebruikt worden. Tevens zal cryopreservatie toegepast worden op lijnen die tijdelijk niet gebruikt worden. De DEC is ervan overtuigd dat het onderzoek ethisch verantwoord zal worden uitgevoerd. De DEC acht het maximale aantal te gebruiken dieren realistisch geschat.
16. De uitvoering van het project is in overeenstemming met de vereisten van verfijning van dierproeven en is zo opgezet dat de dierproeven met zo min mogelijk ongerief worden uitgevoerd. Bij de opzet van dit onderzoek wordt rekening gehouden met dierenwelzijn door het gebruik van adequate anesthesie en analgesie waar nodig. Daarnaast zullen er geen lijnen gekweekt worden met een algehele immuundeficiëntie om zo de vatbaarheid voor infecties zo laag mogelijk te houden. De DEC is ervan overtuigd dat de beschreven dierproeven zo humaan mogelijk zullen worden uitgevoerd.
17. Het betreft hier geen wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. De aanvrager zal in het project zowel mannelijke als vrouwelijke zebravissen gebruiken.
19. De fokdieren worden gebruikt om embryo's te produceren t.b.v. het onderzoek naar het aangeboren immuunsysteem. Deze dieren worden aanhouden zolang zij gezond en fertiel zijn. Een deel van de fokdieren wordt gedood voor nadere karakterisering van het effect van de genetische modificatie. Het doden van de dieren gebeurt

volgens een voor de diersoort passende dodingsmethode die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Voor het doden dmv de ijswatermethode zal een ontheffing aangevraagd worden zoals eerder verleend is aan andere instituten in Nederland.

20. Er worden voor dit projectvoorstel geen niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren gebruikt.

NTS

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

D. Ethische afweging

1. Rechtvaardigt het maken van nieuwe genetisch gemodificeerde zebrawismodellen om het aangeboren immuunsysteem te bestuderen, met als uiteindelijke doel het verkrijgen van nieuwe inzichten in de moleculaire mechanismen die ten grondslag liggen aan stress- en immuun-gerelateerde ziekten, waaronder infectieziekten, ontstekingsziekten, metabole ziekten en kanker het ongerief dat de dieren wordt aangedaan?

2. Project gericht op het genereren en fokken van genetisch gemodificeerde zebrawislijnen om embryo's/larven te produceren waarmee de functie wordt onderzocht van genen die betrokken zijn bij de aangeboren immuunafweer tegen infecties.

Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: matig nadeel.

Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: groot voordeel.

Waarden die voor de patiënten bevorderd worden: matig voordeel.

De DEC is van mening dat de belangen van de samenleving in het algemeen en de onderzoekers en patiënten in het bijzonder in dit project zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren.

De zebrawis is een wetenschappelijk belangrijk modelorganisme voor onderzoek naar humane ziekten omdat het immuunsysteem van de zebrawis grote overeenkomsten vertoont met dat van de mens. Bij infectieziekten, ontstekingsziekten, kanker, en diverse andere ziekten speelt het immuunsysteem een grote rol. Het zebrawismodel biedt nieuwe mogelijkheden voor het bestuderen van deze ziekten in meerdere stadia van immuniteit, zowel tijdens de ontwikkeling als bij een volledig ontwikkeld immuunsysteem, waarbij gebruik gemaakt kan worden van transgene vissen met fluorescent gemarkeerde immuuncellen en van collecties van mutanten voor genetisch onderzoek. Het genereren en fokken van genetisch gemodificeerde zebrawislijnen is van essentieel belang voor de productie van embryo's/larven om de functie van genen die betrokken zijn bij de aangeboren immuunafweer tegen infecties te kunnen onderzoeken. De onderzoekers doen er echter alles aan om het lijden van de dieren te beperken, waardoor het ongerief van de dieren zo veel mogelijk beperkt blijft.

3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstelling van dit project. De DEC is van mening dat de waarden die voor de doelgroep bevorderd kunnen worden zwaarder wegen dan de waarden die voor de proefdieren in het geding zijn. Het project is goed opgezet. De DEC is bovendien van mening dat de voorgestelde opzet logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstelling en dat de gekozen strategie kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De DEC is er verder van overtuigd dat de onderzoeksgroep voldoende ervaring heeft met de

gekozen onderzoeksstrategie om de doelstelling te behalen en dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren alsmede het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. De DEC onderschrijft dat de doelstelling niet zonder het gebruik van proefdieren behaald kunnen worden en acht het gebruik van het aantal dieren en het daarmee samenhangende ongerief bij de dieren gerechtvaardigd.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

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

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

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Leiden

Postbus 9502

2300 RA LEIDEN



**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
AVD1060020171767

Bijlagen

2

Datum 2 augustus 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 1 augustus 2017. Het gaat om uw project "Constructie en fok van genetisch gemodificeerde zebravislijnen met potentieel ongerief ten behoeve van onderzoek naar het immuunsysteem". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1060020171767. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Datum:

2 augustus 2017

Aanvraagnummer:

AVD1060020171767

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
2 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD1060020171767

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10600
Naam instelling of organisatie: Universiteit Leiden
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 27 36 89 29
Straat en huisnummer: Rapenburg 70
Postbus: 9502
Postcode en plaats: 2300 RA LEIDEN
IBAN: [REDACTED]
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: Universiteit Leiden /Faculteit W&N

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
2 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD1060020171767

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum: 1 januari 2018
Geplande einddatum: 31 december 2022
Titel project: Constructie en fok van genetisch gemodificeerde zebravislijnen met potentieel ongerief ten behoeve van onderzoek naar het immuunsysteem
Titel niet-technische samenvatting: De zebravis als model voor onderzoek naar het immuunsysteem
Naam DEC: DEC Leiden
Postadres DEC: Postzone: [REDACTED] LUMC Postbus 9600 2300 RC Leiden
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1035,-
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:



Functie:

Gemandateerd vergunninghouder

Plaats:

Leiden

Datum:

25 juli 2017

Datum:

2 augustus 2017

Aanvraagnummer:

AVD1060020171767



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Leiden

Postbus 9502

2300 RA LEIDEN



**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
AVD1060020171767

Bijlagen

2

Datum 2 augustus 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 2 augustus 2017

Vervaldatum: 1 september 2017

Factuurnummer: 171767

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1060020171767	€ 1035,-

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.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Leiden

Postbus 9502

2300 RA LEIDEN



**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
AVD1060020171767

Datum 11 augustus 2017
Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Op 1 augustus 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Constructie en fok van genetisch gemodificeerde zebravislijnen met potentieel ongerief ten behoeve van onderzoek naar het immuunsysteem" met aanvraagnummer AVD1060020171767. 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:

Niet technische samenvatting

De opbrengsten beschreven onder 3.2 beschrijven met name de opbrengsten van het uiteindelijke doel. Kunt u deze tekst aanpassen en meer toespitsen op het directe doel van onderliggend project?

Leges

De leges die u verschuldigd bent zijn nog niet door ons ontvangen of de betaling is nog niet verwerkt. Uw aanvraag is niet compleet als de leges niet zijn ontvangen.

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

Opsturen binnen veertien dagen

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

Datum:

11 augustus 2017

Aanvraagnummer:

AVD1060020171767

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. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Bijlagen:

- Melding bijlagen



Melding bijlagen

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

1 Uw Gegevens

Naam instelling: Universiteit Leiden

Adres:

Postcode en plaats:

Aanvraagnummer: AVD1060020171767

2 Bijlagen

Welke bijlagen stuurt u mee?

Vink de bijlagen aan of vul de naam of omschrijving in.

Projectvoorstel

Beschrijving Dierproeven

Niet-technische samenvatting

Melding Machtiging

Aanvraagformulier

.....

.....

.....

Datum:

11 augustus 2017

Aanvraagnummer:

AVD1060020171767

3 Ondertekening

Naam:

Datum: - -

Handtekening:

Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Leiden

Postbus 9502

2300 RA LEIDEN



**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

AVD1060020171767

Bijlagen

1

Datum 14 september 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 1 augustus 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Constructie en fok van genetisch gemodificeerde zebravislijnen met potentieel ongerief ten behoeve van onderzoek naar het immuunsysteem" met aanvraagnummer AVD1060020171767. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 21 augustus 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Op ons verzoek is de NTS aangepast waardoor deze beter aansluit bij het directe doel van het project.

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.

De algemene voorwaarde(n) zijn opgenomen op grond van artikel 1d lid 4, artikel 10a1 lid 2, artikel 10 lid 2 en/of artikel 10a3 van de wet.

De voorwaarde betreffende de rapportage geldt omdat de CCD hiermee vorm geeft aan de maatregelen die volgen uit het advies van het NCad; 'genetisch gemodificeerde dieren in voorraad gedood' en de oproep van de Staatssecretaris die volgt uit de voortgangsrapportage van 1 november 2015.

U kunt met uw project "Constructie en fok van genetisch gemodificeerde zebravislijnen met potentieel ongerief ten behoeve van onderzoek naar het immuunsysteem" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Leiden gevoegd. Dit advies is opgesteld op 18 juli 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.

Bezwaar

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

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

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

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

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

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

Meer informatie

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

Datum:

14 september 2017

Aanvraagnummer:

AVD1060020171767

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

Datum:
14 september 2017
Aanvraagnummer:
AVD1060020171767



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: Universiteit Leiden
Adres: Postbus 9502
Postcode en plaats: 2300 RA LEIDEN
Deelnemersnummer: 10600

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022, voor het project "Constructie en fok van genetisch gemodificeerde zebravislijnen met potentieel ongerief ten behoeve van onderzoek naar het immuunsysteem" met aanvraagnummer AVD1060020171767, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Leiden. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is hoogleraar immunobiologie. Voor de uitvoering van het project is hoogleraar cellulaire tumorbiologie verantwoordelijk. De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 1 augustus 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 1 augustus 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 21 augustus 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 18 juli 2017, ontvangen op 1 augustus 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 21 augustus 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Constructie en fok van genetisch gemodificeerde zebravislijnen met potentieel ongerief				
	Zebravissen (Danio rerio) /	7.500	20% Matig 80% Licht	

Voorwaarden

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

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

Aanvraagnummer:
AVD1060020171767

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.

Elk jaar wordt, voor 1 april, op basis van de registratie voor de NVWA een rapportage gedaan aan de CCD, betreffende de fok; het aanhouden van lijnen met ongerief. U beschrijft hierbij welke aantallen dieren in de fok zijn ingezet, voor het aantal dieren dat is gefokt beschrijft u hoeveel dieren in de experimenten zijn ingezet, hoeveel dieren in voorraad zijn gedood wegens ongeschikt genotype of in voorraad zijn gedood wegens overtollig. U licht hierbij ook toe welke maatregelen u neemt om het aantal dieren in voorraad gedood terug te dringen.



Aanvraagnummer:
AVD1060020171767

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:
AVD1060020171767

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.