

Inventaris Wob-verzoek W17-11										
			wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document NTS 20171826	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1	
1	Origineel aanvraagformulier				x		x			
2	NTS	x								
3	Projectvoorstel									
4	Bijlage beschrijving dierproeven				x	x	x	x		
5	DEC advies				x	x	x	x		
6	Ontvangstbevestiging en factuur				x		x			
7	Adviesnota CCD		x						x	
8	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.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl) of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

## 1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > <i>Vul uw deelnemernummer in</i>   10300 <input type="checkbox"/> Nee > <i>U kunt geen aanvraag doen</i>															
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">Naam instelling of organisatie</td> <td>Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen</td> </tr> <tr> <td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td> <td>Instantie voor dierenwelzijn</td> </tr> <tr> <td>KvK-nummer</td> <td>4 1 0 5 5 6 2 9</td> </tr> </table>	Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	Instantie voor dierenwelzijn	KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9									
Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen																
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	Instantie voor dierenwelzijn																
KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9																
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>	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">Straat en huisnummer</td> <td colspan="2" style="background-color: black; color: white;">[Redacted]</td> </tr> <tr> <td>Postbus</td> <td colspan="2" style="background-color: black; color: white;">[Redacted]</td> </tr> <tr> <td>Postcode en plaats</td> <td>6500HB</td> <td>Nijmegen</td> </tr> <tr> <td>IBAN</td> <td colspan="2">NL90ABNA0231209983</td> </tr> <tr> <td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td> <td colspan="2">UMC St Radboud</td> </tr> </table>	Straat en huisnummer	[Redacted]		Postbus	[Redacted]		Postcode en plaats	6500HB	Nijmegen	IBAN	NL90ABNA0231209983		Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud	
Straat en huisnummer	[Redacted]																
Postbus	[Redacted]																
Postcode en plaats	6500HB	Nijmegen															
IBAN	NL90ABNA0231209983																
Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud																
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">(Titel) Naam en voorletters</td> <td colspan="2" style="background-color: black; color: white;">[Redacted]</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td colspan="2" style="background-color: black; color: white;">[Redacted]</td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td colspan="2" style="background-color: black; color: white;">[Redacted]</td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td colspan="2" style="background-color: black; color: white;">[Redacted]</td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td colspan="2" style="background-color: black; color: white;">[Redacted]</td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]		Functie	[Redacted]		Afdeling	[Redacted]		Telefoonnummer	[Redacted]		E-mailadres	[Redacted]	
(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]																
Functie	[Redacted]																
Afdeling	[Redacted]																
Telefoonnummer	[Redacted]																
E-mailadres	[Redacted]																
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">(Titel) Naam en voorletters</td> <td colspan="2" style="background-color: black; color: white;">[Redacted]</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td colspan="2" style="background-color: black; color: white;">[Redacted]</td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td colspan="2" style="background-color: black; color: white;">[Redacted]</td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td colspan="2" style="background-color: black; color: white;">[Redacted]</td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td colspan="2" style="background-color: black; color: white;">[Redacted]</td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]		Functie	[Redacted]		Afdeling	[Redacted]		Telefoonnummer	[Redacted]		E-mailadres	[Redacted]	
(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]																
Functie	[Redacted]																
Afdeling	[Redacted]																
Telefoonnummer	[Redacted]																
E-mailadres	[Redacted]																

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

(Titel) Naam en voorletters

Functie

Afdeling

Telefoonnummer

E-mailadres

Instantievoor Dierenwelzijn

- 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 0 1 . 0 1 . 2 0 1 8

Einddatum 3 1 . 1 2 . 2 0 2 2

- 3.2 Wat is de titel van het project?

Gene-regulatory control of embryonic development

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

Hoe genen de embryonale ontwikkeling aansturen

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

Naam DEC

Postadres

E-mailadres

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1.287,00 Lege  
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.  
*Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*
- Via een eenmalige incasso  
 Na ontvangst van de factuur

## 5 Checklist bijlagen

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

## 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 1.6). 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	Instantie voor dierenwelzijn
Plaats	Nijmegen
Datum	2 3 - 0 5 - 2 0 1 7
Handtekening	

**Form  
Project proposal**

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

## 1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
1.3	Provide the title of the project.	Gene regulatory control of embryonic development

## 2 Categories

2.1	Please tick each of the following boxes that applies to your project.	<input checked="" type="checkbox"/> Basic Research <input type="checkbox"/> Translational or applied research <input type="checkbox"/> Regulatory use of routine production <input type="checkbox"/> Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare dier <input type="checkbox"/> Research aimed at preserving the species subjected to procedures
-----	---	---

---

Higher education or training

Forensic enquiries

Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

---

## 3 General description of the project

### 3.1 Background

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

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

Almost any cell in our body has the intrinsic ability to become virtually any other type of cell. From this Nobel-prize winning discovery (2012, Yamanaka and Gurdon) it follows that it should be possible to generate patient-derived cells or tissues to cure or alleviate a range of medical problems. To realize this medical potential in a safe and effective way and to “work with, not against biology”, it is important to understand cellular potency and differentiation in the context of normal embryonic development (Badylak 2016; Gupta 2016). This is the focus in the field of developmental biology, which studies how the fertilized egg or oocyte can develop into a complete body with fully functional tissues and organs. Animal model systems are essential to further our understanding of the developmental origins of congenital disease. Embryos of the amphibian *Xenopus* species, which are the focus of the project described here, represent an excellent non-mammalian model system for development and differentiation (Harland and Grainger 2011). Among the advantages is the external development of the embryos, which makes them experimentally accessible without the need for invasive perturbation, which is a significant advantage both from a practical and refinement perspective. Relatively large numbers of these embryos can be obtained, which readily enables biochemical approaches to gene regulation such as chromatin immunoprecipitation (ChIP) and proteomics analyses [REDACTED]; Gentsch et al. 2013; [REDACTED]). There are also well-developed experimental approaches in this model, including gene perturbation (knockdown, CRISPR-Cas9, overexpression) and embryological manipulations such as microdissection of pluripotent cells of the animal cap. Studies of early embryonic gene function in *Xenopus* have contributed enormously to elucidating the molecular properties and functional roles of genes, including genes involved in human cancer and disease (Hardwick and Philpott 2015; Tandon et al. 2016; Naert et al. 2017; Sater and Moody 2017). Moreover, they have served to provide powerful paradigms in molecular, cellular, developmental and cancer biology. It is a very good model system for exploring molecular mechanisms of gene regulation and for studying the earliest stages of vertebrate embryonic development.

The genomes of both *X.* [REDACTED] (true diploid) and *X.* [REDACTED] (allo-tetraploid) have been sequenced ([REDACTED]). The *X.* [REDACTED] genome has a very similar gene content compared to the human genome and also has maintained a large extent of shared synteny with human chromosomes ([REDACTED]). *X.* [REDACTED] on the other hand has a unique natural history that features a whole genome duplication after interspecific hybridization, making it a very interesting model for genome evolution ([REDACTED]). Interspecific hybridization followed by duplication is common in plants but rare in animals, yet two rounds of whole genome duplication have been inferred at the root of the vertebrate

lineage (Ohno 1999; Dehal and Boore 2005). Moreover, duplications and gene loss are important in the context of cancer, yet how they play a role has not yet been fully elucidated.

Within the cell's nucleus, genomic DNA is packaged in chromatin. The biochemical features of chromatin, such as post-translational modifications of histone proteins or the accessibility of chromatin, determine its function and contribution to gene regulation ([REDACTED]). These biochemical features can be profiled using chromatin immunoprecipitation (ChIP-sequencing) and accessibility assays (ATAC-sequencing), allowing the comprehensive identification of the functional elements (enhancers and promoters) in the genome. Using ChIP-sequencing most of the regulatory elements involved in embryonic development have been identified ([REDACTED]).

However, other approaches are necessary to translate these data in a fuller understanding of the mechanisms that drive early development, including pluripotency, germ layer commitment and patterning. First, it is essential to obtain information on cellular heterogeneity and cellular trajectories of lineage commitment by single cell RNA-sequencing (scRNA-seq) in a way that retains spatial information based on microdissection of specific regions of the developing embryo. Second, it is necessary to infer the gene-regulatory networks underlying early development. These networks consist of information on the extent to which transcription factors bind to the enhancers and promoters in the genome. It is necessary to integrate these embryonic gene-regulatory networks with spatio-temporal gene expression and chromatin state information and how they control developmental processes in developmental time and space. Third, it is necessary to understand how the regulatory circuitry of early development is conserved between species. Accomplishing these scientific aims will provide extremely valuable information for the community of developmental biology. The project will shed more light on normal development, gene regulation and genome evolution and accelerate the analysis of the developmental origins of disease.

#### References

[REDACTED]  
[REDACTED]  
Badylak S. 2016. Perspective: Work with, not against, biology. *Nature* **540**: S55.

[REDACTED]  
Dehal P, Boore JL. 2005. Two rounds of whole genome duplication in the ancestral vertebrate. *PLoS biology* **3**: e314.

[REDACTED]  
Gentsch GE, Owens ND, Martin SR, Piccinelli P, Faial T, Trotter MW, Gilchrist MJ, Smith JC. 2013. In vivo T-box transcription factor profiling reveals joint regulation of embryonic neuromesodermal bipotency. *Cell reports* **4**: 1185-1196.

Gupta S. 2016. Animal models: Unlock your inner salamander. *Nature* **540**: S58-s59.

Hardwick LJ, Philpott A. 2015. An oncologists friend: How *Xenopus* contributes to cancer research. *Developmental biology* **408**: 180-187.

Harland RM, Grainger RM. 2011. *Xenopus* research: metamorphosed by genetics and genomics. *Trends in genetics : TIG* **27**: 507-515.

[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]

Ohno S. 1999. Gene duplication and the uniqueness of vertebrate genomes circa 1970-1999. *Seminars in cell & developmental biology* **10**: 517-522.

Sater AK, Moody SA. 2017. Using *Xenopus* to understand human disease and developmental disorders. *Genesis (New York, NY : 2000)* **55**.

### 3.2 Purpose

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

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

The purpose of the animal experiments in this project is to induce egg-laying in female *Xenopus* and obtain embryos through *in vitro* fertilization. The embryos obtained, which are not considered experimental animals by law, are the study objects for analyses of developmental gene regulation. The specific aims of this project are (1) to uncover cellular heterogeneity and stochasticity as well as cellular trajectories in the late blastula and early gastrula embryo by single cell sequencing; (2) to elucidate the transcription factor network and the epigenetic mechanisms underlying pluripotency and germ layer commitment; (3) to uncover the extent to which the early embryonic gene regulatory network has been rewired in the allo-tetraploid frog *X. [redacted]* compared to the diploid frog *X. [redacted]*. These aims will contribute to identifying the molecular mechanisms of gene regulation during the earliest stages of embryogenesis (blastula and gastrula stages) including the onset of zygotic transcription, pluripotency and germ layer commitment.

### 3.3 Relevance

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

The work described contributes to developing the fundamental knowledge infrastructure of normal embryonic development and differentiation and the gene regulatory processes it involves. This is of crucial importance for profound medical problems including congenital disease, regenerative medicine and cancer.



Scientifically, the work is at the forefront of the endeavors to understand the information encoded in the genome and how it is utilized in development and differentiation. The research explores the as of yet uncharted territory of how gene regulation in development works and how the developmental instructions embedded in genomic information are progressively unlocked in a highly regulated fashion. The applicant has extensive expertise and experience in this research area (experimental methods, computational expertise, animal model system, and scientific area). Research funding has been received by the US National Institutes of Health (NICHD, foreign R01 grant) and the European Union (Coordinator of DevCom, a Marie Curie European training network for Developmental and Computational Biology). The expertise is documented is documented by the applicant's track record [REDACTED] which includes papers in Cell, Nature Communications, Nature Genetics, Developmental Cell and Nature (selected publications of the last five years).

---

### **3.4 Research Strategy**

---

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

---

The objective is obtaining *Xenopus* embryos for experimentation and sample collection. The embryos themselves are not subject to the law on animal experimentation. The animal experiment therefore consists of the procedures to obtain eggs and sperm for *in vitro* fertilization.

---

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

---

There are two animal experimental procedures involved in the work:

- Induction of ovulation in *Xenopus* females
- Sacrificing *Xenopus*

The animal experiment involves hormonal stimulation of female *Xenopus* by subcutaneous injection of chorionic gonadotropin. This will induce egg-laying and the resulting eggs can be used to obtain embryos using *in vitro* fertilization (ivf) of eggs. Sperm for ivf is obtained from testes removed from sacrificed male *Xenopus*.

For the scientific experiments the embryos are kept until larval stages (at the latest, typically to blastula or gastrula stages) and are not subject to the law on animal experimentation.

The majority of experiments will be done with *X.* [REDACTED] embryos, but a few experiments will be performed with *X.* [REDACTED] to compare gene regulation in *X.* [REDACTED] with *X.* [REDACTED] and to achieve Aim 3 (cf. Purpose). The specifics for the two species are only subtly different (dosage of hCG), conceptually they are very similar and there is no difference in the level of discomfort.

---

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

---

The animal experiments that form the basis of the scientific project have a very simple and coherent structure. The animal procedures in each case are the same: Eggs will be obtained from female *Xenopus* and sperm from male *Xenopus*. This will be done up to twice a week. Individual female *Xenopus* will be part of the animal experiment following the first hCG injection to collect eggs. They will rest for at least three months before being used for egg collection again and are part of the animal experiment for the duration of the project or their unintended death, whichever comes first.

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

Serial number	Type of animal procedure
1	Xenopus females for egg production
2	Xenopus males

**Appendix**  
**Description animal procedures**

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

## 1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen				
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	<table border="1"><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Xenopus females for egg [REDACTED]</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	1	Xenopus females for egg [REDACTED]
Serial number	Type of animal procedure					
1	Xenopus females for egg [REDACTED]					

## 2 Description of animal procedures

### A. Experimental approach and primary outcome parameters

---

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

---

Induced ovulation will be used to obtain eggs from female *Xenopus*. The eggs will be fertilized *in vitro*. The resulting embryos will be used to study gene regulation during embryonic development. Egg production is the primary outcome of the experiment.

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

---

Day 1: Female *Xenopus* [REDACTED] will be injected subcutaneously with a low dose chorionic gonadotropin to pre-prime the oocytes for maturation. This step is not necessary for *X.* [REDACTED] females.

Day 3: Female *Xenopus* will be injected subcutaneously with a higher dose of chorionic gonadotropin (adjusted to the species). Within 3-6 hours the *X.* [REDACTED] female starts laying eggs. For *X.* [REDACTED] this is 12-18 hours. Fresh eggs will be obtained by squeezing (applying gentle pressure to the abdomen).

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

---

As the scientific experiments focus on embryos (studying Gene-regulatory control of embryonic development), and several hundreds of eggs (100-400) can be obtained from a single ovulating *Xenopus* female, the statistics of animal use (adult females) are mainly based on securing a steady and on-demand supply of eggs. Around 150 embryos are typically required for a single microinjection experiment. For sample collection for ChIP (chromatin immunoprecipitation) 300 embryos are required.

Further considerations are that egg quality is highly variable between individuals, necessitating the use of several females on a given day for egg production. Also, females periodically cease laying eggs. The reasons for this phenomenon are unknown and it commonly affects all individuals in a tank. Although it has often been suggested to relate to seasonal influences, individuals in other tanks are often not affected and the real causes for periodic paucity in egg production remain unknown. Typically the frogs resume egg laying after several months (in addition to the minimum of three months between induced ovulations). This necessitates maintaining several batches of frogs.

*X.* [REDACTED] Embryos need to be obtained twice a week, on average 40 weeks a year. Five female *Xenopus* are used each time given variations in egg quality and egg production. This amounts to 5 females x 2 times a week x 40 weeks = 400 times a year a female is hormonally stimulated for egg production. Females are rested for a minimum of three months before being injected for egg production again, so theoretically the minimum colony of females is 100. In practice the females are used between once or twice a year because of the periodic cessation of egg production (explained above). In practice a continuous population of 400 females (four times the minimal number, maintained in multiple tanks) is necessary to maintain a robust regime of embryo collection twice a week. There is a spontaneous death rate of up to 10% per year. This is due to age (females are used for egg production until they die) and some also die due to infections (mainly 'red leg', which is an immune insufficiency for commensal

aqueous bacteria). This requires an additional 40 females a year, so over the duration of the project an additional 200 females. This brings the total number of *X. [REDACTED]* females required to 600.

*X. [REDACTED]* Embryos need to be obtained from *X. [REDACTED]* a limited number of times, estimated once per month. Five female *Xenopus* are used each time given variations in egg quality and egg production. This amounts to 5 females x 12 times a year = 60 times a year a female is hormonally stimulated for egg production. Females are rested for a minimum of three months before being injected for egg production again, so theoretically the minimum colony of females is 15. In practice the females are used between once or twice a year because of the periodic cessation of egg production (explained above). In practice a continuous population of 60 females (four times the minimal number, maintained in multiple tanks) is necessary to maintain a robust regime of embryo collection. There is a spontaneous death rate of up to 10% per year (explained above). This requires an additional 6 females a year, so over the duration of the project an additional 30 females. This brings the total number of *X. [REDACTED]* females required to 90.

## B. The animals

---

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

---

Embryos of the amphibian *Xenopus* species represent an excellent non-mammalian model system for development and differentiation. Among the advantages is the external development of the embryos, which makes them experimentally accessible without the need for invasive perturbation, which is a significant advantage both from a practical and refinement perspective. Relatively large numbers of these embryos can be obtained, which readily enables biochemical approaches to gene regulation. In addition there are well-developed experimental approaches in this model, including gene perturbation and embryological manipulations such as microdissection of pluripotent cells of the animal cap. Studies of early embryonic gene function in *Xenopus* have contributed enormously to elucidating the molecular properties and functional roles of genes, including genes involved in human cancer and disease. *Xenopus [REDACTED]* is used because of its true diploid genome and similar gene content compared to human. Allo-tetraploid *Xenopus [REDACTED]* is an emerging model for genome evolution because of a relatively recent whole genome duplication. Because of these advantages, it is a unique non-mammalian vertebrate model system for exploring molecular mechanisms of gene regulation and for studying the earliest stages of vertebrate embryonic development.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
<i>Xenopus [REDACTED]</i> (outbred wild type Nigerian strain)	Bred in-house	600	mature adult (9 months and older)
<i>Xenopus [REDACTED]</i> (outbred wild type)	Bred in-house	90	mature adult (12 months and older)

## C. Re-use

---

Will the animals be re-used?

---

No, continue with question D.

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

---

Adult female *Xenopus* can be used periodically (up to four times a year) for egg production for the duration of their life time. The subcutaneous injection and squeezing procedures cause minimal (mild) discomfort from which the animals quickly recover. They are rested a minimum of 3 months before being used again. There is no noticeable accumulation of distress (egg production itself is a top level measure of welfare). Re-use reduces the number of experimental animals that need to be bred.

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

No

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

#### D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: Why studying embryonic development in an animal model? (1) It is of paramount importance to study gene regulation in vertebrate embryos. Vertebrate model systems are needed because embryonic development of vertebrates – although highly analogous during many phases to the development of other metazoans – involves vertebrate-specific mechanisms and adaptations. To understand human development and disease it is essential to study a variety of model systems, including non-mammalian vertebrate model systems such as *Xenopus*. (2) It is also extremely important to study developmental mechanisms in whole embryos rather than using cell-based culture systems, because cell-based systems do not exhibit the same degree of regulatory and biological complexity; this involves a specific 'niche' for all of the cell types involved and complex interactions among them. Moreover, embryonic development features processes such as pattern formation and morphogenesis. Also, the Darwinian growth selection of cells in culture is limiting their usefulness in studying physiological processes. Chromatin-based mechanisms of gene regulation (DNA methylation, Polycomb repression) for example are quite abnormal in cultured cells. Simply put:

Embryonic development needs to be studied in embryos.

Reduction: The number of animals cannot be reduced further. *Xenopus* females lay relatively large numbers of eggs, which constitutes a reduction in the number of animals needed compared to mammalian systems where the number of embryos is more than an order of magnitude smaller.

Refinement: The extent of discomfort of female *Xenopus* which are used for egg production is minimal (mild) and originates from receiving a subcutaneous injection and from being handled. *Xenopus* females lay eggs which develop externally. Any manipulation, observation and sample collection of embryos occurs outside the mother. This constitutes a significant refinement compared to the intra-uterine development in mammalian model systems such as mouse.

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

Adverse effects are minimal but mainly due to (mild) stress. The working conditions in the room are kept calm and quiet to reduce stress from handling (injection and squeezing). There are no adverse effects on the environment.

## Repetition and Duplication

### E. Repetition

---

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

Not applicable.

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

---

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

No

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

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

---

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

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

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

Mild stress.

Explain why these effects may emerge.

Handling: Subcutaneous injection, squeezing.

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

Keeping the room quiet, to prevent building up of stress.

### J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.



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

Signs of discomfort, such as lethargy, systemic oedema (swelling), skin infections (ulcers) or septicemia ('red leg). If these signs of discomfort are observed, the animal will be taken out of the experiment and euthanized by anesthetic overdose with MS-222 (30 min. in sodiumcarbonate-buffered pH neutral solution of 5-10 g/l).

Indicate the likely incidence.

Less than 10% of the group per year.

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

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

Mild (subcutaneous injection and handling).

## **End of experiment**

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

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

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

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

Yes

## Appendix

### Description animal procedures

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

## 1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen				
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	<table border="1"><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>2</td><td>Xenopus males</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	2	Xenopus males
Serial number	Type of animal procedure					
2	Xenopus males					

## 2 Description of animal procedures

### A. Experimental approach and primary outcome parameters

---

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

---

The male will be killed under anesthesia. The testis will be removed and used for *in vitro* fertilization to study embryonic development.

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

---

The animal is anesthetized by immersion in MS 222 (0.5 g/l Tricaine methanesulfonate, bicarbonate-buffered). This results in deep anesthesia within 5 minutes. The male is then decapitated followed by pithing.

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

---

As the scientific experiments focus on embryos (Gene-regulatory control of embryonic development), and a single pair of testes will suffice for *in vitro* fertilizations on the same day, the statistics of animal use (adult males) are based on the number of days *in vitro* fertilization needs to be performed. The procedure for euthanizing males of X. [REDACTED] and X. [REDACTED] are identical and are covered by two animal groups in the same protocol. X. [REDACTED] embryos need to be obtained twice a week, on average 40 weeks a year. In principle this amounts to 80 X. [REDACTED] males per year if planned optimally and if all males have testes and produce functional sperm. This however is by far not the case. In reality, every other time another male needs to be sacrificed, bringing the total to 120 males per year, i.e. 600 male X. [REDACTED] for the duration of the project. X. [REDACTED] embryos need to be obtained a limited number of times, estimated once per month. In principle this amounts to 12 X. [REDACTED] males per year. In practice a few more are required as some males do not have testes or do not produce functional sperm, bringing the total to 20 males per year, i.e. 100 male X. [REDACTED] for the duration of the project.

### B. The animals

---

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

---

Embryos of the amphibian *Xenopus* species represent an excellent non-mammalian model system for development and differentiation. Among the advantages is the external development of the embryos, which makes them experimentally accessible without the need for invasive perturbation, which is a significant advantage both from a practical and refinement perspective. Relatively large numbers of these embryos can be obtained, which readily enables biochemical approaches to gene regulation. In addition there are well-developed experimental approaches in this model, including gene perturbation and embryological manipulations such as microdissection of pluripotent cells of the animal cap. Studies of early embryonic gene

function in *Xenopus* have contributed enormously to elucidating the molecular properties and functional roles of genes, including genes involved in human cancer and disease. *Xenopus* [REDACTED] is used because of its true diploid genome and similar gene content compared to human. Allo-tetraploid *Xenopus* [REDACTED] is an emerging model for genome evolution because of a relatively recent whole genome duplication. Because of these advantages, it is a unique non-mammalian vertebrate model system for exploring molecular mechanisms of gene regulation and for studying the earliest stages of vertebrate embryonic development.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Xenopus [REDACTED]	Bred in-house	600	mature adult (9 months and older)
Xenopus [REDACTED]	Bred in-house	100	mature adult (12 months and older)

**C. Re-use**

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

**D. Replacement, reduction, refinement**

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

Replacement - Why studying embryonic development in an animal model?

(1) It is of paramount importance to study gene regulation in vertebrate embryos. Vertebrate model systems are needed because embryonic development of vertebrates – although highly analogous during many phases to the development of other metazoans – involves vertebrate-specific mechanisms and adaptations. To understand human development and disease it is essential to study a variety of model systems, including non-mammalian vertebrate model systems such as *Xenopus*.

(2) It is also extremely important to study developmental mechanisms in whole embryos rather than using cell-based culture systems, because cell-based systems do not exhibit the same degree of regulatory and biological complexity; this involves a specific 'niche' for all of the cell types involved

and complex interactions among them. Moreover, embryonic development features processes such as pattern formation and morphogenesis. Also, the Darwinian growth selection of cells in culture is limiting their usefulness in studying physiological processes. Chromatin-based mechanisms of gene regulation (DNA methylation, Polycomb repression) for example are quite abnormal in cultured cells. Simply put: Embryonic development needs to be studied in embryos.

Reduction - How do the choices made in the approach and animal experiments result in the lowest possible number of animals used for experiments? The number of animals cannot be reduced further.

(1) The method for killing and obtaining the testis is very quick, which avoids unnecessary killing of males which would happen if the male is killed before eggs from females can be obtained. Females do not always produce high quality eggs. However, once obtained the eggs must be fertilized within minutes. A quick procedure for killing the male and obtaining the testes allows postponing the decision to kill the animal until it is clear the testis will be used.

(2) The choice of the *Xenopus* system is also advantageous for the number of animals that are required: females lay relatively large numbers of eggs, which constitutes a reduction in the number of animals needed compared to mammalian systems where the number of embryos is more than an order of magnitude smaller. Therefore choosing the *Xenopus* system over mammalian systems leads to the use of fewer animals.

Refinement - How do the choices made in the approach and animal experiments result in minimal discomfort?

(1) The procedure to kill the *Xenopus* male is swift with minimal discomfort. An alternative for killing the male for the testes and doing *in vitro* fertilization would be natural matings of males and females. However, this is not suitable as the developmental stage of resulting embryos would be too heterogeneous for experimental purposes. Also microinjections in fertilized eggs (just after fertilization) would be impossible.

(2) The use of the *Xenopus* system, the embryos of which develop externally, means that any manipulation, observation and sample collection of embryos occurs outside the mother. This constitutes a significant refinement compared to the intra-uterine development in mammalian model systems such as mouse.

---

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

No adverse effects.

## Repetition and Duplication

### E. Repetition

---

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

Not applicable

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

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

No

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

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

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

---

The animal is anesthetized by immersion in MS 222 (0.5 g/l Tricaine methanesulfonate, bicarbonate-buffered). This results in deep anesthesia within 5 minutes.

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

---

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

---

none

Explain why these effects may emerge.

---

Not applicable

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

---

Not applicable

**J. Humane endpoints**

---

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

---

No > Continue with question K.

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

---

Indicate the likely incidence.

---

**K. Classification of severity of procedures**

---

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

---

Non-recovery

## End of experiment

### L. Method of killing

---

Will the animals be killed during or after the procedures?

---

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

---

The animal procedure is killing the animal. This is necessary to obtain the testes.

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

---

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

---

The animals are killed under anesthesia with MS 222 (tricaine methanesulfonate) by decapitation and destruction of the brain and the brainstem by pithing.

This is justified based on the following considerations: The EU directive on the protection of animals stipulates the following methods for killing amphibians (Annex IV): (1) Anesthetic overdose, (2) concussion / percussive blow to the head, and (3) electrical stunning. There are problems with all three allowed methods. Frogs have been shown to recover from prolonged anesthetic overdose, therefore this method is humane but not robust (i.e. not guaranteed to kill the animal). Methods 2 and 3 are also not guaranteed to kill the animal and are also arguably inhumane (i.e. not without pain). Decapitation followed by pithing (which destroys the brain) is the most robust and also a very swift way to kill frogs. When performed under deep anesthesia this method is humane too. This method is not listed but allowed under the EU directive as it also states that "Methods other than those listed may be used on (a) unconscious animals, providing the animal does not regain consciousness before death". The method also fulfills the requirement that the killing is completed by "(b) the destruction of the brain".

Yes

---



## DEC-advies

---

### A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: 2017-0009
2. Titel van het project: Gene regulatory control of embryonic development
3. Titel van de NTS: Hoe genen de embryonale ontwikkeling aansturen
4. Type aanvraag:
  - nieuwe aanvraag projectvergunning
  - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
  - naam DEC: RUDEC
  - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED], bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
  - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
  - ontvangen door DEC: 12-04-2017
  - aanvraag compleet
  - in vergadering besproken: 02-05-2017
  - anderszins behandeld
  - termijnonderbreking(en) van 08-05-2017 tot 10-05-2017
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
  - aanpassing aanvraag: 10-05-2017
  - advies aan CCD: 22-05-2017
7. De inhoud van dit project is afgestemd met de IvD en deze heeft geen bezwaren tegen de uitvoering van het project binnen deze instelling.
8. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
9. Correspondentie met de aanvrager:
  - Datum vragen: 08-05-2017
  - Datum antwoorden: 10-05-2017
  - Gestelde vragen en antwoorden:

#### Description of Animal Procedures:

\*DAP1

-D2: Het tweede deel van de vraag is niet beantwoord.

*Antwoord: Om het tweede deel van de vraag te beantwoorden is de volgende zin toegevoegd: "There are no adverse effects on the environment."*

-I: Zijn er geen andere bronnen van ongerief, zoals stress door hanteren en eieren uitdrijven en de injectie?

*Antwoord: Ik ging ervan uit dat deze vraag al bij D2 beantwoordt was, maar wordt nu nog een keer vermeld (I1-I3) als volgt:*

*I Other aspects on welfare*

*1 Other adverse effects on welfare: Mild stress*

*2 Cause adverse effects: Handling: Subcutaneous injection, squeezing.*

3 Prevention measures: Keeping the room quiet, to prevent building up of stress.

\*DAP2

-A3: Volgens de aanvrager zijn er in de praktijk iets meer dieren (a few more) nodig omdat sommige mannen geen testes hebben of geen functioneel sperma produceren. Er worden hiervoor 50% meer dieren aangevraagd. Dit lijkt een wel erg ruime interpretatie van 'a few more'.

*Antwoord: De formulering is aangepast: "In principle this amounts to 80 X. [redacted] males per year if planned optimally and if all males have testes and produce functional sperm. This however is by far not the case. In reality, every other time another male needs to be sacrificed, bringing the total to 120 males per year."*

-K: Klopt de classificatie? Doden zonder voorafgaande handelingen is licht ongerief.

*Antwoord: De dieren worden eerst diep geanestheseerd, vervolgens gedood met een methode die niet volledig past binnen de kaders van de EU richtlijn. Echter de EU richtlijn staat doden via andere methoden toe mits de dieren geanestheseerd zijn. Als ik het goed begrepen heb komt dat overeen met "non-recovery".*

*De EU richtlijnen voor amfibieën zijn niet goed, zie antwoord op opmerking over onderbouwing bij L2 (hieronder).*

-L2: De onderbouwing voor het gebruik van deze methode ontbreekt. In de beschrijving van de handelingen bij A is geen sprake van anesthesie en wordt decapitatie genoemd als dodingsmethode. Dit lijkt in tegenspraak met deze informatie.

*Antwoord: Dit staat vermeld onder H3: "The animal is anesthetized by immersion in MS 222 (0.5 g/l Tricaine methanesulfonate, bicarbonate-buffered). This results in deep anesthesia within 5 minutes." maar stond per abuis niet vermeld onder A2. Dit is aangepast.*

*Onderbouwing van deze methode van euthanasie is toegevoegd:*

*The EU directive stipulates the following methods for killing amphibians (Annex IV): (1) Anesthetic overdose, (2) concussion / percussive blow to the head, and (3) electrical stunning. There are problems with all three allowed methods. Frogs have been shown to recover from prolonged anesthetic overdose, therefore this method is humane but not robust (i.e. not guaranteed to kill the animal). Methods 2 and 3 are also not guaranteed to kill the animal and are also arguably inhumane (i.e. not without pain). Decapitation followed by pithing (which destroys the brain) is the most robust and also a very swift way to kill frogs. When performed under deep anesthesia this method is humane too. This is allowed used under the EU directive as it also states that "Methods other than those listed may be used on (a) unconscious animals, providing the animal does not regain consciousness before death". The method also fulfills the requirement that the killing is completed by "(b) the destruction of the brain".*

#### **Niet-technische samenvatting:**

-De onderzoekers worden verzocht te checken of de beantwoording van bovenstaande vragen over de DAPs ook leidt tot aanpassingen in de NTS.

-3.5: De juiste aanduiding voor de ernst van de dierproeven is licht i.p.v. mild.

*Antwoord: Licht i.p.v. mild: Dit is aangepast. Verder waren aanpassingen aan de NTS niet noodzakelijk.*

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag

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

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

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er is geen betrokkenheid van DEC-leden bij deze projectaanvraag, waardoor onafhankelijkheid en onpartijdigheid zijn gewaarborgd.

### **C. Beoordeling (inhoud)**

1. Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. De opzet komt het best overeen met voorbeeld 1 uit de handreiking 'Wat is een project'. 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 weet is er geen "tegenstrijdige" wetgeving die het uitvoeren van de experimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.

#### *Belangen en waarden*

4. Het directe doel van het project is het verkrijgen van *Xenopus* embryos om hierin de genregulatie tijdens de vroege ontwikkeling (laat blastula en vroeg gastrula stadium) te onderzoeken. Het uiteindelijke doel van deze projectaanvraag is fundamentele kennis te vergaren over de normale embryonale ontwikkeling en differentiatie en de regulatoire processen daarvan. Deze kennis kan op termijn bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe behandelingen voor aangeboren afwijkingen, genetische afwijkingen en kanker. Het ontwikkelen van klinische toepassingen op basis van de vergaarde kennis is geen onderdeel van deze projectaanvraag en de commissie verwacht niet dat de aanvrager dit zal gaan uitvoeren. Er is binnen dit project daarom geen directe relatie tussen het doel van deze projectaanvraag en het lange termijn doel, te weten de ontwikkeling van nieuwe behandelingen voor aangeboren afwijkingen, genetische afwijkingen en kanker. De aanvrager heeft duidelijk gemaakt wat de status van het onderzoeksveld is en wat de bijdrage van dit project daaraan zal zijn. Uit de aanvraag blijkt dat de kennis van genregulatie tijdens embryonale ontwikkeling op dit moment nog beperkt is, dat deze kennis noodzakelijk is voor een beter begrip van embryonale ontwikkeling en differentiatie en dat deze kennis cruciaal is voor belangrijke medische kwesties waaronder aangeboren afwijkingen/ziekte, stamceltherapie en kanker. Naar de mening van de DEC is het doel van deze projectaanvraag daarom gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld.
5. De belangrijkste belanghebbenden in deze projectaanvraag zijn de proefdieren, de onderzoekers en de doelgroep/patiënten.  
Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast. De dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress

ondervinden en pijn ondergaan. Een deel van de dieren zal in het kader van het onderzoek gedood worden. De dieren hebben er belang bij hiervan gevrijwaard te blijven. Voor de onderzoekers geldt dat het publiceren van belangrijke nieuwe wetenschappelijke inzichten resulteert in een goede wetenschappelijke reputatie, hetgeen vaak de sleutel is voor het verkrijgen van nieuwe onderzoeksmiddelen en mogelijkheden. Dit kan door de onderzoeker zelf van belang geacht worden, maar dient naar de mening van de DEC geen rol te spelen in de ethische afweging over de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren. Het gaat uiteindelijk om de vraag of dit onderzoek belangrijke maatschappelijke en wetenschappelijke doelen dient (gezondheid, kennis).

Voor de samenleving/patiënten is dit onderzoek indirect van belang, omdat de vergaarde kennis op termijn kan bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe behandelmethoden voor aangeboren ziekten en kanker. Kunnen beschikken over fundamentele kennis over genregulatie tijdens de embryonale ontwikkeling is van groot belang voor de voortgang van onderzoek op dit terrein. Gerichte behandeling op basis van mechanistisch inzicht kan bijdragen aan een betere diagnostiek en behandeling met minder bijwerkingen. Dit kan er toe leiden dat de patiënt weer gezond wordt, dan wel een betere kwaliteit van leven heeft. Uiteindelijk is dat ook voor de samenleving van belang.

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

#### *Proefopzet en haalbaarheid*

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager, zoals blijkt uit de in de aanvraag vermelde publicaties van deze onderzoeksgroep. De aanvragers beschikken over voldoende kennis en kunde om te kunnen voldoen aan alle zorgvuldigheidseisen omtrent het verrichten van dierproeven.
8. De doelstellingen van het project zijn realistisch en de voorgestelde experimentele opzet sluit hier logisch bij aan. Bovendien heeft deze groep veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. De DEC is dan ook van mening dat het project goed is opgezet, en dat deze strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

#### *Welzijn dieren*

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
  - Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
  - Niet-menselijke primaten (10e)
  - Dieren in/uit het wild (10f)
  - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
  - Zwerfdieren (10h)
  - Hergebruik (1e lid 2)
  - Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
  - Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
  - Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c lid 3)

De aanvrager heeft als volgt onderbouwd dat dit noodzakelijk is: 'The EU directive on the protection of animals stipulates the following methods for killing amphibian (Annex IV): (1) Anesthetic overdose, (2) concussion / percussive blow to the head, and (3) electrical stunning.

There are problems with all three allowed methods. Frogs have been shown to recover from prolonged anesthetic overdose, therefore this method is humane but not robust (i.e. not guaranteed to kill the animal) Methods 2 and 3 are also not guaranteed to kill the animal and are also arguably inhumane (i.e. not without pain). Decapitation followed by pithing (which destroys the brain) is the most robust and also a very swift way to kill frogs. When performed under deep anesthesia this method is humane too. This is allowed used under the EU directive as it also states that “Methods other than those listed may be used on (a) unconscious animals, providing the animal does not regain consciousness before death”. The method also fulfills the requirement that the killing is completed by “(b) the destruction of the brain”. De DEC is het eens met deze onderbouwing. De dieren mogen immers volgens de richtlijn gedood worden met een overdosis anesthesie. Het vernietigen van het brein van het dier onder diepe anesthesie kan worden opgevat als een extra maatregel die zeker kan stellen dat het dier niet toch nog bijkomt uit die anesthesie. De DEC ziet daar volstrekt geen bezwaar tegen.

10. De huisvesting en verzorging van de dieren zijn conform de eisen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Er is wellicht discussie mogelijk over de vraag of de gebruikte dodingsmethode moet worden geclassificeerd als non-recovery of licht ongerief. De aanvrager is zelf in de aanvraag en de NTS niet helemaal consequent in de inschatting van het ongerief. De DEC is van mening dat het ongerief als licht dient te worden geclassificeerd, maar acht de kwestie “licht of *non recovery*” voor de ethische afweging in dit geval niet van belang.
12. De integriteit van dieren wordt in lichte mate aangetast door de hormonale injecties en het instrumentele gebruik dat inherent is aan dierproeven, maar voor het overige is van aantasting van de integriteit geen sprake.
13. De criteria voor humane eindpunten zijn voldoende specifiek gedefinieerd en toegesneden op het experiment. Het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken is op basis van ervaring met deze dieren en deze behandeling ingeschat. De commissie is het eens met deze inschatting en de gehanteerde humane eindpunten.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. De genregulatie in embryo's kan niet goed zonder embryo's onderzocht worden, omdat essentiële processen in embryonale ontwikkeling niet nagebootst kunnen worden met cellijnen.
15. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en is proportioneel ten opzichte van de gekozen onderzoeksopzet en de looptijd. De onderzoekers hanteren een goede strategie om ervoor te zorgen dat er met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een wetenschappelijk betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. *Xenopus*-vrouwtjes leggen veel eieren, waardoor er relatief weinig dieren nodig zijn voor de productie van eitjes die na bevruchting met zaad van *Xenopus*-mannetjes embryo's opleveren die makkelijk bestudeerd en gemodificeerd kunnen worden. De vrouwtjes kunnen na een rustperiode van drie maanden opnieuw gebruikt worden. Voor de bevruchting van meerdere eitjes van meerdere vrouwtjes wordt één mannetje gedood om zaad te verkrijgen.

16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven. Embryo's van *Xenopus* ontwikkelen zich buiten het lichaam van de moeder. Hierdoor zijn ze makkelijk te observeren, te manipuleren en te bemonsteren. De embryo's zelf worden niet beschouwd als proefdieren. Er wordt geen gebruik gemaakt van natuurlijke bevruchting, omdat dit resulteert in teveel variatie in het ontwikkelingsstadium van embryo's. De procedure voor het oogsten van eicellen is weinig belastend voor de vrouwelijke dieren, en zij krijgen voldoende rust tussen de procedures. De DEC is ervan overtuigd dat de beschreven proefopzet de meest verfijnde is en dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.
17. Het betreft geen wettelijk vereist onderzoek.

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

18. De aanvrager zal om begrijpelijke redenen in het project in bijlage 1 (productie van eicellen) alleen gebruik maken van vrouwelijke dieren en bijlage 2 (verkrijgen van zaad) alleen van mannelijke dieren.
19. De vrouwelijke dieren worden niet gedood in het kader van het project. De mannelijke dieren zullen in het kader van het project gedood worden. Dit is noodzakelijk om zaad te kunnen oogsten waarmee eicellen bevrucht worden embryo's te verkrijgen. De gebruikte dodingsmethode staat niet vermeld in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Voor het behalen van de doelstelling is het gebruik van deze dodingsmethode niet noodzakelijk, maar de DEC is het met de aanvrager eens dat de door hem voorgestelde dodingsmethode de meest humane is en feitelijk geen bezwaarlijke afwijking van de EU-richtlijn vormt (zie onderdeel C9 van dit advies).
20. Er worden in deze projectaanvraag geen landbouwhuisdieren, honden, katten of niet-humane primaten gebruikt (en dus ook niet gedood om niet-wetenschappelijke redenen).

*NTS*

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

#### **D. Ethische afweging**

1. Rechtvaardigt het belang van de doelstelling van het project het ongerief dat de dieren wordt aangedaan, en is aan alle zorgvuldigheidseisen (3V's) voldaan?
2. Er vindt een lichte aantasting van welzijn en integriteit van de proefdieren plaats (beschreven in C9 tot C20). De doelstellingen kunnen niet zonder dieren behaald worden. De onderzoekers doen al het mogelijke om het lijden van de dieren en het aantal dieren te beperken. Voor de samenleving is dit onderzoek van belang, omdat het fundamenteel wetenschappelijke kennis over genregulatie tijdens de vroege embryonale ontwikkeling kan opleveren. De DEC kent daar veel gewicht aan toe om de volgende redenen. Kennis van de normale embryonale ontwikkeling en differentiatie en de regulatie van genen die daarbij betrokken zijn, is uiteindelijk van cruciaal belang voor de aanpak van medische problemen op gebied van aangeboren ziekten, regeneratieve geneeskunde en kanker. Het onderzoek richt zich op het beantwoorden van de vraag hoe genregulatie tijdens de ontwikkeling plaatsvindt en hoe de ontwikkelingsinstructies die vastgelegd zijn in genomische informatie op een zeer gereguleerde manier progressief

beschikbaar komen. Het is aannemelijk dat de doelstellingen op termijn behaald zullen worden. De commissie acht het vergaren van meer kennis over genregulatie tijdens embryonale ontwikkeling van substantieel belang.

3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen: het verkrijgen van *Xenopus* embryos om hierin de genregulatie tijdens de vroege ontwikkeling (laat blastula en vroeg gastrula stadium) te onderzoeken. Het uiteindelijke doel is fundamentele kennis te vergaren over de normale embryonale ontwikkeling en differentiatie en de regulatoire processen daarvan. Deze kennis kan op termijn bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe behandelingen voor aangeboren afwijkingen, genetische afwijkingen en kanker. De DEC is van mening dat de belangen van de samenleving en de wetenschap voldoende zwaar wegen om het schaden van de belangen van de proefdieren (om gevrijwaard te blijven van een aantasting van hun welzijn en integriteit) te rechtvaardigen. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De DEC is van mening dat het project goed is opgezet, en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat zij zal kunnen voorkomen dat mens, dier en het milieu onbedoelde negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. De DEC is van oordeel dat het hier boven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan.

## 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 vergunningplichtig 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 geen knelpunten of dilemma's geconstateerd – zowel binnen als buiten de context van het project - die de verantwoordelijkheid en competentie van de DEC overstijgen.





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Postbus 9101, t.a.v. [REDACTED]

6500 HB NIJMEGEN



**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  
AVD1030020171826

**Bijlagen**

2

Datum 23 mei 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 23 mei 2017. Het gaat om uw project "Gene-regulatory control of embryonic development". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1030020171826. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

**Wacht met de uitvoering van uw project**

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

**Factuur**

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



**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

**Datum:**

23 mei 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD1030020171826

**Datum:**  
23 mei 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD1030020171826

### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10300  
Naam instelling of organisatie: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen  
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: Dhr. Instantie voor dierenwelzijn  
KvK-nummer: 41055629  
Straat en huisnummer: [REDACTED]  
Postbus: [REDACTED]  
Postcode en plaats: [REDACTED]  
IBAN: NL90ABNA0231209983  
Tenaamstelling van het rekeningnummer: UMC St Radboud

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

**Datum:**  
23 mei 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD1030020171826

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

Gegevens gemachtigde

Naam: [REDACTED]  
Postbus: [REDACTED]  
Postcode en plaats: [REDACTED]

Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Nee

Wat mag de gemachtigde doen?

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

**Over uw aanvraag**

Wat voor aanvraag doet u?

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

**Over uw project**

Geplande startdatum: 1 januari 2018  
Geplande einddatum: 31 december 2022  
Titel project: Gene-regulatory control of embryonic development  
Titel niet-technische samenvatting: Hoe genen de embryonale ontwikkeling aansturen  
Naam DEC: RU DEC  
Postadres DEC: [REDACTED]  
E-mailadres DEC: [REDACTED]

**Datum:**

23 mei 2017

**Aanvraagnummer:**

AVD1030020171826

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 1.287,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

Verplichte bijlagen:  Projectvoorstel  
 Beschrijving Dierproeven  
 Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:  Melding Machtiging  
 DEC-advies

**Ondertekening**

Naam: [REDACTED]  
Functie: Instantie voor dierenwelzijn  
Plaats: Nijmegen  
Datum: 23 mei 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen  
Instantie voor dierenwelzijn

Postbus 9101, [REDACTED]  
6500 HB NIJMEGEN



**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  
AVD1030020171826

**Bijlagen**

2

Datum 23 mei 2017  
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 23 mei 2017

Vervaldatum: 22 juni 2017

Factuurnummer: 171826

Ordernummer: 040823-461220/ 2017-0009 / [REDACTED]

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1030020171826	€ 1.287,00

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Postbus 9101, t.a.v. CDL, [REDACTED]

6500 HB NIJMEGEN



**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  
AVD1030020171826  
**Bijlagen**  
1

Datum 6 juni 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw [REDACTED]

Op 23 mei 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Gene-regulatory control of embryonic development" met aanvraagnummer AVD1030020171826. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

#### **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.

U kunt met uw project "Gene-regulatory control of embryonic development" 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 RU DEC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 22 mei 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden

aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.  
Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

**Datum:**  
6 juni 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD1030020171826

#### **Bezwaar**

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.  
Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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

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

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

#### **Meer informatie**

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

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:

  
Ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

#### **Bijlagen:**

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



# Projectvergunning

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

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

**Naam:** Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

**Adres:** Postbus 9101, t.a.v. [REDACTED]

**Postcode en plaats:** 6500 HB NIJMEGEN

**Deelnemersnummer:** 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022, voor het project "Gene-regulatory control of embryonic development" met aanvraagnummer AVD1030020171826, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Hoogleraar. Voor de uitvoering van het project is IWKV verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 23 mei 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 23 mei 2017;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 23 mei 2017;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 22 mei 2017, ontvangen op 23 mei 2017.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
<b>3.4.4.1 Xenopus females for egg production</b>				
	Klauwkikkers (Xenopus [REDACTED] en Xenopus [REDACTED] is) / 600 Xenopus [REDACTED] 90 Xenopus [REDACTED]	690	Licht	
<b>3.4.4.2 Xenopus males</b>				
	Klauwkikkers (Xenopus [REDACTED] en Xenopus [REDACTED] / 600 Xenopus [REDACTED] 100 Xenopus [REDACTED]	700	Terminal	

### 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



**Aanvraagnummer:**  
AVD1030020171826

anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in afstemming met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.



**Aanvraagnummer:**

AVD1030020171826

## 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:**  
AVD1030020171826

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

#### **Einde van een dierproef**

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

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

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

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

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