

	Dossier: 10800202418274	
		Aanwezig
1	NTS	X
2	Aanvraagformulier	X
3	Projectvoorstel	2X
4	Bijlage beschrijving dierproeven	X
5	DEC-advies	X
6	Ontvangstbevestiging	X
	Evt. Vragen CCD aan aanvrager	X
	Evt. antwoorden aanvrager	X
7	Beschikking en vergunning	X

NIET-TECHNISCHE PROJECTSAMENVATTING

Naam van het project	De rol van extracellulaire blaasjes in het in balans houden van organen
NTS-identificatiecode	NTS-NL-729460 v.1, 29-11-2024
Land	Nederland
Taal	nl
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	60
Trefwoorden	Extracellulaire blaasjes Orgaanbalans Communicatie tussen organen
Doel(en) van het project	Fundamenteel onderzoek: Oncologie Fundamenteel onderzoek: Endocrien stelsel / metabolisme Fundamenteel onderzoek: Multisystemisch

DOELSTELLINGEN EN VERWACHTE VOORDELEN VAN HET PROJECT

<p>Beschrijf de doelstellingen van het project (bijvoorbeeld het aanpakken van bepaalde wetenschappelijke onduidelijkheden, of wetenschappelijke of klinische behoeften).</p>	<p>Bijna alle cellen kunnen hele kleine blaasjes (tussen de 50 en 250 nanometer groot) uitscheiden, die 'Extracellulaire Vesicles' (EVs) worden genoemd. Deze blaasjes bevatten informatie, zoals eiwitten. Op basis van sterke aanwijzingen uit eerdere onderzoeken denken we dat deze blaasjes een belangrijke rol spelen bij het in balans houden van je lichaam en mogelijk ook bij het ontstaan van ziektes. We denken dat cellen in één orgaan deze blaasjes afgeven, die via het bloed naar een ander orgaan reizen en daar door andere cellen worden opgenomen. Dit wordt communicatie tussen organen genoemd.</p> <p>Het is echter nog steeds niet helemaal duidelijk 1) hoe vaak deze communicatie tussen organen via EVs gebeurt in een levend organisme, 2) welke informatie (zoals eiwitten) precies wordt overgedragen, en 3) hoe dit verandert als je ziek bent. Door dit te onderzoeken, kunnen we voor het eerst beter begrijpen wat de rol van deze communicatie via EVs is in een levend wezen. Wat ons tot nu toe heeft tegengehouden bij het vinden van antwoorden, is dat deze blaasjes heel klein zijn en er geen geschikte modellen waren om dit proces goed genoeg te bestuderen in een levend dier. De onderzoeker heeft onlangs modellen ontwikkeld waarmee we deze communicatie voor het eerst kunnen bekijken in een levend dier.</p> <p>In het eerste deel van het onderzoek gaan we nieuwe genetisch aangepaste visstammen maken, die we in het tweede deel gaan gebruiken om deze informatie-uitwisseling tussen organen te onderzoeken. We kijken naar zowel gezonde dieren als naar dieren die te veel vet eten of een lichte vorm van darmkanker hebben.</p>
<p>Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen, dieren of het milieu uiteindelijk voordeel kunnen hebben bij het project. Maak, waar van toepassing, een onderscheid tussen voordelen op korte termijn (binnen de looptijd van het project) en voordelen op lange termijn (die mogelijk pas worden bereikt nadat het project is afgerond).</p>	<p>Het belangrijkste doel van dit onderzoek is om voor het eerst te ontdekken in hoeverre EVs (kleine blaasjes die informatie bevatten) een rol spelen bij het in balans houden van de organen, en hoe ze betrokken zijn bij verstoringen, zoals bij ziektes. Met de resultaten van dit onderzoek krijgen we een beter inzicht in hoe meercellige organismen, zoals mensen, werken. We leren beter begrijpen hoe organen met elkaar communiceren, en dit zou ook nieuwe mogelijkheden kunnen bieden voor behandelingen van ziektes, of zelfs voor het vroeg opsporen ervan.</p> <p>Op korte termijn willen we antwoord geven op de vraag of de communicatie via EVs specifiek is voor bepaalde organen. Een voorbeeld: sturen de blaasjes vanuit één weefsel verschillende EVs naar orgaan A en orgaan B? Ook willen we onderzoeken hoe goed EVs informatie overbrengen naar een ander orgaan, vergeleken met losse eiwitten die niet in een blaasje zitten. Dit is belangrijk voor medicijnonderzoek, waar men al jaren probeert medicijnen via kunstmatige vetbolletjes gericht naar een specifiek orgaan te brengen, maar dat is nog steeds lastig. Dit onderzoek kan op de lange termijn inzichten bieden die helpen om heel gerichte, biologisch-geïnspireerde medicijnen te ontwikkelen.</p>

VOORSPELDE SCHADE

<p>In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.</p>	<p>Het eerste deel van het project richt zich op het maken van nieuwe genetisch aangepaste visstammen die dit onderzoek mogelijk maken. Deze genetische visstammen maken we zo dat ze in specifieke organen van de vissen ofwel een kleur aanbrengen (voor observatie met een microscoop), of een speciaal label aan EV-eiwitten toevoegen (voor detectie met een machine die eiwitten kan meten). Om deze genetisch visstammen te maken, te onderhouden en te onderzoeken, zijn tussen de 3600 en 7200 vissen nodig. Ongeveer 150 van deze vissen krijgen een huiduitstrijkje waarbij ze kort uit het water worden gehaald en met een wattenstaafje langs de zijkant worden gestreken, een proces dat ongeveer 30 seconden duurt.</p> <p>De andere vissen worden gebruikt in het tweede deel van het project. Een aantal vissen (maximaal 750 gedurende het project) wordt gebruikt voor microscopie. Hierbij kijken we tot een uur lang met een microscoop naar hoe de EVs zich verspreiden, terwijl de vis onder verdoving is. Nog eens 2250 vissen (900 controlevissen en 1350 ziektemodellen) worden gebruikt om te onderzoeken hoe eiwitten tussen organen worden overgedragen. Dit omvat zowel controlegroepen als vissen met ziektemodellen, die na het doden worden gebruikt om eiwit overdracht naar verschillende organen te bestuderen.</p> <p>In totaal worden 1800 vissen ingezet voor drie ziektemodellen, dus 600 per model. Binnen die 600 zijn er 150 bedoeld voor microscopie en 450 voor eiwit overdracht per ziektemodel. De drie ziektemodellen zijn: 1) het veroorzaken van leververvetting met een aangepast dieet (maximaal twee weken), 2) het stimuleren van gematigde tumorgroei (metaplasie, waarbij de cellen sneller gaan delen en het weefsel dikker wordt, zonder dat er een echte tumor ontstaat) in de darm (maximaal één week), en 3) het implanteren van tumorcellen aan de buitenkant van de vis, ter hoogte van de dooier (maximaal één week). Dit gebied, de "perivitelline ruimte", bevindt zich aan de buitenkant van het embryo of de larve.</p>																
<p>Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren, bijvoorbeeld pijn, gewichtsverlies, inactiviteit/verminderde mobiliteit, stress, abnormaal gedrag, en wat is de duur van die effecten?</p>	<p>Het eerste deel van het onderzoek richt zich op het maken van nieuwe genetische visstammen. Volgens de huidige wetgeving wordt de gezondheid van deze vissen voor twee generaties in de gaten gehouden, waarbij het ongemak tijdens deze periode als 'licht' wordt ingeschat. We verwachten echter geen problemen, omdat de eiwitten die we willen onderzoeken niet schadelijk zijn en alleen actief worden als we ze zelf aanzetten. Daarom denken we dat de vissen geen nadelige effecten zullen ondervinden.</p> <p>Een aantal vissen zal wel licht ongemak ervaren door verdoving, vooral bij het bekijken van de vissen onder een microscoop of bij eiwitonderzoek. Deze procedures zijn niet invasief (er wordt niets in de vis ingebracht) terwijl de vis nog leeft, waardoor het ongemak als 'licht' wordt ingeschat. Het doden van de vis gebeurt op een manier die ongeveer 30 seconden duurt en waarbij koude wordt gebruikt om pijn te verzachten.</p> <p>Het afnemen van een huiduitstrijkje veroorzaakt ook licht ongemak, dat naar verwachting maximaal één minuut duurt.</p> <p>Van de drie ziektemodellen die worden gebruikt, verwachten we dat ze ongemak zullen veroorzaken, zoals stress en afwijkend (zwem)gedrag, gedurende de procedures (maximaal twee weken). Dit ongemak zal naar verwachting bestaan uit matig ongemak zoals verminderde mobiliteit door spierzwakte, minder energie en gewichtsverlies, terwijl een deel van de vissen slechts licht ongemak zal ervaren.</p>																
<p>Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th rowspan="2">Totaal aantal</th> <th colspan="4">Geraamde aantallen naar ernstgraad</th> </tr> <tr> <th>Terminaal</th> <th>Licht</th> <th>Matig</th> <th>Ernstig</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Zebra-vissen (Danio rerio)</td> <td>10200</td> <td>0</td> <td>7990</td> <td>2210</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Totaal aantal	Geraamde aantallen naar ernstgraad				Terminaal	Licht	Matig	Ernstig	Zebra-vissen (Danio rerio)	10200	0	7990	2210	0
Soort:	Totaal aantal			Geraamde aantallen naar ernstgraad													
		Terminaal	Licht	Matig	Ernstig												
Zebra-vissen (Danio rerio)	10200	0	7990	2210	0												
<p>Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th colspan="3">Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren</th> </tr> <tr> <th>Hergebruikt</th> <th>Teruggeplaatst</th> <th>Geadopteerd</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren			Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd									
Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren																
	Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd														

Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.

Alle experimentele procedures eindigen met doden van de vissen. De genetische visstammen die in de eerste fase van het onderzoek worden gemaakt, zullen volgens standaard richtlijnen worden gekweekt, wat betekent dat ze aan het eind van hun vruchtbare leven op humane wijze worden gedood.

TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

1. Vervanging

Beschrijf welke diervrije alternatieven op dit gebied voorhanden zijn en waarom zij niet voor het project kunnen worden gebruikt.

Wij kennen geen andere modellen die de complexe samenwerking tussen de cellen via EVs die we onderzoeken op de juiste manier kunnen nabootsen, als vervanging voor zebravissen. Wel zullen we een deel van ons onderzoek doen met weefselkweken, wat vaak kan helpen om experimenten met levende dieren te vermijden. We gebruiken deze kweken om de verschillende technieken die we gaan gebruiken zo goed mogelijk te testen, zodat we minder larven nodig hebben. Deze zijn niet in deze aanvraag beschreven omdat het geen dierproeven zijn.

Er zijn geen andere diermodellen bekend waarin we complexe wisselwerking van cellen via de blaasjes met deze mate van detail kunnen bestuderen, behalve muizen en fruitvliegen. Bij muizen geldt dat 1) EVs niet goed zichtbaar zijn, en 2) het gebruik van zebravissen los daarvan al een vervanging is voor het gebruik van muizen. Vooral in fundamenteel onderzoek kunnen experimenten met zebravissen een groot deel van het muisonderzoek vervangen. Voor fruitvliegen geldt dat ze geen gewervelde dieren zijn (dieren met een ruggengraat) en niet dezelfde lichaamsstructuur hebben als gewervelde dieren, zoals vissen of muizen. Ze hebben bijvoorbeeld geen gesloten bloedsomloop, waardoor ze verder van de mens afstaan en minder geschikt zijn voor beeldvorming van hoge kwaliteit in latere ontwikkelingsfasen.

Modellen zoals 'multi-organ-on-a-chip' (een netwerk van kleine stukjes met elkaar verbonden organen op een chip) missen belangrijke eigenschappen die essentieel zijn voor de biologie van EVs, zoals de verwerking van voedsel, de samenwerking tussen verschillende organen, en de rol van specifieke cellen zoals macrofagen (cellen die belangrijk zijn voor het afweersysteem en het gezond houden van organen).

2. Vermindering

Leg uit hoe de aantallen dieren voor dit project zijn bepaald. Beschrijf de stappen die zijn genomen om het aantal te gebruiken dieren te verminderen en de beginselen die zijn gebruikt bij het opzetten van de studies. Beschrijf, waar van toepassing, de praktijken die gedurende het hele project zullen worden toegepast om het aantal dieren die in overeenstemming met de wetenschappelijke doelstellingen werden gebruikt, tot een minimum te beperken. Deze praktijken kunnen bijvoorbeeld bestaan uit proefprojecten, computermodellen, het delen van weefsel en hergebruik.

Voor het maken van de nieuwe genetische vissoorten die we nodig hebben voor het onderzoek, willen we een nieuwe techniek (P1) gebruiken. Deze techniek vermindert het aantal vissen dat nodig is om een nieuwe soort te maken met ongeveer 70% vergeleken met de gebruikelijke methodes (P2). Hetzelfde geldt voor het testen van alle technieken op zebravisembryo's: we voeren zoveel mogelijk experimenten uit tot dag 5, zodat we zo min mogelijk larven hoeven te gebruiken.

3. Verfijning

Geef voorbeelden van de specifieke maatregelen (bv. verscherpte monitoring, postoperatieve behandeling, pijnbestrijding, training van dieren) die in verband met de procedures moeten worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken. Beschrijf

Alle stappen en methodes die we gebruiken, zijn gekozen om ervoor te zorgen dat het mogelijke ongemak voor de dieren zo laag en kort mogelijk is, met een zo betrouwbaar mogelijk resultaat. Dit omvat de ziektemodellen die we aan en uit kunnen zetten en het gebruik van nieuwe methodes om genetische vissoorten te maken, waarmee we versturende invloeden zo veel mogelijk verminderen.

De zebravissen worden gehuisvest in een speciaal ontworpen aquariumrek om te controleren of de genetische vissoorten de gewenste aanpassing in hun genen hebben zonder schadelijke bijwerkingen. In dit systeem staan de vissen in visueel en reukcontact met hun broers en zussen.

de mechanismen om gedurende de looptijd van het project nieuwe verfijningstechnieken in gebruik te nemen.	
Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe	<p>Zebravislarven zijn uitstekend geschikt om EVs met goede resolutie te bekijken in elk orgaan terwijl het dier in leven is. Dit komt omdat zebravissen als larven transparant zijn, wat het mogelijk maakt om met een microscoop in elke cel van een levende (en dus compleet intacte) vis te kijken. Zebravissen zijn momenteel ook het enige modelsysteem van gewervelde dieren waar dit kan, en staan daarmee het dichtst bij de mens voor dit type onderzoek. In andere modellen, zoals in muizen, blokkeert de huid van muizen het licht te veel zodat we niet diep genoeg in het lichaam kunnen kijken naar objecten die zo klein zijn als EVs. <i>Drosophila</i> (fruitvliegen) zijn geen gewervelde dieren, en wijken dus sterker af van de mens en zijn daarmee minder geschikt voor onze specifieke vraagstelling. Er is naar onze inschatting geen noodzaak om zebravissen te gebruiken in onze experimenten die ouder zijn dan 29 dagen.</p>

VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT

Project geselecteerd voor BA?	nee
Termijn voor BA	
Reden voor de beoordeling achteraf	
Bevat ernstige procedures	
Maakt gebruik van niet-menselijke primaten	
Andere reden	
Toelichting van de andere reden voor de beoordeling achteraf	

AANVULLENDE VELDEN

Link naar de eerdere versie van de NTS buiten het EC-systeem	
--	--

Current version: 7.9.202502251505 (a1c0af1)Version date: 2025-02-25 15:05:54

[Top](#) | [Contact](#) | [Cookies](#) | [Privacy policy](#) | [Legal notices](#) | [Accessibility](#)



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 neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1

Gegevens aanvrager

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

Ja > Vul uw deelnemernummer in 10800

Nee > U kunt geen aanvraag doen

1.2 Wat voor aanvraag doet u?

Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 1.3

Wijziging > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.1

Melding > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.2

1.3 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.

Naam instelling of organisatie Universiteit Utrecht

Titel, voorletters en achternaam van de portefeuillehouder Titel Voorletters Achternaam Dhr. Mw

E-mailadres contactpersoon info@ivd-utrecht.nl

Titel, voorletters en achternaam van de diens gemachtigde (indien van toepassing) Titel Voorletters Achternaam Dhr. Mw
n.v.t.

E-mailadres gemachtigde

Vul de gegevens van het postadres in.

Straat en huisnummer Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht 50

Postcode en plaats 3584CJ UTRECHT

Postbus, postcode en plaats 80125 3508TC UTRECHT

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters Dhr. Mw.

Functie Assistant Professor

Afdeling Biologie

Telefoonnummer

1.5	<i>(Indien van toepassing)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	E-mailadres	[REDACTED]
		(Titel) Naam en voorletters	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	
		Afdeling	
1.6	<i>(Indien van toepassing)</i> Vul hier de gegevens in van de persoon aan wie de portefeuillehouder de verantwoordelijkheid inzake de algemene uitvoering van het project en de overeenstemming daarvan met de projectvergunning heeft gedelegeerd.	E-mailadres	
		(Titel) Naam en voorletters	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	
		Afdeling	
1.7	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de Instantie voor Dierenwelzijn	Telefoonnummer	030-2531569
		E-mailadres	info@ivd-utrecht.nl
1.8	Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?	<input type="checkbox"/> Ja > <i>Stuur dan het Ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag</i> <input checked="" type="checkbox"/> Nee	

2 Over uw aanvraag

2.1	Gaat uw aanvraag over een <i>wijziging</i> op een vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?	<input checked="" type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3	
		<input type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder kort de wijziging en de onderbouwing daarvan weer. Geef in de originele formulieren (niet-technische samenvatting, projectvoorstel en bijlage dierproeven) duidelijk aan (bij voorbeeld in een andere kleur) waar de projectaanvraag wijzigt. Ga daarna verder met vraag 6.	
2.2	Gaat uw aanvraag over een <i>melding</i> op een vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?	<input type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3	
		<input type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder weer wat deze melding inhoudt en ga verder met vraag 6	

3 Over uw project

3.1	Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	Startdatum	1 - 9 - 2024
		Einddatum (t/m)	30 - 8 - 2028
3.2	Wat is de titel van het project?	De rol van extracellulaire blaasjes in de regulatie van orgaanhomeostase.	
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	De rol van extracellulaire blaasjes in de regulatie van orgaanhomeostase.	
3.4	Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) van voorkeur?	Naam DEC	DEC Utrecht
		Postadres	Postbus 85500 3508 GA Utrecht
		E-mailadres	dec-utrecht@umcutrecht.nl

4 Factuurgegevens

4.1 (Indien factuuradres afwijkt van de gegevens uit vraag 1.3) Vul de gegevens van het factuuradres in.

Naam: UU-ASC		Afdeling:
Straat:		Huisnummer:
Postcode:	Plaats:	
Postbus: 80.011	Postcode: 3508TA	Plaats: UTRECHT
E-mail: asc.factuur@uu.nl		

4.2 (optioneel) Vul hier het ordernummer van de instelling in.

Ordernummer:
CB.841910.3.01.011

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

Projectvoorstel Aantal bijlage(n) dierproeven 2

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 en per post naar de Centrale Commissie Dierproeven (voor adresgegevens zie website)

Ondertekening door de portefeuillehouder namens de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.8). 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 C van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
- dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
- dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam

Functie

Plaats

Utrecht

Datum

25 - 07 - 2024



Formulier

Projectvoorstel dierproeven

- Dit formulier gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit formulier hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie vindt u in de '*Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning*' 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.	10800
1.1 Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Utrecht
1.3 Vul de titel van het project in.	De rol van extracellulaire blaasjes in de regulatie van orgaan homeostase

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 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 of het welzijn van mens of dier
	<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 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2.1 aangekruiste categorieën.

Onze onderzoeksgroep richt zich op het bestuderen van extracellulaire blaasjes (ENG: 'Extracellular Vesicles', EVs) en hun rol in de communicatie tussen verschillende weefsels en organen. EVs spelen een essentiële rol in veel belangrijke fysiologische en pathologische processen in ons lichaam doordat ze "moleculaire boodschappen" in de vorm van onder andere functionele eiwitten kunnen overdragen van het ene weefsel naar het andere binnen ons lichaam, en zelfs 'cross-kingdom': van ons microbioom (darmbacteriën) naar lichaamseigen cellen. Verstoring van EV-communicatie is daarom ook sterk gelinkt aan ziekteontwikkeling zoals kanker en andere metabole ziekten.

Studie naar communicatie met EVs gebeurt veelal door EVs te isoleren uit weefselkweken (in vitro) van verschillende celtypen (darm, lever, long, hart, nier etc.) en die vervolgens toe te voegen aan andere weefselkweken, of ze in te spuiten in proefdieren. Hierna worden effecten (biochemisch) gemeten. Deze indirecte manier heeft de voorkeur gehad omdat EVs heel klein zijn, in de orde van 50 - 250 nanometer in diameter; hierdoor zijn ze lastig direct te observeren met microscopie.

Met deze indirecte manier is wel duidelijk geworden dat EVs een rol kunnen spelen in een breed scala aan biologische processen: 1) het immuunsysteem (overbrengen van antigenen, moduleren of onderdrukken van afweerrespons), 2) bij weefsel herstel (door groeifactoren en cytokines over te brengen), 3) in neurodegeneratieve ziekten als Parkinson's en Alzheimer's (verspreiding van verkeerd gevouwen eiwitten zoals amyloid-beta en tau), 4) in het cardiovasculaire systeem (endotheelcel- en bloedplaatjes-EVs kunnen bijvoorbeeld angiogenese reguleren), 5) in infectie (EV uitwisseling tussen pathogeen en host), 6) bij embryonale ontwikkeling (cel differentiatie, weefsel organisatie), 7) maar ook bijvoorbeeld bij tumorgroei en metastase (PMID: 37535245).

Er is dus al veel bekend over EVs en hun mogelijke rol in communicatie. Echter is ook duidelijk dat de manieren waarop dezelfde cellen gekweekt kunnen worden, bijvoorbeeld in 2D-monoculturen op plastic of in 3D gemixt met andere celtypen, veel verandert aan de hoeveelheid, de grootte, alsmede de eiwit inhoud van de EVs die uitgescheiden worden (PMID: 30828519; 31506601). Ook is weinig tot geen van de data in een compleet (patho)fysiologische setting gevalideerd (PMID: 26967288). Dit roept de vraag op wat de natuurlijke omstandigheden van een cel in een orgaan én de wederzijdse afhankelijkheid van de verschillende organen precies voor invloed heeft op de hoeveelheid maar ook de eiwitinhoud van de EVs die door deze cellen uitgescheiden worden. Dit is nog totaal onbekend. Daarom is beter begrijpen van EV-communicatie is cruciaal voor het ontwikkelen van therapieën en het verbeteren van de precisie van medicijnen.

Samengevat wordt het onderzoek naar EVs momenteel sterk bemoeilijkt door twee factoren 1) EVs zijn heel klein, in de orde van 50 - 250 nanometer in diameter; hierdoor zijn ze lastig direct te observeren met microscopie; 2) EV-communicatie is een complex proces omdat het tussen gespecialiseerde- en onderling afhankelijke orgaansystemen plaatsvindt. Het visualiseren van 'endogene' EVs in hun fysiologische (of pathologische) context is daarom heel belangrijk om hun functie beter te begrijpen. Echter is de onderlinge afhankelijkheid van orgaansystemen niet na te bootsen met weefselkweek modellen. Hiervoor blijven diermodellen erg belangrijk.

Hoewel *muizenmodellen* dichter bij de mens staan dan *zebravismodellen*, zijn er een aantal significante problemen voor het bestuderen van EVs in muizen. Muizenmodellen laten alleen het observeren van individuele grote membraanafsnoeringen (>0.5 micrometer) toe in het weefsel dat zich direct achter het chirurgisch geïmplanteerde imaging window bevindt, of alleen grote hoeveelheden in bulk geïnjecteerde EVs die zich samenhoppen in een orgaan met een lage optische resolutie. Hierdoor gaat er veel biologisch-relevante informatie verloren. *Zebravissen* daarentegen bieden een unieke mogelijkheid om endogene EVs met hoge resolutie door het hele lichaam heen te visualiseren (PMID: 34446922). In het bijzonder in de larven van zebravissen (die volledig transparant zijn), kun je juist ook individuele EVs in de 50 - 250 nanometer range waarnemen en visualiseren. Naast deze nuttige eigenschap van transparantie (wat ze erg geschikt maakt voor microscopie), delen zebravissen als gewervelde dieren ook het basale vertebraten bouwplan met de mens met de onderling afhankelijke orgaansystemen.

Vanwege onze interesse in de functie van EVs en de belangrijke onopgeloste vragen in het veld, stellen we de hier onder weergegeven specifieke onderzoeksvragen voor. Hoewel het onderzoek in de pioniersfase breed begint, zal het geleidelijk meer gefocust worden naarmate het project vordert.

- Welke EV-gemedieerde communicatieroutes bestaan er tussen verschillende organen zoals tussen de lever, de pancreas, de darmen, het cardiovasculaire systeem en het brein? Op basis van literatuur en preliminair werk verwachten we dat de darmen en de lever belangrijke EV uitscheidende organen zijn.
- Welke "moleculaire informatie" wordt er binnen de meest actieve communicatieroutes die we aantreffen precies uitgewisseld via EVs in een normale, gezonde situatie? Hierbij zullen we in eerste instantie kijken naar eiwit en RNA, maar met een specifieke focus op eiwitten, die direct betrokken

lijken te zijn bij zowel het bepalen van de doelorganen (zie hieronder) als wel het mediëren van moleculaire signaaloverdracht. Omdat er nog vrijwel niets bekend is over *in vivo* overdracht van eiwitten via EVs, kiezen we hier voor een unbiased proteomics approach.

- Op welke manier(en) wordt de specificiteit van deze communicatieroutes gewaarborgd, zodat de EVs hun juiste 'doelorgaan' vinden?
- Heeft pathologie in een specifiek orgaan een versturende werking op de communicatieroutes, en zo ja, welke:
 - Worden er meer of minder EVs overgedragen?
 - Gaan de EVs naar dezelfde en/of naar andere target organen?
 - Verandert er iets op eiwitniveau aan de moleculaire informatie die wordt overgedragen?

De specifieke pathologie(ën) waarnaar gekeken zal worden is gekozen op basis van I) de specifieke communicatieroute, en II) de aanwezigheid van een duidelijk systemische component in de pathologie (i.e. de pathologie blijft niet beperkt tot het orgaan zelf) omdat daar een "EV-communicatiestoornis" het meest voor de hand ligt. Inderdaad zie je vaak in ziektebeelden dat de pathologie zich in eerste instantie in één specifiek orgaan ontwikkelt, maar zijn de effecten ervan te zien door het hele organisme heen. In geval van de darmen is dit darmkanker, en in geval van de lever, leververvetting, ook wel non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) genoemd.

Tumor EVs zijn dus onder andere betrokken bij de metastase van de primaire tumor. Dit kunnen ze doen door de toekomstige plek van metastase te 'primen'. Dit primen houdt in dat de tumorcellen die van de primaire tumor in de bloedbaan terechtkomen makkelijker kunnen extravaseren (uit te bloedbaan komen) en uitgroeien op plekken waar ook eerst EVs van de primaire tumor zijn geweest (PMID: 22635005; 37059067). Tumor EVs zijn ook betrokken bij tumor angiogenese, het proces waarbij bloedvaten worden aangelegd naar de tumor (PMID: 31646189). Dit proces kunnen ze stimuleren. Verder is er bijvoorbeeld uit *in vitro* experimenten met gepolariseerde darmepitheel cellen bekend dat gezond darmepitheel ook specifieke EVs uitscheidt aan de kant van de cellen (basolateraal) die naar de interne bloedvaten gericht zijn (PMID: 14633944). Hoewel het aannemelijk is dat dit ook in levende organismen plaatsvindt, is het niet bekend in welke mate dit het geval is, en ook wat de functie van deze EVs vervolgens is. Gebruikmakend van vergelijkbare methoden is bekend dat ook levercellen EVs uitscheiden, en tevens dat de eiwitten die daarin zitten anders zijn in geval van pathologie, waaronder NASH/NAFLD (PMID: 30202821). Als we meer uitzoomen, is inmiddels duidelijk dat alle celtypen in *in vitro* weefselkweken hoge aantallen EVs uitscheiden.

Naar verwachting zullen darm en lever twee van de meest belangrijke EV uitscheidende organen zijn en zullen daarom deze twee pathologieën als uitgangspunt worden genomen.

- Hoe draagt deze 'miscommunicatie' bij aan het ontstaan of het verdere verloop van deze ziekteprocessen?

Een van de belangrijkste verwachte uitkomsten van dit onderzoek is het ontrafelen van specifieke EV-communicatieroutes in een volledige endogene ofwel *in vivo* setting. Hierbij zullen we achterhalen welke eiwitten er precies worden overgedragen via EVs van het ene orgaan naar het andere, wat de functie van deze uitwisseling is, en hoe zich dit tot het ontstaan en verloop van pathologie verhoudt. In het kort is de strategie die hierbij gehanteerd gaat worden (zie ook **Figuur 1** onder **3.2.1**) om eerst met optische reporters te kijken wat de meest belangrijke doelorganen zijn van EVs uit de darm en EVs uit de lever respectievelijk ('EVs tracken'). Vervolgens zal met een speciaal ontwikkelde reporter worden gekeken welke eiwitten er precies worden overgedragen naar de respectievelijke doelorganen ('EV-eiwit overdracht bepalen'). Omdat de vislijnen die hiervoor nodig zijn nog niet bestaan, zullen deze daarom in het eerste subdoel gemaakt worden ('Zebravislijnen genereren', zie ook bijlage 1).

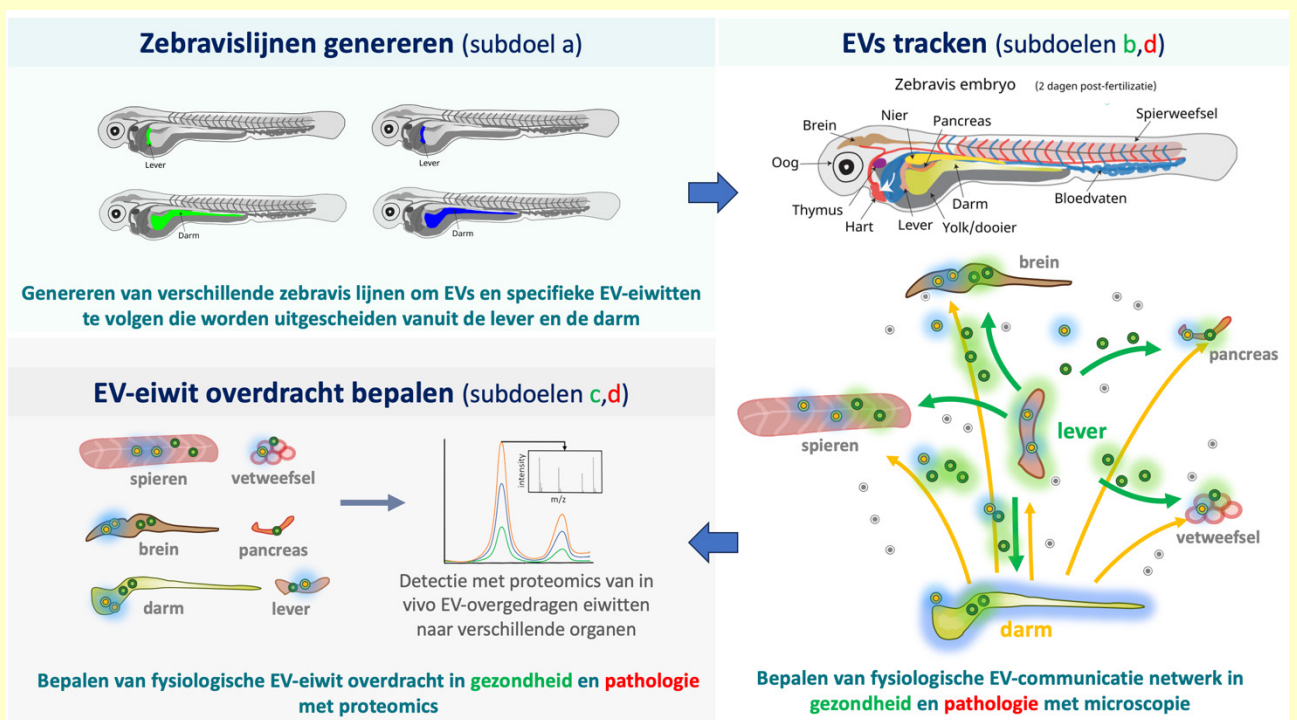
Het voorgestelde onderzoek zal plaatsvinden in een state-of-the-art zebnavis faciliteit door onderzoekers die al meer dan 10 jaar onderzoek doen aan EVs. Het visualiseren van EVs in zebnavissen is gepioneerd door de projectleider zelf, en heeft al geleid tot een zestal primaire onderzoeks- dan wel review artikelen (PMIDs: 30745143, 30745140, 31916933, 31400828, 34446922, 34761174).

3.2 Doel

3.2.1 Beschrijf het directe en het uiteindelijke doel van het project. Beschrijf de bijdrage van het behalen van het directe doel aan het uiteindelijke doel.

- Indien het directe doel bestaat uit verschillende subdoelstellingen, benoem deze dan hier.

De wetenschappelijke hoofddoelstelling van dit project is om de mate waarin en de functie van EV-uitwisseling tussen organen in een organisme plaatsvindt op te helderen. Deze hoofddoelstelling is opzettelijk breed geformuleerd, omdat er nog in feite nog nauwelijks iets bekend is over EV-uitwisseling tussen organen in een volledig natuurlijke, *in vivo*, context. Juist hier heeft het zebrawismodel een unieke positie, omdat het de mogelijkheid biedt om voor het eerst de EV-uitwisseling tussen de verschillende organen in kaart te brengen en de functie ervan te onderzoeken in een volledig natuurgetrouwe context.



Figuur 1. Schematische weergave van het beoogde plan met de verschillende subdoelen. In de eerste fase (subdoel a) worden alle lijnen gegenereerd die nodig zijn om de overige subdoelen te adresseren. In subdoelen b-d worden EVs eerst met microscopie gevolgd om de doelorganen te bepalen in gezondheid en pathologie om dit onderling te vergelijken (subdoelen b,d). Daarna worden met een speciale techniek alle eiwitten die in EVs kunnen komen gelabeld in de darm en de lever, en na overdracht via EVs uit de in (b,d) organen geïsoleerd om ze te detecteren met behulp van proteomics (c,d). Op die manier kunnen we op een onbevooroordeelde manier zien welke eiwitten er via darm- en lever-EVs naar welke andere organen worden overgedragen, en hoe dat verandert tijdens metabole verstoringen (pathologie).

De te onderscheiden subdoelen binnen de hoofddoelstelling zijn:

a) Transgene lijnen genereren met orgaan-specifieke EV-reporters en remmers

Hiervoor zullen 2 typen reporters worden gebruikt: *fluorescente* EV-reporters en -remmers voor read-out met licht microscopie (om overdracht en signalerings functionaliteit van EVs te visualiseren), en *biotinylatie*-reporters voor read-out van EV-eiwit overdracht op basis van proteomics. Deze zullen met weefsel-specifieke promotoren (bijv. voor expressie van de reporters in alleen de darm of alleen de lever) tot expressie worden gebracht. Om de lijnen te genereren worden twee methoden voorgesteld, één veelbelovend recent ontwikkelde methode die waarschijnlijk voor significante reductie van het aantal proefdieren zorgt, en een conventionele methode (zie **Figuur 1**) die als back-up wordt gebruikt als de nieuwe methode niet werkt.

b) Opstellen van een 'landkaart' met de doel-organen van darm- en lever-specifieke EVs

Met behulp van de onder a) gegenereerde transgene lijnen zullen de verschillende doelorganen worden geïdentificeerd van EVs die door darm- en levercellen worden uitgescheiden.

c) Bepaling van specifieke eiwit-overdracht via EVs naar verschillende doelorganen

Met behulp van de onder a) gegenereerde transgene lijnen en de kennis opgedaan in b) zullen hier de doelorganen worden geanalyseerd op EV-overgedragen eiwitten met behulp van proteomics, en onderling vergeleken tussen de verschillende doelorganen.

d) Het induceren van metabole verstoringen

Om de rol van EV 'miscommunicatie' in de progressie van ziektes beter te begrijpen, zullen er twee metabole verstoringen worden toegepast: 1) inductie van non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) door een hoog cholesterol dieet (PMIDs: 30572006; 31867007; 31182918); 2) inductie van darmkanker door induceerbare kras^{G12D/V} transgeen expressie of het xenograften van tumor cellen (PMID: 17517602; 29592890; 30390498; 19400945). Gebruikmakend van de tools gegenereerd onder subdoelen a) en d) zal het effect van metabole verstoringen op EV-communicatie als wel de rol van verstoorde EV-communicatie op het verloop van ziekte progressie bepaald worden. Deze inzichten zullen vervolgens worden vergeleken met de normale situatie zoals geanalyseerd onder b) en c).

Het directe wetenschappelijke doel van deze studies is de verschillende EV-communicatie routes vanuit de darm en lever in kaart te brengen, te begrijpen wat voor boodschap er precies wordt overgebracht op eiwitniveau, en welke relatie verstoring van deze communicatie heeft met ziekte.

Het uiteindelijke doel van deze studies is om voor het eerst in kaart te brengen in welke mate eiwitten naar andere organen worden overgedragen door middel van EVs, en om daarmee 1) tot een onbevooroordeelde en veelomvattende set van eiwitten te komen die worden overgedragen naar verschillende organen, 2) te achterhalen in welke mate deze communicatievorm specifiek is – dus specifieke informatie naar specifieke organen overbrengt, en 3) de relevantie van deze communicatieroute(s) tijdens gezondheid en ziekte te begrijpen.

3.2.2 Hoe wordt de haalbaarheid van het directe doel gewaarborgd?

Als eerste heeft de hoofdaanvrager ruime ervaring met het maken van transgene lijnen, zebnavis kankermodellen, het tracken van EVs met live microscopie in zebnavis, en het isoleren en analyseren van zebnavis EVs met behulp van proteomics (PMID: 30745143; 30745140; 31916933). Hiermee zijn a en b gewaarborgd (proof of principle) en een deel van c. Voor inductie van metabole verstoringen wordt gebruik gemaakt van beproefde methodes uit de literatuur, en ook gebruik gemaakt van de NAFLD expertise aanwezig op Utrecht Science Park (Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Utrecht). Het fundamentele onderzoeksgedeelte van deze vergunningsaanvraag is onderdeel van recent toegekende NWO- en ERC-aanvragen waarmee ook de financiële voorwaarde geborgd is (VI.Vidi.213.106, CROSSTALK-ERC-2022-StG). Tenslotte is er jarenlange expertise aanwezig bij de vergunningsaanvrager (celbioloog), het hoofd van het aquarium (MSc Biomolecular Sciences) en de dierverzorgers in het aquarium. De infrastructuur van de aquariumfaciliteit, bestaande uit een dierverblijf (D-I unit) t.b.v. de huisvesting van de proefdieren, is een eind 2019 in gebruik genomen state-of-the-art faciliteit. Deze aquariumfaciliteit is toereikend voor de geplande dierproeven. Direct naast de D-I unit, is een ML-I unit aanwezig t.b.v. de transgenese van de zebnavissen. Door de permanente aanstelling van de vergunningsaanvrager en het hoofd van het aquarium, blijft de kennis en kunde binnen de onderzoeksgroep aanwezig en is gewaarborgd dat gedurende het project aan de 3V-beginselen voldaan kan blijven worden. Door de fysieke inperkingen die in het aquarium aanwezig zijn, kunnen mens, dier en milieu geen effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven.

Wetenschappelijke samenwerking is essentieel voor de haalbaarheid van het project. In dit onderzoek werken we samen met onderzoekers uit Duitsland voor de ontwikkeling van onze in vivo biotinylation toepassing, met een onderzoekersgroep binnen onze eigen faculteit voor het aan- of uitzetten van EV secretie, en voor zebnaviswerk, met name voor het genereren van nieuwe lijnen, met onderzoekers van Universiteit Utrecht en Universiteit Leiden. Voor de pathologie modellen werken we samen met onderzoekers van Amsterdam voor darmkanker, en voor NAFLD met onderzoekers van de faculteit diergeneeskunde in

Utrecht. Voor ons EV-onderzoek in algemenere zin (niet- zebnavis gerelateerd) werken we ook nauw samen met onderzoeksgroepen in Nederland (m.n. Utrecht, Amsterdam) en Frankrijk (Parijs, Nantes).

3.2.3 Is voor de uitvoering van dit project andere wet- en regelgeving van toepassing die een invloed zou kunnen hebben op het welzijn van de dieren en/of de haalbaarheid van het directe doel?

Nee

Ja > Geef aan welke wet- en regelgeving van toepassing is en beschrijf de effecten daarvan op het welzijn van de dieren en de haalbaarheid van het project.

[Click or tap here to enter text.](#)

3.3 Belang

3.3.1 Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelen.

Wetenschappelijk belang

Hoewel EVs veelvuldig geïmpliceerd zijn in cruciale processen in gezondheid als ziekte, met name kanker en (andere) metabole verstoringen zoals NAFLD (PMID: 37059067, 37394346), blijft er nog veel onduidelijk over de precieze rol die EVs hierin spelen. Dit is met name het geval als het gaat over de situatie *in vivo*, in levende organismen, wat daarmee de meest urgente vraag binnen het veld is. Dit komt door met name twee dingen: 1) EVs zijn ontzettend klein, en worden daarom vaak alleen indirect, op biochemische manier bestudeerd; 2) om ze op die manier te bestuderen, worden de EVs eerst geïsoleerd uit hun normale omgeving, voordat ze worden geïntroduceerd in celkweek experimenten of geïnjecteerd in muizenmodellen. Kortom, manieren om EVs direct in hun natuurlijke omgevingen te bestuderen ontbreken, wat een significante bottleneck is voor het basale begrip van EVs. Dit heeft eveneens als gevolg dat ook de klinische toepassingen voor diagnostiek en therapie achterlopen. Om deze problematiek te ondervangen, heeft de hoofdaanvrager hier een zebnavismodel voor ontwikkeld (PMID: 30745143).

In dit onderzoek willen we voor het eerst de functionaliteit van EVs in een volledige *in vivo* setting op een directe manier en precieze manier te bestuderen. Dit doen we door 1) de EVs die *in vivo* worden uitgescheiden te visualiseren en te volgen in de zebnavis larve met microscopie, om zo de doelorganen te bepalen; 2) de EV-uitscheiding *specifiek* te remmen, dus het remmen van *alleen* EVs (en geen/zo min mogelijk andere typen communicatie routes), en het remmen van EVs *alleen in een specifiek weefsel* namelijk de lever of de darm. 3) het bepalen van de eiwit inhoud van EVs die naar specifieke weefsels gaan. Door deze drie strategieën kunnen we erachter komen waar EVs vanuit de darm of lever heen gaan, wat er precies wordt overgedragen in de vorm van eiwitten, en wat het belang hiervan is op de doelorganen tijdens gezondheid of metabole verstoring. Door EV-secretie aan of uit te zetten kunnen we namelijk bepalen wat het effect is op het ontvangende orgaan, met name effecten op e.g. groei, inflammatie en de metabole status van de ontvangende cellen.

Dankzij dit model kunnen we nu daadwerkelijk antwoord gaan geven op de hierboven genoemde belangrijke vragen, wat naar verwachting veel nieuw mogelijkheden voor verder onderzoek en klinische toepassingen opent.

Maatschappelijk belang

Hoewel deze studie in eerste instantie een fundamenteel wetenschappelijk belang dient, is deze op basaal niveau toegepast op twee hoog-prevalente pathologieën in onze samenleving, namelijk darmkanker (>125.000 nieuwe diagnoses per jaar alleen al in Nederland) en non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD, 25% van de volwassenen, en zelfs 35% >65 jaar) (PMID: 34822762, 36856579; 36517002, 37798233). Deze studie kan daarmee mogelijk bijdragen aan verbeterde diagnose, en mogelijkheden creëren voor nieuwe aangrijpingspunten van therapieën. Dit komt doordat deze studie antwoord geeft op twee cruciale vragen: 1) welke invloed heeft de ontwikkeling van pathologie op de hoeveelheid en de precieze inhoud van EVs die uitgescheiden worden door het aangetaste orgaan? 2) wat is de biodistributie van deze pathologie-specifieke EVs? De antwoorden op deze twee vragen gecombineerd zijn van groot belang voor therapie (drug-targeting) om het juiste medicijn op de juiste plek te krijgen, en diagnostiek (biomarker discovery) die kan helpen bij de vroegtijdige detectie van deze ziekten.

Met betrekking tot diagnostiek kunnen we verwachten dat ons onderzoek duidelijk maakt of er specifieke eiwitten in hogere of juist lagere mate aanwezig zijn in de EVs van weefsels in pathologische vs gezonde toestand. Deze zijn deels al bekend vanuit in vitro en in vivo studies, maar in ons systeem kunnen we heel selectief de EVs uitgescheiden van specifieke weefsels in vivo isoleren, waardoor de resolutie naar verwachting een stuk hoger ligt terwijl de bovengenoemde nadelen van traditionele 2D-monoculturen niet van toepassing zijn.

Met betrekking tot therapie zal dit onderzoek bijdragen aan een helderder beeld over wat de (eiwit)factoren zijn die bepalen of een EV specifiek naar het ene en niet naar het andere doelorgaan gaat. Hierover is al duidelijk dat integrines een rol spelen in geval van tumor-EVs (PMID: 26524530), maar of dat ook het geval is voor 'normale' EVs in gezonde situaties en of integrines de enige factoren van belang zijn is nog niet bekend. Ook blijft een belangrijke vraag of en hoe EVs die naar specifieke organen gaan kunnen voorkomen dat ze niet worden afgebroken in organen zoals de lever. Deze twee factoren, specifieke targeting van organen en het voorkomen van voortijdige afbraak, zijn twee belangrijke bottlenecks in het drug-targeting veld (PMID: 32243788).

3.3.2 Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden wat hun belang is.

Vergunninghouder en onderzoekers

Het wetenschappelijke belang voor zowel de toekomstige vergunninghouder als de onderzoekers, waaronder de aquariummedewerkers, ligt in de mogelijkheid om het voorgestelde onderzoek uit te voeren. Dit zal leiden tot de creatie van een onbevooroordeelde en uitgebreide dataset van EV-gemedieerd eiwit overdracht naar specifieke organen, die dienen als de fundamentele voor een dieper begrip van EV-communicatie in multicellulaire organismen. Bovendien zal dit gedetailleerde inzicht wetenschappelijk gedocumenteerd worden en openstaan voor publicatie, waarbij de database open source beschikbaar wordt gesteld voor alle wetenschappers.

Aquariummedewerkers

Het is in het belang van de aquariummedewerkers om een aanstelling te hebben waarmee ze kunnen bijdragen aan de zorg voor de zebravissen in het aquarium in het kader van het voorgestelde onderzoek. Nieuwe, geoptimaliseerde protocollen (e.g. **P1** onder 3.4.1) zullen echter het aantal zebravissen dat aangehouden moet worden significant verminderen ten opzichte van het huidige standaardprotocol, omdat de variatie afneemt en uit-kruisingen niet/minder noodzakelijk zullen zijn. Doordat effectief het aantal tanks verminderd kan worden, betekent dit ook minder werkdruk voor aquariummedewerkers per gegenereerde lijn.

Zebravis

In de geplande experimenten zal de zebravis fungeren als experimenteel model. Helaas kan het welzijn van deze dieren worden aangetast door het onderzoek, wat zal resulteren in hun behandeling en euthanasie voor wetenschappelijke doeleinden. Nieuwe, geoptimaliseerde protocollen (e.g. **P1** onder 3.4.1) zullen echter het aantal zebravissen van ≥ 5 dpf (i.e. ouder dan 120 uur) dat gebruikt moet worden aanzienlijk verminderen.

Samenleving

De resultaten uit het onderzoek kunnen op de langere termijn een bijdrage leveren aan de translatie van deze studies naar verbeterde diagnostiek en behandeling van pathologieën als darmkanker en NAFLD.

3.4 Strategie

3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project. Besteed aandacht aan de eventuele fasering in de uitvoering en de samenhang. Vermeld eventuele mijlpalen, keuzemomenten en besliscriteria.

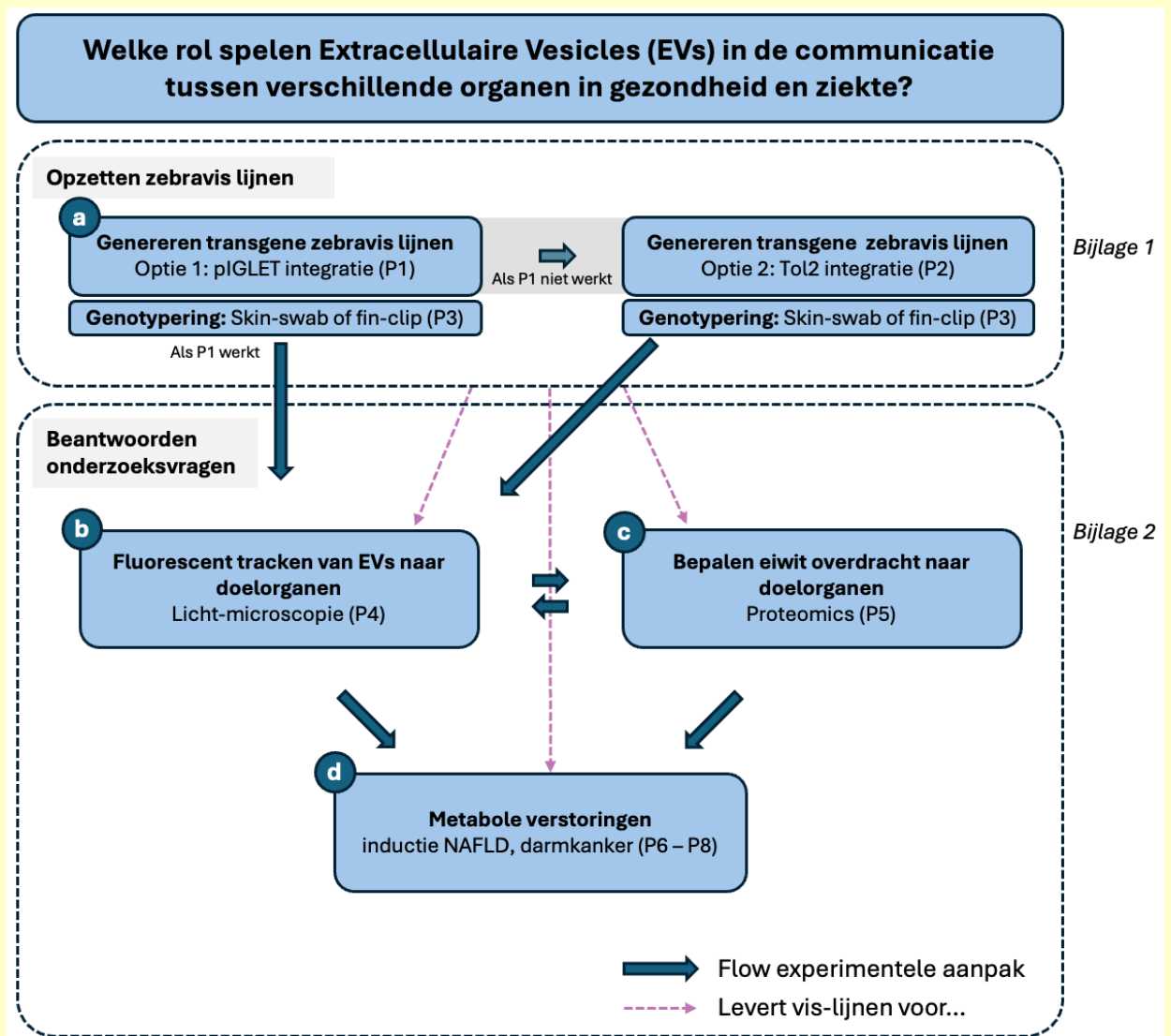
Het directe wetenschappelijke doel van bovengenoemde studies is het in kaart brengen van specifieke EV-communicatieroutes vanuit de lever en de darm naar andere organen in de vis in gezondheid en pathologie. Hierbij wordt gekeken naar de biodistributie (waar gaan de EVs precies heen), naar de inhoud (welke eiwitten

worden er overgebracht), en de specificiteit (welke eiwitten worden exclusief naar één doelorgaan overgedragen).

De te volgen procedures zijn als volgt, uitgewerkt per subdoel als beschreven in 3.2:

a) Transgene lijnen genereren met orgaan-specifieke EV-reporters

Hiervoor zullen 2 procedures getest worden (**P1** en **P2**), om de transgene lijnen te genereren die de fluorescente- en EV-eiwit-labelende reporters conditioneel tot expressie brengen, door middel van fluorescent labels zoals pHluorin/HALO (PMIDs: 9671304; 18533659) en de UltraID (PMID: 35788163) tag respectievelijk. De conditionele expressie in tijd en plaats zal plaatsvinden door gebruik van weefsel-specifieke promotoren en induceerbare expressie door het TetON systeem (PMID: 21041642).



Figuur 2. Schematisch overzicht van de algemene opzet van het project om de rol van Extracellulaire Vesicles (EVs) in de communicatie tussen verschillende organen in gezondheid en ziekte te bestuderen. Onder subdoel a vallen twee verschillende procedures (**P1-P2**) om stabiele transgene lijnen te maken. De eerste procedure heeft de voorkeur, omdat deze het minst aantal dieren vereist om de lijnen te genereren, en daarmee ook een kleinere belasting legt op de zebrafish faciliteit. Als deze methode tegen verwachting inefficiënt blijkt, zal voor procedure P2 gekozen worden. Hierna volgt subdoel b. het visualiseren van EV-overdracht, subdoel c. het bepalen van EV-gemedieerd eiwitoverdracht naar specifieke organen, subdoel d. het toepassen van verschillende metabole verstoringen om het effect op EV-communicatie te bestuderen. Bij subdoel d. worden de bevinding van b&c toegepast op vissen met metabole verstoring

P1. De meest gangbare technieken voor transgeen insertie, knock-in (KI) of knock-out (KO) zoals Tol2 integratie (PMID: 19504063) zijn erg materiaal-, tijd- en capaciteit rovend; dit komt met name door foutgevoeligheid (i.e. off-target effecten, foutieve integratie/mutatie, meervoudige integratie van het transgeen), waardoor relatief veel founders en meerdere generaties nodig zijn om de gewenste verandering in een schone achtergrond te krijgen. Het gebruik van een 'safe harbor' site zoals de Rosa26 locus in muizen (PMID: 9916792) ondervangt dit, omdat hierdoor het gen van interesse op één specifieke, gekarakteriseerde plek in het genoom gezet wordt waarvan bekend is dat het geen off-target effecten veroorzaakt. Vanwege de snelheid van integratie is de kans op kiem-lijn integratie zeer hoog (25-50%), waardoor uitgebreide outcross(-outcross)-incross strategieën in principe overbodig zijn. Recentelijk is deze safe-harbor strategie voor het eerst in zebra vis opgezet (PMID: 38838146 ('pIGLET')). Hier zullen we dan ook gebruik van gaan maken.

P2. Deze procedure berust op het klassieke Tol2 integratie systeem (PMID: 19504063) en fungeert als back-up voor P1, in het onwaarschijnlijke geval dat P1 niet werkt en we toch gebruik moeten maken van de klassieke Tol2 integratie (hierboven en in bijlage 1 beschreven).

P3. Om te bepalen of P1 dan wel P2 heeft geleid tot de gewenste stabiele integratie van het transgen in het genoom van de zebra vis (en of de integratie homo- of heterozygoot is) zal er een genomische PCR worden uitgevoerd. Om input materiaal voor deze PCR te verzamelen zal in de meeste gevallen (>95%) een 'skin-swab' uitgevoerd worden. Als dat niet succesvol blijkt (i.e. geen PCR product), zal een 'fin-clip' uitgevoerd worden om voldoende input materiaal te verzamelen.

b) Opstellen van een 'landkaart' met de doel-organen van darm- en lever-specifieke EVs

Met behulp van de onder subdoel a) gegenereerde transgene lijnen zullen de verschillende doelorganen worden geïdentificeerd van EVs die door darm- en levercellen worden uitgescheiden. Om de aanwezigheid van de EV-reporter in de doelorganen te visualiseren, zullen de vissen onder de microscoop bekeken worden.

P4. Na optimalisatie van de expressie van de EV-reporters in deze weefsels in <5dpf (i.e. tot 120 uur) zebra vis embryo's, zullen deze vissen worden opgegroeid tot max 29 dagen post fertilisatie (29dpf) om de distributie van de EVs in verschillende doelorganen te bepalen met behulp van lichtmicroscopie.

Dankzij hun transparantie kunnen de fluorescente EVs waargenomen kunnen worden, zoals voorheen door de aanvrager al gedaan is in zebra vis embryo's van 3pdf (PMID: 30745143). Hiermee zullen zowel de doelorganen zelf, als de (relatieve) hoeveelheid EV-overdracht per orgaan in kaart worden gebracht. De hoeveelheid kan met nauwkeurigheid gemeten worden dankzij induceerbare reporter-labeling (PMID: 21041642). Deze informatie is van belang voor subdoel c).

c) Bepaling van specifieke eiwit-overdracht via EVs naar verschillende doel-organen

Met behulp van de onder subdoel a) gegenereerde transgene lijnen (UltraID EV-reporter) en de kennis opgedaan in subdoel b) (doelorganen van darm en lever EVs) zullen hier de doelorganen worden geanalyseerd op EV-overgedragen eiwitten, en onderling vergeleken.

P5. De UltraID-reporter transgene zebra vissen zullen worden geïncubeerd met biotine (Vitamine B8). Uit de literatuur is bekend dat overnacht incubatie met deze concentratie biotine in het medium voldoende is voor het functioneren van de UltraID reporter, en geen aantoonbare bijwerkingen heeft (PMID: 33591275), net als voor de mens (Ned Tijdschr Geneesk. 2020;164:D4762). Na activatie van de UltraID reporter, zullen de vissen na de in b) bepaalde tijdspanne (die voldoende EV-overdracht naar de doelorganen garandeert) geëuthanaseerd worden met MS-222 waarna de verschillende doelorganen door dissectie geoogst zullen worden. Deze doelorganen, zullen vervolgens gebruikt worden voor analyse van biotine-gelabelde eiwitten met behulp van massaspectrometrie. De vissen zullen voor deze experimenten tot maximaal 29 dpf gebruikt worden.

d) Het induceren van metabole verstoringen

Om de rol van EV 'miscommunicatie' in de progressie van ziektes beter te begrijpen, zullen er twee metabole verstoringen experimenteel worden geïnduceerd: I) non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), P6; en II) darmkanker, respectievelijk P7 en P8. NAFLD is een geschikt model voor (verstoringen in) communicatie

tussen meerdere organen omdat de primaire oorzaak (leververvetting) duidelijk in één orgaan ligt, maar de verstoring in meerdere organen effecten heeft (o.a. de darm en pancreas). Darmkanker is een ander belangrijk model, omdat er hier ook sprake is van een primair aangetast orgaan (de darm) en secundaire effecten zoals uitzaaiing naar de lever, en de 'voorbereidende' processen die daaraan voorafgaan waar EVs gedacht worden een belangrijke rol in te spelen.

P6. Voor NAFLD-inductie zal gebruik gemaakt worden van een bestaand protocol voor NAFLD-inductie in zebnavis larvae door middel van een hoog cholesterol dieet. Dit induceert de ontwikkeling van NAFLD, en laat ook typische fenotypes zoals immuun (macrofaag) clustering en activatie, oxidatieve stress, en pancreas ontsteking (PMIDs: 30572006; 31867007; 31182918). Dit zal worden opgezet in samenwerking met een collega aan de Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Utrecht, die ruime ervaring heeft met dit modelsysteem.

P7. Voor inductie van darmkanker zal een bestaand model gebruikt worden door induceerbare kras^{G12D/V} transgeen expressie in de darm (PMID: 29592890). Dit model is uiterst geschikt om te visualiseren hoe transformatie van gezonde cellen het EV-communicatie patroon veranderd. Voor inductie zal van het bekende UAS:Gal4 systeem en/of TetON systeem gebruik gemaakt worden.

P8. Als aanvullend model zal er een bestaand protocol (PMID: 19400945) voor xenotransplantatie van humane darmkanker cellen in de perivitelline ruimte (de ruimte tussen de yolk (dooier) en het buitenmembraan van de yolk) gebruikt worden. Dit model is uiterst geschikt om te bestuderen hoe EVs afkomstig uit de kankercellen de aanleg van bloedvaten beïnvloeden.

Tijdsafhankelijkheid/resultaatsafhankelijkheid & Go/no-go beslissing

Binnen **subdoel a** zal procedure **P2** alleen gebruikt worden als **P1** niet de gewenste resultaten oplevert, i.e. als **P1** niet tot vermindering maar juist vermeerdering zorgt van het totaal aantal zebnavissen ≥ 5 dpf (i.e. ouder dan 120 uur) dat nodig is voor het genereren van transgene lijnen. Omdat er ruime praktische ervaring aanwezig is met **P2**, zal dit in een vroeg stadium duidelijk worden. De daaropvolgende procedures (binnen **subdoel b** zijn afhankelijk van **subdoel a** (**P1** of **P2**), die goed haalbaar zijn. Binnen **subdoel b, c en d** is **subdoel c** (**P5**) strikt genomen niet afhankelijk van **subdoel b** (**P4**), maar **subdoel b** zal de precieze strategie helpen definiëren: met behulp van de 'landkaart' krijgen we zowel een kwalitatieve (*welke* doelorganen worden er precies getarget) als een kwantitatieve (*hoeveel* EVs worden er overgedragen naar deze doelorganen) inschatting van welke organen we analyseren, en hoeveel van deze organen we nodig hebben voor een juiste inschatting, en kan derhalve fungeren als een trechter/funnel. **Subdoel d** (**P6, P7 en P8**) is tijdsafhankelijk van **subdoel a, b en c**.

Hierom zal er zo snel mogelijk begonnen worden met **P1**; de *in vitro* fase hiervoor, waar stabiele zebnavis cellijnen voor worden gebruikt, is reeds in volle gang. Hetzelfde geldt voor het ontwerpen en optimaliseren van de verschillende reporters genoemd onder a), c) en d). Vanwege de ervaring van de hoofdaanvrager met deze en vergelijkbare reporters (PMID: 30745143), zal dit naar verwachting voorspoedig gaan. Hoewel **P1** in eerste instantie mogelijk meer tijd kan kosten, verwachten wij uiteindelijk significante tijdswinst en winst (in dit geval vermindering) in vissen, materiaal- en verzorgingskosten te bewerkstelligen, die zelfs al binnen het bestek van dit project dus significante winst oplevert. Ter illustratie: De huidige transgene procedures vereisen verschillende stappen. Na het assembleren van de transgene constructen, worden F0-zebnavissen gegenereerd en opgekweekt gedurende ongeveer drie maanden. Deze moeten worden gecontroleerd op juiste (= niet schadelijke) insertie van het transgen in het genoom van de vis. Positieve F0-zebnavissen worden vervolgens gekruist met wildtype-zebnavissen en de F1-generatie wordt gedurende ongeveer drie maanden opgekweekt. Na deze stappen kunnen de F2-nakomelingen relatief snel worden gecontroleerd, wat ongeveer een maand in beslag neemt. Hierdoor kunnen we vaststellen welke van hen heterozygoot, homozygoot transgeen of homozygoot wildtype zijn door ze te kruisen met wildtype-zebnavissen. Kortom, het duurt op deze manier minimaal een jaar voordat we de benodigde transgene zebnavissen beschikbaar hebben voor verdere studies. Met de nieuwe voorgestelde procedure kunnen we naar verwachting de F0 al gebruiken voor ons onderzoek, omdat de insertie snel werkt en geen off-targets kan hebben. De F1 generatie zal in dat geval puur gegenereerd worden om de lijn aan te houden, en het aantal handelingen (o.a. injectie in 1-cel stadium) te verminderen. Mocht de snelheid van integratie niet

snel genoeg gebeuren en/of het mozaïek-expressie patroon (niet alle cellen binnen een weefsel brengen het gen tot expressie) is niet gewenst voor de toepassing, zullen we de F1 gebruiken voor de experimenten.

3.4.2 Onderbouw de gekozen strategie.

Het hoofddoel van het onderzoek is "het in kaart brengen van specifieke EV-communicatieroutes vanuit de lever en de darm naar andere organen in de het modelsysteem (zebravis) in gezondheid en pathologie". De voorgestelde studie zal uitgevoerd worden in de zebravis (*Danio rerio*). Zebravissen zijn al tientallen jaren een belangrijk modelsysteem voor gewervelde dieren vanwege hun hoge vruchtbaarheid, snelle embryonale ontwikkeling en bijna transparante embryo's. Deze eigenschappen maken het een ideaal systeem voor het bestuderen van de ontwikkeling van gewervelde dieren, de functie van verschillende fysiologische processen bij volwassenen, veroudering, en vergelijkende genomica. Op moment van schrijven zijn een aantal methoden geoptimaliseerd om de genetische manipulatie van deze kleine vissen te vereenvoudigen, waardoor verschillende menselijke en/of ziektegerelateerde genen in zebravissen (larven) tot expressie kunnen worden gebracht en ziekteprocessen bij de mens kunnen worden gemodelleerd. Rond de 70% van de menselijke genen komt overeen met die van de zebravis, en ruim 82% van humane ziekte-gerelateerde genen hebben een ortholoog in de zebravis. In tegenstelling tot *Drosophila* en *C. elegans*, die een zeer belangrijke rol hebben gespeeld bij het begrijpen van hun genen en fenotypes, zijn zebravissen gewervelde dieren, en dus meer relevant voor humane fysiologie en daardoor belangrijk vanuit een gezondheids- en ziekteperspectief.

Om het hoofddoel van het onderzoek ("het in kaart brengen van specifieke EV-communicatieroutes vanuit de lever en de darm naar andere organen in de vis in gezondheid en pathologie") te verwezenlijken zullen transgene lijnen en 2 ziektemodellen toegepast dienen te worden. Het genereren van transgene lijnen is nodig om specifieke, stabiele, controleerbare en (technisch) reproduceerbare expressie niveaus te krijgen van 1) de reporter, 2) EV-secretie in het weefsel van interesse, en 3) specifieke, induceerbare tumorvorming in de darm.

De twee ziektemodellen (darmkanker en NAFLD) zijn nodig om te onderzoeken hoe pathologie de EV-communicatiepatronen beïnvloedt, en welke weerslag dit weer heeft op de progressie van de ziekte. Dit naast elkaar zetten van gezondheid en ziekte is essentieel voor een juist begrip van hoe en in welke mate EVs een rol spelen in gezondheid en ziekte in twee belangrijke metabole hubs. Daarnaast zal het naast elkaar zetten en direct vergelijken van deze twee pathologieën waardevolle informatie opleveren over de specificiteit van de waargenomen veranderingen in overgedragen EV-eiwitten.

Er zijn op dit moment geen *in vivo* studies die deze vraag adresseren, voornamelijk vanwege een gebrek aan de juiste modelsystemen en tools.

Behalve het succes in het genereren van de transgene lijnen zijn er geen go-no go momenten. Wel helpt subdoel b bij het maken van keuzes voor subdoel c en d.

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

Volgnummer	Titel bijlage Beschrijving dierproef
1	Genereren van transgene lijnen nodig ter beantwoording van de onderzoeksvragen
2	Behandeling en euthanasie t.b.v. weefseldonatie voor analyse extracellulaire blaasjes (EV) overdracht tussen organen van genetisch gemodificeerde zebravissen.
3	Click or tap here to enter text.
4	Click or tap here to enter text.
5	Click or tap here to enter text.
6	Click or tap here to enter text.
7	Click or tap here to enter text.
8	Click or tap here to enter text.
9	Click or tap here to enter text.
10	Click or tap here to enter text.



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 in de 'Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning' 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.	10800				
1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Utrecht				
1.3 Vul het volgnummer en de titel van de dierproef in. <i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.3 van het format Projectvoorstel.</i>	<table><thead><tr><th>Volgnummer</th><th>Titel dierproef</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Genereren van transgene lijnen nodig ter beantwoording van de onderzoeksvragen</td></tr></tbody></table>	Volgnummer	Titel dierproef	1	Genereren van transgene lijnen nodig ter beantwoording van de onderzoeksvragen
Volgnummer	Titel dierproef				
1	Genereren van transgene lijnen nodig ter beantwoording van de onderzoeksvragen				

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

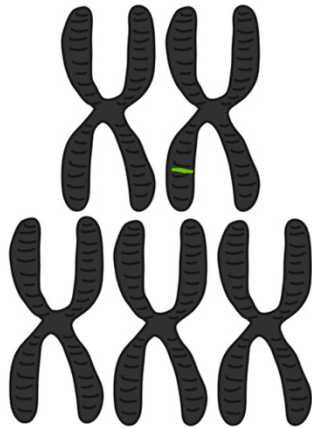
Het hoofddoel van deze dierproef (zie ook Projectvoorstel onder 3.2) is het analyseren en onderling vergelijken van de EV-overgedragen eiwitten naar de verschillende doelorganen onder fysiologische en pathologische condities. Om deze doelstelling te behalen, dienen een aantal nieuwe transgene lijnen gegenereerd te worden. De methodieken die gebruikt worden voor het genereren van deze lijnen wordt in deze eerste bijlage beschreven.

Subdoel a:

Het genereren en de instandhouding van genetisch gemodificeerde (mutanten en transgene) zebrafissen:
Transgene zebrafissen worden gegenereerd door middel van microinjectie in net bevruchte zebrafis eitjes van EV reporter- en/of remmer- constructen die gemaakt worden in mini-circle DNA, compatible met het pIGLET systeem (PMID: 38106217) **P1** (zie ook **Figuur 1.1**). De meeste embryo's kunnen zeer snel, d.w.z. voordat ze zelfstandig kunnen eten, worden geïdentificeerd en geselecteerd met behulp van fluorescentie microscopie doordat het gebruikte construct, een fluorescent gelabeld transgen bezit, en alle promotors voor dag 5 voldoende actief zijn. Als het transgen zelf niet gelabeld kan worden (bij EV-remmer constructen wordt bijvoorbeeld een shRNA of sgRNA tot expressie gebracht die zelf niet gelabeld kunnen worden) zullen we een *myl7::*fluorescent eiwit (FP; EGFP, mCherry of DsRed) controlemarkergen aan het DNA construct toevoegen dat in het hart tot expressie komt en zeker vanaf 1 dag na bevruchting goed zichtbaar is. Als back-up strategie voor de pIGLET strategie (**P1**, veelbelovend, recent ontwikkeld) zullen we terugvallen op de gangbare **P2** techniek, waarbij we gebruik zullen maken van reporterconstructen gegenereerd met de MultiSite Gateway Tol2 transgenese kit. In deze strategie is het transgen geflankeerd door de sequenties van Tol2 transposon uiteinden. Deze reporterconstructen zullen daarom ge-co-injecteert worden met *in vitro* geproduceerd Tol2 transposase mRNA. Als na de eerst 5 door middel van **P1** gegenereerde lijnen blijkt dat P1

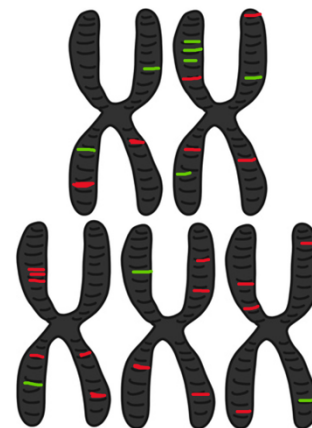
niet leidt tot de verwachte vermindering maar juist vermeerdering van het aantal gebruikte vissen (P1>P2 proefdiergebruik), zal worden gekozen voor P2. Voor deze keuze voor P2 (waar al ruime ervaring mee is) wordt dus het totaal aantal benodigde vissen om een nieuwe transgene lijn te verkrijgen vergeleken met de eerste 5 via P1 gegenereerde lijnen als ijkmoment.

pIGLET (P1): specifieke transgen integratie in bekende locus



Gecontroleerd, enkelvoudige, **juiste** integratie van transgen, zonder schade aan genoom

Tol2 (P2): willekeurige transgen integratie in genoom



Ongecontroleerd, kans op meervoudige-, **juiste** of **foutieve** transgen integratie die **schade** aan het genoom toebrengt

Figuur 1.1 Schematische vergelijking tussen de twee strategieën die voorgesteld worden. pIGLET (P1) maakt gebruik van een unieke, speciaal gecreëerde "landing site" in het genoom, waarvan bekend is dat deze site geen schade toebrengt aan het genoom. Injectie van de transgen plasmides die alleen maar op deze ene "landing site" kunnen integreren zorgen voor stabiele, reproduceerbare, en enkelvoudige integratie van het gen van interesse. De klassieke Tol2-strategie daarentegen berust op stochastische integratie in het genoom, waardoor het transgen ook midden in een belangrijk ander gen of promotor regio geïntegreerd kan worden, of meerder keren geïntegreerd kan worden. Naast het feit dat dit de reproduceerbaarheid en het directe vergelijk tussen verschillende transgene lijnen bemoeilijkt, zijn er ook extra uitkruisingen en daarom meer dieren nodig om de off-target effecten kwijt te raken.

pIGLET strategie (P1): Anders dan bij klassieke Tol2-integratie (P2) waar het transgen stochastisch, op een willekeurige plek in het genoom integreert - mogelijk midden in een ander gen -, kan met de pIGLET strategie (P1) het transgen maar op één specifieke plek in het genoom terecht komen. Dit gebeurt doordat er gebruik wordt gemaakt van een phiC31 integrase dat, anders dan Tol2, unieke DNA sequenties moet herkennen (*attP/attB*) om een transgen in het genoom te integreren. De specifieke plek in het genoom (de "safe harbor landing site") is dus geflankeerd door twee unieke *attP/B*-sequenties, en deze plek is al volledig gekarakteriseerd. Dankzij die karakterisatie weten we dat transgen insertie op deze plek veilig is, en geen schade aan het genoom toebrengt (**Figuur 1.1**). Om een transgene lijn te maken, worden (minicircle) DNA plasmides geïnjecteerd met het transgen van interesse. Door gebruik te maken van plasmiden met de aangegeven componenten in **Tabel 1a/b**, streven we ernaar om minimaal 20 en maximaal 50 verschillende minicircle-plasmiden te genereren voor transgenese. Elk transgenese-plasmide heeft als doel om potentiële F0-founders op te kweken tot uiteindelijk ~30 volwassen F0-zebravissen (hier wordt uitgegaan van een variatie in sekse-ratio tussen de 1/4 en 1/1. Tijdens dit proces zal er nauwelijks verlies optreden doordat we Tol2-geassocieerde fouten (**zie P2**) door het endogene DNA-herstelmechanisme vermijden. Vanuit deze 30 F0-zebravissen, het minimale aantal benodigd voor expressiepatrooncontrole, streven we ernaar om per construct 30 F1-nakomelingen te genereren door F0-zebravissen uit te kruisen met wildtype-zebravissen en op deze manier wordt de 'germline'-transmissie van het transgen te valideren. De identificatie van transgene nakomelingen zal plaatsvinden via fluorescentiemicroscopie of genotypering van embryo's of volwassen vissen. De efficiëntie van integratie in de 'germline' (in de originele studie 25-50%) is bijzonder goed, en daarmee kan

direct in de F0 al tot een homozygoot transgene founder gekomen worden. Voor elk construct kan zo een maximale groepsgrootte van 30 zebravissen worden berekend. Vanwege de afwezigheid van typische bijwerkingen die met Tol2 geassocieerd zijn, zullen er geen kruisingen met wildtype-zebravissen (outcross) gevolgd door inkruisingen nodig zijn om tot homozygote transgene lijnen met een schone achtergrond te komen.

Tol2 strategie (P2): Door gebruik te maken van plasmiden met de aangegeven componenten in **Tabel 1a/b**, streven we ernaar om tussen de 20 en maximaal 50 verschillende Tol2-constructen te genereren voor transgenese. Elk transgeneseplasmide heeft als doel om potentiële F0-founders op te kweken tot ongeveer 50 volwassen F0-zebravissen (vanwege afvallers door genoomschade). Tijdens dit proces kan er tussentijds verlies optreden doordat Tol2-transposase extra insertieplaatsen creëert, die vervolgens worden gerepareerd door het endogene DNA-herstelmechanisme. Vanuit deze 50 F0-zebravissen, het minimale aantal benodigd voor expressiepatrooncontrole, streven we ernaar om per construct 50 F1-nakomelingen te genereren door F0-zebravissen uit te kruisen met wildtype-zebravissen. Op deze manier wordt de 'germline'-transmissie van het transgen aangetoond, aangezien transgenexpressie kan variëren per founder door verschillende integraties en/of integratieplaatsen in het genoom. Positieve F1-zebravissen zullen vervolgens worden ingekruist om zowel groepen homozygote als heterozygote F2-zebravissen, naast wildtype F2-zebravissen, te genereren. De identificatie van transgene nakomelingen zal plaatsvinden via fluorescentiemicroscopie of genotypering van embryo's of volwassen vissen. Op basis van een normale Mendeliaanse distributie wordt verwacht dat ongeveer 25% van de F2-zebravissen homozygoot transgeen zal zijn, 25% homozygoot wildtype, en 50% heterozygoot. Door het inkruisen van homozygote F2-zebravissen worden alleen groepen homozygote transgene en wildtype zebravissen behouden, met een maximale groepsgrootte van 50 zebravissen. Negatieve F0- en F1-zebravissen, en mogelijk ook heterozygote F2-zebravissen, zullen worden geëuthanaseerd. Voor elk construct kan zo een maximale groepsgrootte van 25 zebravissen worden berekend: 12 à 13 F2 homozygote transgene zebravissen en 12 à 13 F2 homozygote wildtype zebravissen.

Van de verschillende transgene zebravislijnen uit één van beide strategieën zullen tussen de 3600 en maximaal 7200 vissen opgegroeid worden. Uitkomstparameters zijn stabiele integratie van de transgen inserts zoals weergegeven in Tabel 1 in het genoom van zebravissen, zonder off-target effecten.

Genotypering van vissen (P3):

Na transgen insertie via P1 of P2 moet bepaald worden of de insertie homo- of heterozygoot is. Dit zal gedaan worden door genotypering met genomische PCR. Om celmateriaal voor deze genomische PCR te verkrijgen, zullen we een nieuwe, verfijnde methode gebruiken ('skin-swab') met minimaal ongerief. Deze methode lijkt op kleine schaal erg effectief. Alleen in het geval dat deze methode niet toereikend is (i.e. genomische PCR geeft geen signaal) zal op de klassieke methode ('fin-clip') worden overgestapt. De kans dat de skin-swab methode niet toereikend is voor P1-gegenereerde vissen is klein, omdat vanwege de bekende genomische locus een universeel primer-pair gebruikt kan worden voor willekeurig welke transgene lijn. Bij procedure P2 is dit random (zie **Figuur 1.1**), wat meer variatie in (transgene lijn specifieke) herkenning kan geven.

Genotypering van vissen door het nemen van een huid uitstrijkje ('skin-swab'):

Een recent ontwikkeld alternatief voor de fin-clip (zie hieronder) voor genotypering is het maken van een uitstrijkje van de huid, waarbij een wattenstaafje wordt gebruikt om slijm van de flank van de vis te verzamelen, dat vervolgens kan worden verwerkt om DNA te extraheren. Voor deze skin-swab (<https://www.nc3rs.org.uk/skin-swabbing-dna-sampling-zebrafish>) worden larven, jonge of volwassen vissen voor ~30 seconden uit het water gehaald, met een net, via de hand vastgehouden, en wordt met een wattenstaafje 1 of 2 maal over de huid gestreken om het materiaal te verzamelen. Hierna wordt de vis weer direct teruggeplaatst. Naar verwachting is sedatie met verdunde MS-222-oplossing (40 mg per liter systeemwater) hier niet noodzakelijk voor, tenzij de vissen vanwege hun grootte of gedrag moeilijk te hanteren zijn, of zonder sedatie meer ongerief lijken te ervaren dan de sedatie zou opleveren, dan wordt dit wel toegepast.

Genotypering van vissen door het nemen van een weefselmonster van de staartvin ('fin-clip'):

Larven, jonge of volwassen zebravissen worden overgeplaatst naar een tank voor sedatie in een verdunde MS-222-oplossing (40 mg/L systeemwater). Na 1,5 minuut zijn de zebravissen verdoofd en vertonen ze geen zwemactiviteit meer. Vervolgens worden ze overgebracht naar een petrischaal, waar een klein deel van de staartvin wordt afgeknipt (dat later zal regenereren). Daarna worden de individuele zebravissen overgebracht

naar minicontainers met systeemwater om te herstellen van de sedatie. Binnen enkele weken zal de startvin volledig regenereren. Na ongeveer 2 minuten wordt de zwemactiviteit hervat, waarna de zebravissen worden ondergebracht in minitanks.

Tijdens genotypering worden zebravissen niet langer dan 3 dagen individueel gehouden, waarna ze in speciale genotyperingsrekken worden geplaatst in het Tecniplast-aquariumsysteem, waar ze nauw contact hebben (zowel visueel als olfactorisch) met hun siblings. Soms wordt ter aanvulling een vis met een opvallend ander fenotype, zoals Albino, TL of Casper, toegevoegd. Wildtype, hetero- en homozygote dragers worden vervolgens groepsgewijs, op basis van hun genotype, ondergebracht in aparte tanks. Deze procedure volgt de richtlijnen zoals beschreven op de webpagina van het Zebrafish Information Network (<https://zfin.org/>) en wordt veelvuldig nationaal en internationaal toegepast.

Uitkomstparameter is de stabiele hetero- en homozygote integratie van de transgen inserts zoals weergegeven in **Tabel 1a/b**, bepaald aan de hand van genomische PCR.

Tabel 1a – Plasmides die mogelijk gemaakt zullen worden t.b.v. het genereren van transgene lijnen

	Promotor	Insert	backbone
1	Fabp10 (lever)	Fluorescent protein (FP; mNeongreen, mCherry or DsRed)	Minicircle (backup: Tol2)
2	Cldn15a (darm)	Fluorescent protein (FP; mNeongreen, mCherry or DsRed)	Minicircle (backup: Tol2)
3	Ela31 (pancreas)	Fluorescent protein (FP; mNeongreen, mCherry or DsRed)	Minicircle (backup: Tol2)
4	Elavl3 (brein)	Fluorescent protein (FP; mNeongreen, mCherry or DsRed)	Minicircle (backup: Tol2)
5	503unc (spierweefsel)	Fluorescent protein (FP; mNeongreen, mCherry or DsRed)	Minicircle (backup: Tol2)
6	Fabp11a (vetweefsel)	Fluorescent protein (FP; mNeongreen, mCherry or DsRed)	Minicircle (backup: Tol2)
7	Fabp10	V5-APEX-NES-IRES-mNeongreen	Minicircle (backup: Tol2)
8	Fabp10	IL2-FLAG-ultraID-KDEL-IRES- mNeongreen	Minicircle (backup: Tol2)
9	Fabp10	Myc-ultraID-CD63-IRES-mNeongreen	Minicircle (backup: Tol2)
10	Fabp10	NPC1(signal)-Myc-ultraID- NPC1(TM13+Ctail)-IRES-mNeongreen	Minicircle (backup: Tol2)
11	Fabp10	Myc-ultraID-PTP1B(Ctail)-IRES- mNeongreen	Minicircle (backup: Tol2)
12	Fabp10	V5-mSOG-NES-IRES-mNeongreen	Minicircle (backup: Tol2)
13	Fabp10	V5-SOPP-NES-IRES-mNeongreen	Minicircle (backup: Tol2)
14	Cldn15a	V5-SOPP-NES-IRES-mNeongreen	Minicircle (backup: Tol2)
15	Ela31	V5-SOPP-NES-IRES-mNeongreen	Minicircle (backup: Tol2)
16	Elavl3	V5-SOPP-NES-IRES-mNeongreen	Minicircle (backup: Tol2)
17	503unc	V5-SOPP-NES-IRES-mNeongreen	Minicircle (backup: Tol2)
18	Fabp11a	V5-SOPP-NES-IRES-mNeongreen	Minicircle (backup: Tol2)
19	Fabp10	Myc-ultraID-LAMP2-IRES-mNeongreen (backup for 10)	Minicircle (backup: Tol2)
20	Fabp10	Myc-ultraID-SEC61-IRES-mNeongreen (backup for 11)	Minicircle (backup: Tol2)
21	DTetON-Fabp10	TSPAN-pHluorin	Minicircle (backup: Tol2)
22	DTetON-Cldn15a	TSPAN-pHluorin	Minicircle (backup: Tol2)
23	Fabp10	TSPAN-(C-split Nter)HALO	Minicircle (backup: Tol2)
24	Cldn15a	TSPAN-(C-split Nter)HALO	Minicircle (backup: Tol2)
25	Fabp10	TSPAN-(C-split EC1)HALO	Minicircle (backup: Tol2)
26	Cldn15a	TSPAN-(C-split EC1)HALO	Minicircle (backup: Tol2)
27	DTetON-Fabp10	TSPAN-(full-EC1)HALO	Minicircle (backup: Tol2)

28	DTetON-Cldn15a	TSPAN-(full-EC1)HALO	Minicircle (backup: Tol2)
29	Fabp10	FKBP(/iLID)-TSPAN-mNeongreen-IRES-FRB(/SspB)-Rab2a	Minicircle (backup: Tol2)
30	Cldn15a	FKBP(/iLID)-TSPAN-mNeongreen-IRES-FRB(/SspB)-Rab2a	Minicircle (backup: Tol2)
31	Cldn15a	CreERT2-LSL-EV-GFP	Minicircle (backup: Tol2)
32	Cldn15a	CreERT2-LSL-sGFP	Minicircle (backup: Tol2)
33	Ubi	GFPR-MESA-mCherry	Minicircle (backup: Tol2)
34	Ubi	GFPR-synNotch-mCherry	Minicircle (backup: Tol2)
35	Prmt1	CreERT2-LSL-EV-GFP	Minicircle (backup: Tol2)
36	Prmt1	CreERT2-LSL-sGFP	Minicircle (backup: Tol2)
37	Cldn15a	CreERT2-LSL-shsyntenin-CFP	Minicircle (backup: Tol2)

Tabel 1b – Specificatie van de tetraspanins (TSPANs) die getest zullen worden

1	CD63
2	CD81
3	CD9
4	CD151
5	TSPAN3
6	TSPAN4
7	TSPAN7
8	TSPAN9

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

Voor het genereren van de transgene zebravislijnen zal een stukje DNA met het transgen worden geïnjecteerd in een eicel met een promotor die zorgt dat het transgen alleen in bepaalde weefsels (darm, lever) tot expressie komt. Op één transgen na (hierna benoemd) heeft geen van de transgenen een verwacht nadelig effect op de cel of (de ontwikkeling) van het embryo, en dus verwachten we hierdoor geen ongerief voor de dieren. Voor het pathologiemodel (inductie van darmkanker) zal een bestaand humaan oncogen als transgen worden geïnjecteerd. Deze komt pas tot expressie als de induceerbare promotor wordt aangezet door middel van het TetON systeem (onderdeel van bijlage 2); hierdoor zal het maken (en aanhouden) van deze lijn zelf geen nadelig effect hebben op de vislijn. Na het genereren van de lijnen zal geen behandeling plaatsvinden later dan dag 5 na fertilisatie behalve een skin-swab (of als alternatief: fin-clip). In principe zijn alle transgene lijnen (homo- en heterozygoot) te identificeren met behulp van fluorescentie. Om vervolgens onderscheid te maken tussen homo- en heterozygote dragers is genotypering nodig. Hiervoor zullen we in eerste instantie een skin-swab uitvoeren (<https://www.nc3rs.org.uk/skin-swabbing-dna-sampling-zebrafish>). Tot nu toe is de skin-swab effectief en betrouwbaar gebleken voor veel verschillende gene-targets. In het uitzonderlijke geval dat dit niet werkt (naar verwachting <10%) zal een traditionele fin-clip ter genotypering worden uitgevoerd. Alle handelingen hier beschreven worden in principe éénmalig uitgevoerd.

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

Om het aantal benodigde dieren zo veel mogelijk te beperken, willen we dus gebruik maken van de pIGLET methode (**P1**; PMID: 38838146) in plaats van de klassieke Tol2 methode (**P2**). Deze nieuwe methode houdt ook meteen verfijning in, en verhoogt de reproduceerbaarheid en replicerbaarheid van de experimenten die in de tweede bijlage beschreven worden. Voor dit eerste deel komt **P1** neer op een geschatte reductie van 40% van het aantal benodigde dieren ten opzichte van **P2**.

Op basis van tabel 1 uit het projectvoorstel, verwachten we minimaal 30 en maximaal 60 verschillende lijnen te genereren. Met het oog op de [herziene handreiking genetisch gewijzigde dieren](#) die sinds 1 januari 2023 van kracht is zullen we deze lijnen de eerste 2 stabiele generaties monitoren. Hiervoor zullen we 2 x 30 doorgroeien naar volwassenheid - rekening houdend met een variatie in sekse-verhouding tussen 1:4 en 1:1

tussen de aantallen M en V om er per generatie minimaal 7 mannen 7 vrouwen te monitoren. Vanaf 5dpf is de natuurlijke uitval van larven laag (naar schatting tussen de 5-10% uitval), en met een 1:4 ratio hebben we $4 \times 7 = 28$ larven nodig om 7 van het ene geslacht te hebben, waarbij de 21 overige dus het andere geslacht zullen hebben. Om te compenseren voor mogelijke uitval houden we 30 vissen per lijn aan over twee generaties. Dat komt neer op 60 vissen per lijn, en met 30 tot 60 lijnen komt dat uit op en totaal van 3600 minimaal, en 7200 vissen maximaal.

Het aantal te genereren lijnen valt hoog uit om de volgende redenen: 1) onderzoek naar EVs in zebrafissen is nieuw, hierdoor is er nauwelijks iets beschikbaar wat we direct kunnen gebruiken, en het genereren van nieuwe lijnen heeft inherent hoge aantallen nodig zonder dat er een experiment in traditionele zin mee gedaan wordt; 2) het betreft hier fundamenteel onderzoek met een exploratief karakter. Hierdoor weten we bijvoorbeeld nog niet I) welk EV-marker eiwit we het best kunnen gebruiken (zie tabel 1b) II) in welk orgaan, welke type label (e.g. GFP of HALO) het meest robuust werkt, en III) welke manier van in vivo biotinylatie het best werkt. Daarnaast hebben we een aantal lijnen nodig waar mogelijke doelorganen een bepaalde kleur hebben, om zo de organen beter te kunnen identificeren.

Voor het aanhouden van de genetisch gemodificeerde zebrafislijnen controleren we ook of variaties in allelen volgens de Mendeliaanse distributie plaatsvinden en houden we het liefst de homozygote dieren aan. Echter, we dienen daarnaast ook een aantal heterozygote zebrafissen aan te houden, mocht het aanhouden van homozygote dieren negatieve gevolgen voor het welzijn van de dieren hebben. Voor de zebrafis lijnen geldt verder dat er een gereede kans bestaat dat variatie tussen heterozygote en homozygote mutanten gevonden zal worden. Bij de eerste keer dat in F0 (P1) of F2 (P2) homozygote nakomelingen worden geproduceerd zullen we met een uitermate hoge alertheid de welzijnsinspectie van de zebrafissen uitvoeren en letten op onverwachte effecten (uiterlijk, intern, gedragsmatig).

Wetenschappelijke tijdschriften vereisen dat de reproduceerbaarheid van de resultaten door herhalingen van experimenten aangetoond dient te worden. In vele gevallen is derhalve een (vrijwel) identieke herhaling van experimenten noodzakelijk.

Met de power berekening is de hoeveelheid benodigde dieren voor morfologisch en qPCR werk berekend.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, levensstadia, geschatte aantallen per levensstadium, geslacht, genetische wijzigingen en, indien van belang voor het behalen van de doelstelling, de te gebruiken stam.

Volgnr.	Diersoort	Herkomst	Levensstadium	Aantal	Geslacht	Genetisch gewijzigd	Stam
1	<i>Danio rerio</i>	Dieren gefokt voor onderzoek	volwassen	Max 7200	Mannetjes en vrouwtjes	Wild type, KO/KD of transgen	AB

Onderbouw de bovengenoemde keuzes.

Diersoort	De diersoort die gebruikt wordt is de zebrafis (<i>Danio rerio</i>), gezien de opgebouwde expertise met het doen van onderzoek aan deze soort.
Herkomst	Dieren zijn gefokt voor onderzoek in de zebrafish aquarium faciliteit van het Hugo R. Kruytgebouw van de Universiteit Utrecht
Levensstadia	Larvaal t/m volwassenheid.
Aantal	We zullen minimaal 30 verschillende lijnen en maximaal 60 verschillende transgene lijnen genereren. Om 2 groepen van 7 mannelijke en 7 vrouwelijke vissen aan te houden (28), en rekening houdend met een sekse ratio die tussen de 1:1 en 1:4 ligt, zullen we 2 x 30 vissen doorgroeien naar 25dpf. Voor het monitoren van de eerste 2 stabiele generaties met 60 vissen per lijn, komen we dan op minimaal 3600 en maximaal 7200 vissen. Deze worden per generatie allemaal doorgegroeid tot 25dpf. Vanaf 25dpf kan het geslacht bepaald worden en het totale aantal met 1/4e worden teruggebracht (900 – 1800) in geval dat nodig blijkt. De berekening is in meer detail weergegeven in deel A, het onderste blok betreffende "overwegingen en statistische methoden (...) voor het aantal benodigde dieren".

Geslacht	Mannetjes en vrouwtjes, voor het aanhouden van de lijnen. Seksuele differentiatie vindt plaats tussen 20 – 25 dpf.
Genetisch gewijzigd	Naast wild type zebravissen, worden transgene en KO/KD zebravislijnen voorgesteld voor het onderzoek.
Stam	AB.

C. Huisvesting en verzorging

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

Já

Nee > 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.

Voor genotypering moeten de vissen apart worden gehouden tot de resultaten binnen zijn om zo individuen te kunnen onderscheiden. Deze huisvesting vindt plaats in een speciaal daarvoor ontworpen genotypingsrek van het Tecniplast aquariumsysteem (<https://www.tecniplast.it/uk/product/zebttec-genotyping-solutions.html>), met openingen tussen verschillende tanks waarin de zebravissen visueel en olfactorisch in nauw contact staan met broers en zussen. In navolging van punt 3.3.a van bijlage III van richtlijn 2010/63/EU zullen wij zebravissen t.b.v. genotypering niet langer dan 3 dagen alleen huisvesten. In de meeste gevallen zal het maximaal 2 dagen zijn, omdat voor de pIGLET methode de plek van insertie in het genoom vooraf al bekend is en alleen homo- vs heterozygote typering plaats hoeft te vinden, wat in het lab zelf kan plaatsvinden.

Larven, juvenielen en volwassen zebravissen krijgen drie keer per dag droogvoer, aangepast aan hun leeftijd. Het dierenverzorgingsteam controleert regelmatig de waterkwaliteit, waarbij parameters zoals nitraat/nitriet, ammoniak, zoutgehalte, opgeloste zuurstof (DO), geleidbaarheid, pH en watertemperatuur worden gemeten.

D. Pijn en welzijnsaantasting

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

Nee

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Click or tap here to enter text.

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

In dit project verwachten we voor het overgrote deel van de verschillende subdoelen (a, b, c) slechts minimale verstoring van de zebravissen. Natuurlijk verlies tijdens het opgroeien van larven tot volwassenheid is onvermijdelijk en inherent aan het kweken van vissen. Onze ervaring leert dat ongeveer 25% van de larven verloren gaat bij normale kweekpraktijken, ongeacht of het gaat om wildtype, transgene of gemuteerde vissen. We voorzien geen verliezen die deze natuurlijke incidentie overstijgen als gevolg van onze experimenten. Voordat volwassen vissen of larven verdoofd worden voor genotypering door middel van skin-swab of (in uitzonderlijke gevallen, <5%) fin-clip, wordt een evaluatie uitgevoerd om hun geschiktheid te beoordelen. Dit gebeurt door te letten op tekenen van ziekte of afwijkend zwemgedrag. Dieren die niet gezond lijken, worden niet onderworpen aan de procedure.

Voor de skin-swab (o.a. <https://www.nc3rs.org.uk/skin-swabbing-dna-sampling-zebrafish>) worden vissen voor ~30 seconden uit het water gehaald, met de hand (via het net) vastgehouden en wordt met een wattenstaafje eenmaal over de huid gestreken om materiaal te verzamelen. Deze methode is nieuw en wordt nog geoptimaliseerd. Hierna wordt de vis weer direct teruggeplaatst in zwemwater. Naar verwachting werkt dit voor >95% van de genen omdat de locatie in het genoom bij het gebruik van de pIGLET methode (**P1**) al bekend is. In het uitzonderlijke geval dat dit niet werkt (<5%) zal een fin-clip worden toegepast. Hiertoe worden de vissen verdoofd door onderdompeling in verdunde MS-222-oplossing (40mg/L). Een klein deel van de staartvin wordt weggenomen voor genotypering. Hoewel de vinnen compleet herstellen binnen enkele weken, zijn er effecten op korte termijn op zwemgedrag beschreven die tot 5 dagen na (gedeeltelijk) amputatie van de staartvin als mogelijk 'matig' ongerief worden ingeschat (PMID: 36101350).

We minimaliseren handling en invasieve procedures waar mogelijk, en bij het gebruik van verdoving zorgen we ervoor dat de temperatuur en waterparameters van de verdovingsoplossing zo dicht mogelijk bij die van de thuishouding liggen om stress te verminderen. De anesthesie wordt nauwkeurig gehandhaafd door de terugtrekkingsreflex te testen en de beweging van het operculum te observeren voordat stimuli worden toegepast. Lichte verdoving voor de eerste dagen na fin-clip zal n.a.v. (PMID: 36101350) worden getest met MS-222 in plaats van lidocaïne door effecten van de lichte verdoving zelf op zwemgedrag ook te monitoren.

Op basis van alle data die we tot nu hebben zullen **P1** en **P2** niet/nauwelijks tot ongerief zorgen in de vissen maar i.v.m. de monitoringsplicht zullen ze in eerste instantie wel als licht ongerief gekarakteriseerd worden. Hoewel er dus naar inschatting niet/nauwelijks sprake zal zijn van ongerief, zullen deze vissen een schat aan relevantie inzichten opleveren met betrekking tot EV-communicatie tussen verschillende organen in vertebraten.

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Het verlies of de verstoring van genfunctie door Tol2 (**P2**) kan, hoewel niet verwacht, tot gevolgen leiden die bijvoorbeeld de regulatie van de celdeling verstoren en daarmee tot tumor-vorming leiden. Indien er gebruik gemaakt moet worden van de Tol2-strategie, zal vanaf het moment van opgroeien van vissen, met name bij de F2 nakomelingen (waaronder zich potentieel homozygote zebravissen bevinden), en na eventueel uitkruisen en vervolgens weer inkruisen bij de F4 nakomelingen (waaronder zich opnieuw potentieel homozygote zebravissen bevinden), zullen we daar extra alert op zijn. Indien een vis onverwacht in slechte conditie verkeert (humaan eindpunt), wordt euthanasie toegepast door middel van MS-222 (40 mg MS-222 per liter water).

Omgevingsfactoren zoals watertemperatuur, waterkwaliteit, daglengte en lichtniveaus zijn geoptimaliseerd. Dagelijkse visuele inspectie door goed getraind personeel, meestal tijdens het voeren, helpt welzijnsproblemen te identificeren. Als een vis tekenen van ongerief vertoont (weinig activiteit, hangend of op de bodem liggen, abnormaal zwemgedrag, opgezette schubben, ademhalingsproblemen), wordt deze uit de tank verwijderd en geëuthanaseerd. Verlies van eetlust kan ook een indicatie zijn van welzijnsproblemen.

Na kennisname van de CCD handreiking

"<https://www.centralecommissiedierproeven.nl/documenten/formulieren/16/10/13/handreiking-kaders-genetisch-gewijzigde-dieren>", werd ingeschat dat de kans zeer klein is dat genetisch gemodificeerde zebravissen, die ongerief ondervinden, gegenereerd en aangehouden worden. Dit omdat de transgenen niet schadelijk zijn, of pas in het kader van de proef zelf geactiveerd zal worden (P7, Bijlage 2). De enige kans op ongerief is als we onverhoopt op P2 moeten terugvallen, wat onwaarschijnlijk is. Lijnen die toch significant intrinsiek ongerief vertonen zullen in alle gevallen worden geëuthanaseerd.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Random insertie van gen fragmenten via Tol2 kan tot functionele knock-outs of andere gen-alteraties leiden. De kans dat een mutant met aanzienlijke bijwerkingen aangehouden wordt is echter vrij klein.

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

Allereerst zal geprobeerd worden de F2 weer uit te kruisen naar F3, of om de F1 nogmaals uit te kruisen (om mogelijk specifieke effecten kwijt te raken), en de nakomelingen dan daarna weer in te kruisen; de gevormde homozygote F4 zullen we weer aandachtig surveilleren en als daar niets opvalt zullen we deze lijn niet als "lijn met inherent ongerief" beschouwen.

E. 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 F.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

In onze aquariumfaciliteit beschikken we over een goed opgeleid team van dierenverzorgers. Dagelijkse routines zijn gepland om tijdens voedingssessies de gezondheid van onze vissen gedetailleerd te monitoren. Elke dag wordt routineus elke zebravis in de faciliteit beoordeeld op humane eindpunten, waarbij we letten op onnatuurlijk zwemgedrag, gebrek aan respons op voeding, kleurverandering, lethargie, de vorming van tumoren en scoliose, evenals tekenen van infectie zoals witte vlekken of bloedingen. Indien een vis deze indicatoren vertoont, wordt deze uit de tank verwijderd en geëuthanaseerd. Over het algemeen is onze ervaring dat genetisch gemodificeerde zebravissen jonger dan een jaar zelden aan deze criteria voldoen. Bij

Tol2-transgenese wordt speciale aandacht besteed aan dierenwelzijn, vooral bij de F2- en F4-nakomelingen, waar potentieel homozygote zebravissen kunnen voorkomen die potentieel iets vaker aan genoemde criteria kunnen voldoen.

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

Uit onze ervaring blijkt dat ongeveer 25% van de larven verloren gaat tijdens het normale kweekproces van vissen. We verwachten dat dit percentage ook van toepassing zal zijn op de gepresenteerde transgene en gemuteerde lijnen. Echter, bij de F0-generatie wordt een extra verlies van 50% verwacht vanwege mogelijke directe schade door de injectie. Dit verlies treedt echter voornamelijk op voordat de dieren zelfstandig kunnen eten.

F. Classificatie van ongerief

Benoem de experiment gebonden factoren die bijdragen aan het ongerief en geef voor elk van deze factoren aan hoe het ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig'. Geef per diersoort en behandelgroep het cumulatieve ongerief aan in percentages van het totale aantal dieren.

We voorzien geen significant nadelige effecten voor het genereren en aanhouden van de stabiele lijnen omdat de vissen worden gefokt onder gestandaardiseerde omstandigheden. Op basis van onze prognoses zullen de geplande genetisch gemodificeerde zebravissen naar verwachting geen of slechts milde fenotypen vertonen, waardoor we geen negatieve gezondheidseffecten bij de zebravissen verwachten. Voor het genotyperen van de vissen zal voornamelijk (>95%; i.e. 3420 – max 6840 vissen) gebruik worden gemaakt van skin-swabs. Deze methode wordt nog geoptimaliseerd, en de noodzaak van tijdelijke verdoving staat nog niet vast. Het ongerief is in geval van verdoving licht. In uitzonderlijke gevallen zal in plaats van het nemen van skin-swabs (>95%) fin-clips (<5%; i.e. 180 – max 360 vissen) worden toegepast, waar de zebravissen zullen herstellen van de verdoving maar de fin-clip zelf tijdelijk matig ongerief kan veroorzaken. Echter zullen de zebravissen hiervan volledig herstellen vanwege hun regeneratief vermogen.

Om het dierenwelzijn te waarborgen worden de zebravissen dagelijks gemonitord, waarbij alleen getrainde personeelsleden toegang hebben tot de vissen. In onze aquariumfaciliteit hebben we een ervaren team van dierenverzorgers. Het mogelijke ongemak als gevolg van de verdoving en het herstel kan niet worden vermeden vanwege de noodzaak van de fin-clip procedure. Bovendien kan de verdoving het ongemak tijdens het knippen van de vin zelf verminderen.

Het cumulatieve ongerief wat verwacht wordt, is licht ongerief voor max 6840 vissen (95%). Dit is i.v.m. de nieuwe monitoringsplicht waar nieuwe lijnen automatisch als licht ongerief dienen te karakteriseren totdat het tegendeel is gebleken. Voor max 360 vissen (5%) wordt het ongerief als matig ingeschat.

G. 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	Voor dit onderdeel G zijn de volgende resources geraadpleegd: 3Rs INFO HUB (https://www.3rsinfohub.de/index.html), de NAT Database (nat-database.org) en Biomedical research (europa.eu). Tot op heden is er geen alternatief/in vitro model waarmee we EV-communicatie tussen organen kunnen bestuderen, gezien de gelijktijdige activiteit tussen zendende en ontvangende weefsels/organen en de noodzakelijke contacten tussen verschillende celtypen, wiens eigenschappen gedurende dat cellulaire ontwikkelingsproces bovendien veranderen. Er zijn ons geen <i>in vitro</i> modellen bekend ter vervanging van vissen waarbij deze complexe interacties kunnen worden bestudeerd, behalve muizen en drosophila (fruitvlieg). Voor muizen geldt dat 1) EVs niet goed gevisualiseerd kunnen worden, en 2) dat het gebruik van zebravissen op zichzelf al een vervanging is (namelijk voor muizen). Voor drosophila geldt dat dit geen vertebraten zijn, en ze niet het kenmerkende lichaamsbouwplan van gewervelden hebben (o.a. gesloten bloedsomloop), daarmee verder van de mens afstaan dan vissen en muizen, maar ook minder geschikt voor hoge-resolutie imaging in latere ontwikkelingsstadia. Multi-organ-on-a-chip modellen missen belangrijke eigenschappen die naar huidig inzicht juist cruciaal zijn voor de biologie van EVs, zoals metabole processen direct gelieerd aan voedsel-processing, de verwevenheid/onderlinge afhankelijkheid van orgaansystemen, en
------------	---

	de rol van weefsel-specifieke macrofagen en het immuunsysteem. Wat we wel doen is het opzetten en initiële testen van de verschillende transgenen in zebra vis cellijnen, wat in de eerste fase een vervanging is en de efficiëntie van het proces bevordert.
Vermindering	Voor het maken van transgene lijnen willen we gebruik maken van een nieuwe techniek (P1) die het aantal benodigde vissen om een nieuwe lijn te maken significant verlaagd (naar schatting verlaagd met 40%) ten opzichte van gangbare technieken (P2). Het gebruik van weefselkweek technieken met cellijnen voor het opzetten van de verschillende tools zal ook het aantal gebruikte larven te verminderen.
Verfijning	Alle procedures en strategieën die we beogen, hebben we gekozen om potentieel ongerief zo klein en kort mogelijk te houden. De belangrijkste nieuwe ontwikkeling is de skin-swab t.o.v. fin-clip die de nadelige gevolgen van de fin-clip achterwege laat. Daarnaast maken we gebruik van induceerbare pathologie modellen, wat ervoor zorgt dat voor het genereren en aanhouden van de lijn (zoals in deze bijlage beschreven) geen ongerief verwacht wordt doordat het oncogen normaalgesproken 'uit' staat. Naast dat P1 voor vermindering zorgt t.o.v. P2, is het ook een meer verfijnde techniek, die cumulatieve schade aan het vissengenoom over tijd (dat is in jaren, en daarom niet zomaar van de ene lijn op de andere te meten) voorkomt. De huisvesting van zebra vissen t.b.v. genotypering vindt plaats in een speciaal daarvoor ontworpen genotypingsrek (https://www.tecniplast.it/uk/product/zebttec-genotyping-solutions.html) van het Tecniplast aquariumsysteem, met openingen tussen verschillende tanks waarin de zebra vissen visueel en olfactorisch in nauw contact staan met broers en zussen die ze olfactorisch kunnen herkennen (PMID: 18544507).

Zijn er nadelige milieueffecten te verwachten?

Nee

Ja > Benoem de te verwachten milieueffecten en geef aan welke maatregelen zijn genomen om deze tot een minimum te beperken.

[Click or tap here to enter text.](#)

H. Hergebruik

Worden er dieren ingezet die eerder in een andere dierproef zijn gebruikt?

Nee > ga verder met vraag I.

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

[Click or tap here to enter text.](#)

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

Nee

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

[Click or tap here to enter text.](#)

I. Herhaling

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

n.v.t.

J. Plaats waar de dierproef wordt uitgevoerd

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

Nee > Ga verder met vraag K.

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

[Click or tap here to enter text.](#)

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

Click or tap here to enter text.

3 Einde Experiment

K. Bestemming van de dieren bij einde experiment

Worden de dieren gedood?

Nee > Beschrijf de bestemming van de dieren.

De dieren worden in leven gehouden om de lijnen in stand te houden t.b.v. de experimenten beschreven in bijlage 2. Er is dus geen einde experiment. De lijnen zullen naar standaard procedures tot maximaal 1,5 jaar in leven worden gehouden, en zullen daarna worden geëuthanaseerd.

Ja > Geef aan waarom de dieren worden gedood.

De genetische lijnen mogen niet worden uitgeplaatst dus worden ze in voorraad gedood.

Indien dieren worden gedood, wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van Richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Vanaf 16dpf onderdompeling in ijswater voor ten minste 5 minuten. Deze methode is snel genoeg om isolatie van de organen en downstream analyse te waarborgen, en daarmee de optimale methode. De tweede methode is niet direct opgenomen in annex IV van de [directive 2010/62/EU](#), maar is hij door een wetenschappelijke commissie, samengesteld door de Europese commissie [voorgesteld als toevoeging voor annex IV](#) (zie antwoord vraag drie op pagina 21). Om die reden zien wij het als een methode die niet alleen onder specifieke omstandigheden mag worden toegepast, maar geldt als de correcte reguliere methode bepaald door de onder experts heersende mening.

Bron: Scientific Committee on Health, Environmental and Emerging Risks SCHEER Revision of Annexes III and IV of Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes regarding accommodation parameters and methods of killing for zebrafish, and accommodation parameters for Passerine birds ([link accessed 22-10-2024](#))

Ja > Betreft het een dodingsmethode die alleen onder specifieke voorwaarden mag worden toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode

Overdosis anesthesie (in de regel: MS-222 200-300mg/L voor meer dan 10 minuten) voor dieren t/m 15dpf. Deze methode is snel genoeg om isolatie van de organen en downstream analyse te waarborgen, en daarmee de optimale methode.

Ja > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Click or tap here to enter text.

Indien dieren worden gedood, maar niet in het kader van de proef, geef aan of herplaatsing is overwogen en waarom hiervan is afgezien.

Herplaatsing is niet mogelijk omdat het genetisch gemodificeerde dieren betreft.



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 in de 'Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning' 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.	10800	
1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Utrecht	
1.3 Vul het volgnummer en de titel van de dierproef in. <i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.3 van het format Projectvoorstel.</i>	Volgnummer	Titel dierproef
	2	Behandeling en euthanasie t.b.v. weefsel donatie voor analyse extracellulaire blaasjes (EV) overdracht tussen organen van genetisch gemodificeerde zebravissen.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

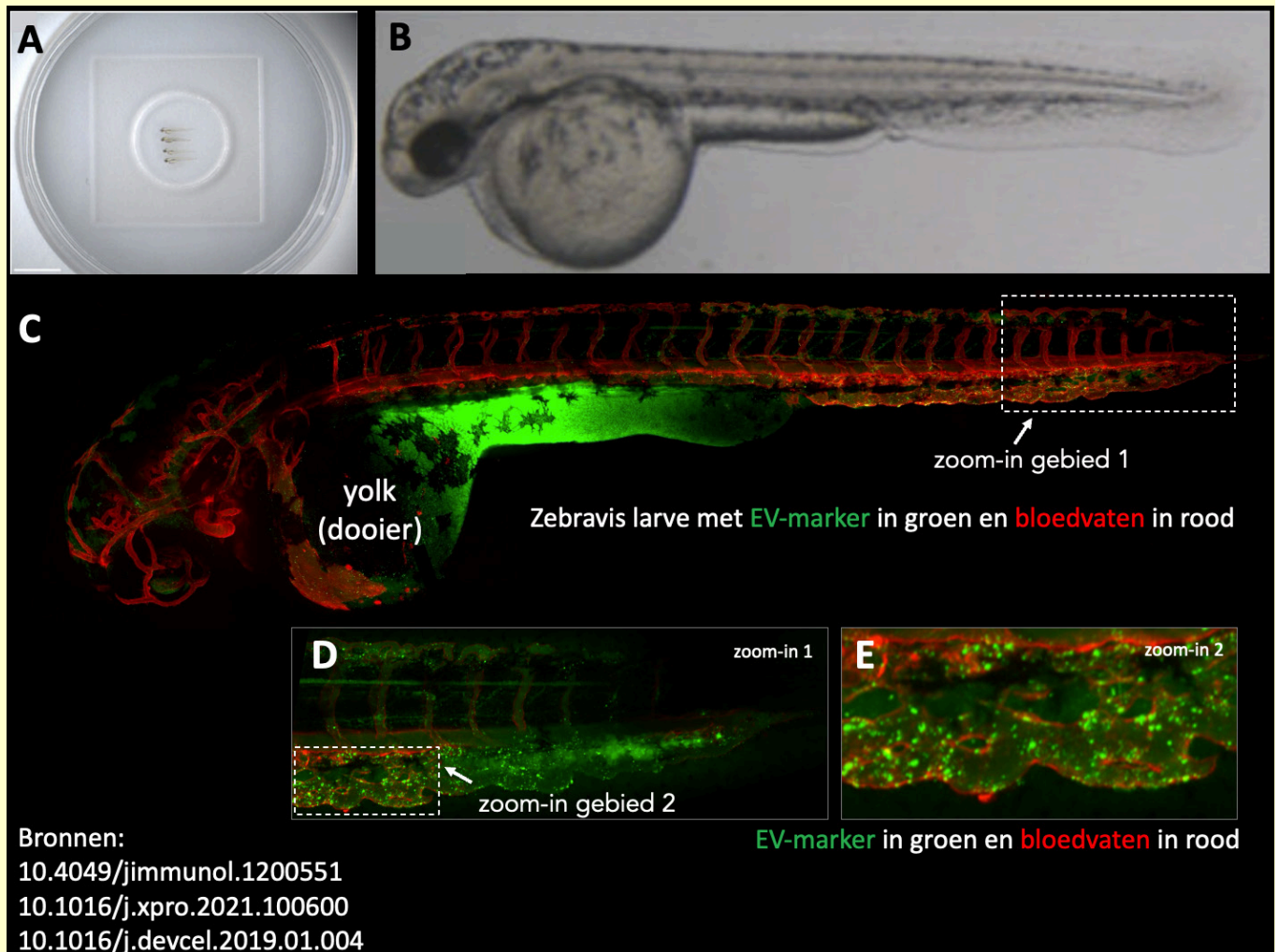
Het hoofddoel van deze dierproef (zie ook Projectvoorstel doel c onder 3.2) is het analyseren en onderling vergelijken van de EV-overgedragen eiwitten naar de verschillende doelorganen onder fysiologische en pathologische condities. De meeste dierexperimenten onder subdoel c/**P5** worden afgesloten door het doden van zebravissen t.b.v. het verzamelen van weefselmonsters voor verder onderzoek door middel van massa spectrometrie. In de meerderheid van de gevallen) worden de dieren vóór het doden niet aan een behandeling *in vivo* onderworpen, afgezien van het toevoegen van biotine (Vitamine B8) voor de werking van EV-ultraID. Een deel van het aantal gebruikte zebravissen (gezond en pathologie-geïnduceerd maximaal ca. 1800) worden vóór het doden wel aan een behandeling onderworpen: ze worden dan gebruikt voor de inductie van transgenactiviteit met doxycycline en tebufenozide (procedure **P7**), voor inductie van Non-alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) d.m.v. dieet (procedure **P6**), en/of voor het visualiseren van (fluorescente) EV-overdracht met behulp van lichtmicroscopie wat onder verdoving plaatsvindt (procedure P4). In totaal maximaal ca. 3000 zebravissen (waarvan maximaal ca. 1200 gezonde zebravissen en maximaal ca. 1800 pathologie-geïnduceerde zebravissen over de looptijd van het project (5 jaar, i.e. gemiddeld 600/jaar)). De 3000 eerdergenoemde dieren zullen worden gebruikt tot en met 21 dagen post fertilisatie (dpf). De meeste van deze dierexperimenten worden afgesloten door het doden van zebravissen t.b.v. het verzamelen van weefselmonsters voor verder onderzoek. Omdat het fundamenteel onderzoek betreft dat in de pioniersfase van het onderzoeksveld zit, worden er hier verschillende strategieën voorgesteld. Het is daarom mogelijk dat niet dat elk (ziekte)model helemaal uitgewerkt zal worden, maar dat met name de succesvolle/robuuste modellen verder uitgediept worden.

Hier volgt een beknopt overzicht van de verschillende procedures in de experimentele aanpak. Deze procedures worden verderop in meer detail beschreven.

Visualisatie van EV-overdracht d.m.v. lichtmicroscopie (P4)

Om de aanwezigheid van de EV-reporter in de doelorganen te visualiseren, zullen de larven (tot max 29dpf) onder de microscoop bekeken worden. Dankzij hun transparantie kunnen de fluorescente EVs waargenomen worden, zoals de aanvrager voorheen gedaan heeft in zebrafish embryo's van 3dpf (). Alle imaging en EV-inductie protocollen zullen eerst worden geoptimaliseerd in embryo's van <5dpf, alvorens er selectieve experimenten worden uitgevoerd met zebrafish larven tot max 29dpf. Dit in het kader van verfijning.

- Procedure **P4**: Hiertoe zullen de embryo's/larvae zoals gebruikelijk geanestheiseerd worden, vervolgens in Low Melting Point Agarose geïncorporeerd worden en bekeken met een speciale spinning-disk microscoop (zie **Figuur 2.1**). Afhankelijk van het resultaat kunnen de dieren weer teruggeplaatst worden om ze later nogmaals te bekijken, en zo het aantal gebruikte proefdieren te verminderen. De anesthesie heeft als dubbel voordeel dat het tegelijkertijd zorgt voor vermindering van het ongerief door de verdoving, als wel zorgt voor optimale visualisatie (vanwege de afwezigheid beweging). Omdat de handling niet invasief is en de larvae weer uit de agarose gehaald kunnen worden, zullen we in de pilot-experimenten om het juiste tijdstip te bepalen waar nodig zo veel mogelijk larven voor meerdere tijdstippen gebruiken om het totaal aantal proefdieren zo laag mogelijk te houden. Herhaaldelijke anesthesie en tussentijds bijkomen draagt echter ook bij aan ongerief. Daarom zullen niet alle larven alle (~5-7) tijdstippen gebruikt worden maar maximaal 2 – 3 tijdstippen.



Figuur 2.1 Impressie van imaging zebrafish larvae. A) Imaging schaalte met 4 zebrafish larvae geïncorporeerd in Low Melting Point (LMP) Agarose. B) Een uitvergroete weergave van een larve geïncorporeerd in LMP-agarose. C) Fluorescentie microscopie plaatje van een zebrafish larve met de bloedvaten in het rode kanaal, en de EV-marker (CD63-pHluorin) in/rond de dooier tot expressie gebracht. Deze cellaag scheidt heel veel EVs af die in de bloedbaan terecht komen. Zoom-in gebied is vergroot weergegeven in de volgende panelen. D) Paneel met vergroete weergave van zoom-in gebied 1 uit C. Gearceerde box links onderin is vergroot weergegeven in E. E) Paneel met vergroete weergave van zoom-in gebied 2 uit paneel D. Hier zijn duidelijk de groene spots te zien, wat EVs zijn die door de yolk zijn uitgescheiden en via de bloedbaan hier terecht zijn gekomen.

Uitkomstparameter is een fluorescente "landkaart" van de verschillende doelorganen van zowel darm als lever EVs die een relatieve kwantificatie mogelijk maakt van de hoeveelheid EVs die over een bepaalde tijdspanne in een bepaald doelorgaan terecht komen. Deze informatie is ook van groot belang voor het bepalen van de optimale strategie voor EV-UltraID tijd van incubatie met biotine. Tevens zal deze strategie worden gebruikt om te bepalen welke EV-secretie remmers het best werken (zie ook projectvoorstel 3.2.1 a, d). Als blijkt dat het darmepitheel zelf geen/weinig EVs produceert, zullen als alternatief voor EV-marker expressie in het darmepitheel fluorescent gelabelde commensaal bacteriën gebruikt worden (PMID: 22983029; 29896165) die net als de cellen van de zebrafish zelf fluorescente EVs kunnen uitscheiden die mogelijk de darmwand kunnen passeren (PMID: 33255332) en zo door het lichaam van de zebrafish kunnen verspreiden. Behalve enkele studies waar bacteriële EVs via orale spoeling aan muizen gevoerd worden zoals hierboven naar gerefereerd, is er nauwelijks iets bekend over de schaal waarop dit plaatsvindt.

Procedures voor het isoleren van EV-doelorganen:

Transgene zebrafishes zijn een essentieel onderdeel van de 'workflow' om de EV-gemedieerde eiwit-overdracht naar verschillende doelorganen te kunnen identificeren. Alle procedures maken gebruik van transgene zebrafishes, al bestaand (fluorescent gelabelde potentiële doelorganen) of gegenereerd specifiek binnen deze studie (**Tabel 1**, Bijlage 1). Voordat plasmides 23 – 30 gegenereerd worden, zullen eerst de TSPANs genoemd in Tabel 1b (bijlage 1) getest worden in de constructen van plasmides 21 en 22, om op basis hiervan de 2 meest robuust EV-labelende TSPANs te selecteren voor beide weefsels. Deze twee TSPANs zullen dan voor plasmides 23 -30 gebruikt worden.

Zebrafishes waarin de pathologie (P6, P7, of P8) en/of EV-UltraID (P5) geïnduceerd is zullen vervolgens geëthanaseerd worden t.b.v. weefselsisolatie. Deze weefsels zullen daarna gebruikt worden t.b.v. de eiwit analyse door middel van massa spectrometrie. Hiermee wordt het vergelijk mogelijk in EV-gemedieerd eiwitoverdracht van de darm en lever naar de specifieke doelorganen (bepaald in P4) om zo uiteindelijk 1) orgaan specifieke EV-communicatie aan te tonen, en 2) de invloed van metabole/pathologische verstoring hierop.

- Procedure **P5**: EV-eiwit labeling in de darm of lever d.m.v. EV-ultraID zal geïnduceerd worden zodra een voldoende hoge concentratie biotine (Vitamine B8) wordt toegevoegd aan het embryo medium.
- Procedure **P6**: Voor NAFLD-inductie zal gebruik gemaakt worden van een bestaand protocol door middel van een hoog cholesterol dieet. Dit zal worden opgezet en geoptimaliseerd in samenwerking met een collega van Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Utrecht, die ruime ervaring heeft met dit modelsysteem.
- Procedure **P7**: Voor inductie van darmkanker door induceerbare *kras*^{G12D} transgeen expressie in de darm (PMID: 29592890) zal van het bekende UAS:Gal4 systeem of dual-TetON (PMID: 21041642) systeem gebruik gemaakt worden.
- Procedure **P8**: Voor xenotransplantatie van humane darmkanker cellen in de perivitelline ruimte (de ruimte tussen de yolk (dooier) en het buitenmembraan van de yolk), zal een bestaand protocol gebruikt worden (PMID: 19400945), recentelijk geoptimaliseerd door de onderzoeksgroep in Portugal (PMID: 28835536) waar onze medewerkers training zullen ontvangen voor de meest optimale xenografting strategie. Hier zullen we als functionele read-out parameter voornamelijk het effect van kanker-specifieke EVs op de aanleg van bloedvaten naar de tumor ("tumor angiogenesis") kwantificeren.

Uitkomstparameters zijn een lijst van EV-overgedragen eiwitten naar de verschillende doelorganen, en hoe pathologie deze beïnvloedt.

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.

De beoogde procedures zullen deels afzonderlijk, deels in combinaties uitgevoerd worden, zoals weergegeven in de onderstaande tabel (**Tabel 2.1**). Deze tabel geeft eveneens de aantallen, de duur en de frequentie van de procedures weer.

Tabel 2.1 Overzicht experimentele handelingen met aantallen vissen, duur en frequentie

Procedure	korte omschrijving		(Gecombineerde) procedure(s)		
P4	fluorescent tracken		P4		
		aantallen	300		
		duur procedure ($d > 5dpf$)	0,1		
		frequentie per dier	1-3		
P5	bepalen eiwit overdracht		P5		
		aantallen	900		
		duur procedure ($d > 5dpf$)	0,25-2		
		frequentie per dier	1		Sub totaal
					1200
P6	NAFLD inductie		P6+P4	P6+P5	
Pathologie		aantallen	150	450	
		duur procedure ($d > 5dpf$)	8-12	9-13	
		frequentie per dier	1-2	1	
P7	darmkanker inductie		P7+P4	P7+P5	
Pathologie		aantallen	150	450	
		duur procedure ($d > 5dpf$)	5	6	
		frequentie per dier	1-2	1	
P8	Xenotransplantatie darmkanker		P8+P4	P8+P5	
Pathologie		aantallen	150	450	
		duur procedure ($d > 5dpf$)	1-2	2-3	
		frequentie per dier	1-2	1	Sub totaal
					1800
					TOTAAL dieren
					3000

Tabel 2.1 Overzicht van de (combinaties van) procedures, de aantallen dieren die deze ondergaan, de duur van de procedures en de frequentie van de procedures. De duur van de procedures is weergegeven in dagen die na 5dpf vallen en geeft de duur van de gehele procedure weer waarin het dier de (gevolgen) van de handeling ondergaat. Het grijs gearceerde deel gaat specifiek over de gegevens van dieren waar pathologie geïnduceerd is. Duur is weergegeven in dagen (d).

Procedure P4: Transgene zebrafish embryo's en larven die fluorescente EV-reporters en -remmers conditioneel (i.e. inductie d.m.v. een 'dually inducible TetON' systeem) (PMID: 21041642) in de darm of lever tot expressie brengen. TetA-EcR responsive elements die upstream van de diverse EV-reporters gepositioneerd zijn zullen geactiveerd worden door een combinatie van 25 µg/mL doxycycline plus 25 µM tebufenozide aan het E3 medium (gestandaardiseerde water/zout oplossing geoptimaliseerd voor de ontwikkeling van de embryo's) toe te voegen gedurende 8 - 24h, waarna het medium verversd zal worden. Deze induceerbaarheid zorgt voor beter gecontroleerde expressie en vergrote reproduceerbaarheid, en geldt daarmee als verfijning van de aanpak.

Als alternatief voor het tot expressie brengen van EV-reporters in de darm zelf, zal ook worden gekeken naar de EVs die de commensaal bacteriën, de natuurlijke darmflora van de zebrafish, uitscheiden, die de darmwand lijken te kunnen passeren (PMID: 33255332). Dit kan eenvoudig door commensaal bacteriën die EV-markers tot expressie brengen, in het E3 medium van de ontwikkelende larven toe te voegen. Tijdens de natuurlijke ontwikkeling gaat op dag 3 (3dpf) de mond van de embryo's open en wordt het darmkanaal gekoloniseerd door

bacteriën die zich in de omgeving bevinden en tegelijkertijd met het voedsel ingenomen worden. Deze methode heeft als voordeel dat er geen specifieke transgene vislijn voor gemaakt hoeft te worden en compleet endogeen naar EV-communicatie kijkt vanuit de darm naar de rest van het lichaam. Hiervoor zijn alleen wildtype vislijnen nodig.

Hierna zullen de embryo's/larven op verschillende tijdstippen worden bekeken onder de fluorescentiemicroscopie, grotendeels vóór 6dpf. Een aantal larven zal bekeken worden tussen 6 – 29dpf. Hiervoor zullen de embryo's zoals gebruikelijk geanestheesd worden door middel van MS-222 (40mg/L), vervolgens in Low Melting Point Agarose geïncorporeerd worden, om zo de vissen vibratie vrij met hoge resolutie microscopie te bekijken met behulp van een speciale spinning-disk microscopie. De vissen dienen levend onder een microscoop bekeken te worden, omdat op deze manier het fluorescentie-sigitaal helder genoeg blijft om waargenomen te worden.

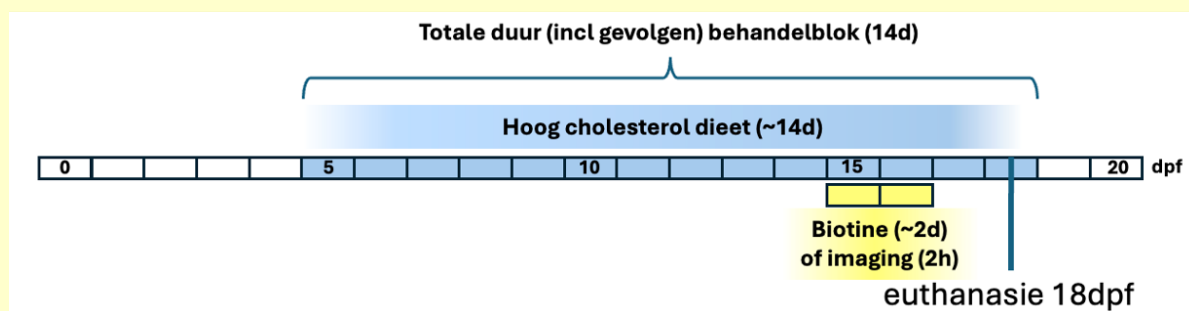
Op deze manier kan achterhaald worden vanaf welk ontwikkelingsstadium de darm of lever significante hoeveelheden EVs in de bloedsomloop uitscheidt, en na hoeveel tijd die in voldoende mate in doelorganen terechtkomen voor de downstream analyse in P5.

Voor de meeste vissen (~250) zal de imaging (en dus de anesthesie) in P4 slechts 1x plaatsvinden. Voor een beperkt aantal vissen (~50) zal de imaging maximaal 3 maal plaatsvinden, om op die manier het totale aantal gebruikte dieren lager te houden.

Deze analyse zal ook worden uitgevoerd onder de geïnduceerde metabole verstoringen/pathologieën zoals beschreven in P6, P7 en P8. Op deze manier is een direct vergelijk mogelijk tussen de condities, en kan het effect van deze perturbaties op EV-overdracht kwantitatief (worden er meer of minder EVs overgedragen?) en kwalitatief (worden er meer/andere organen getarget door darm/lever EVs en wat voor effect heeft EV-remming op die organen?) bepaald worden.

Procedure P5: EV-eiwit specifieke labeling in de darm of lever d.m.v. EV-ultraID zal geïnduceerd worden zodra een voldoende hoge concentratie biotine (Vitamine B8) wordt toegevoegd aan het embryo medium (500 μ M). De duur van deze incubatie zal experimenteel bepaald moeten worden, maar ligt naar verwachting tussen de 6 en 48 uur. Dit wordt in eerste instantie gedaan met dieren <5dpf (i.e. jonger dan 120 uur). *In vivo* biotinylatie d.m.v. ultraID is de meest efficiënte manier van orgaan-specifieke eiwit-labeling. Om eventuele effecten van Vitamine B8 op metabolisme tot een minimum te beperken zal gestreefd worden naar een zo kort mogelijke biotine incubatieperiode. Na de experimenteel bepaalde incubatieperiode zullen de vissen worden geëuthanaseerd t.b.v. weefseldonatie voor massa-spectrometrie op de verschillende doelorganen. Massa-spectrometrie is de meest gevoelige en minst bevooroordeelde manier van kijken naar eiwitoverdracht.

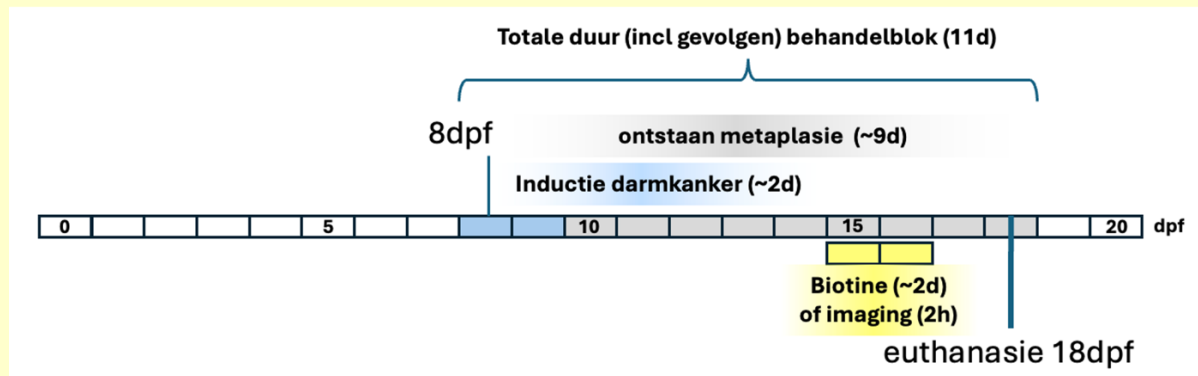
Procedure P6: Voor NAFLD-inductie zal gebruik gemaakt worden van een bestaand protocol voor NAFLD-inductie in zebrafish larven door middel van een hoog cholesterol dieet (5% cholesterol w/w) (PMIDs: 30572006; 31867007; 31182918) voor 8 – 12 dagen. Dit wordt gedaan door cholesterol te mengen met het normale zebrafish voedsel, dat vervolgens volgens het normale voedingstijden schema zal worden toegevoegd aan de tanks van de behandelde vissen. Vanaf ~10 dagen dieet (~15dpf) zal biotine toegevoegd worden voor de experimenteel bepaalde duur (zie procedure P5). Zoals beschreven zullen de vissen daarna worden geëuthanaseerd t.b.v. weefseldonatie voor massa-spectrometrie op de verschillende doelorganen.



Figuur 2.2 Tijdslijn voor procedure P6 – Weergegeven zijn de verschillende handelingen en de duur ervan. Hoog cholesterol dieet is weergegeven in blauw. Biotine toevoeging voor bepaling eiwitoverdracht (P5) en het alternatief, imaging voor het fluorescent volgen van de EVs (P4) zijn weergegeven in geel. Tevens is de totale duur van het behandelblok aangegeven. De duur van het behandelblok blijft gelijk, maar kan afhankelijk van de resultaten uit P4 verder verschoven worden zodat er uiterlijk op 15dpf met het behandelblok begonnen zal worden en uiterlijk op 29dpf euthanasie zal plaatsvinden. In een klein aantal vissen (max 10) zal daarvoor de imaging (P4) meerdere keren plaatsvinden (max 2 maal per dier) om te bepalen wat de optimale tijd is om EV-overdracht (P5) te meten. d=dagen; hpf=hours post fertilization.

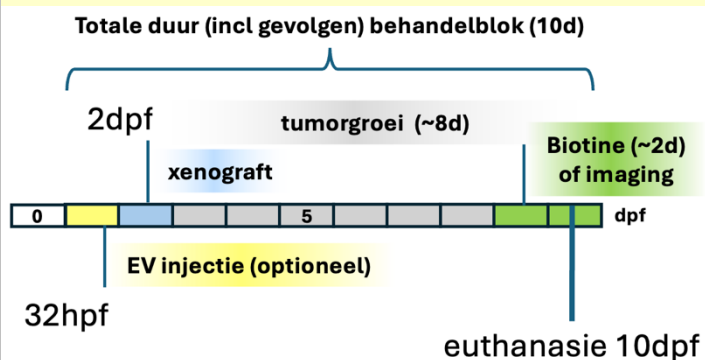
Het NAFLD-protocol zal verder geoptimaliseerd worden in samenwerking met een collega aan de Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Utrecht, die ervaring heeft met dit modelsysteem. NAFLD is gekozen als model voor metabole verstoring, omdat dit een typische multi-orgaan ziekte is met een duidelijke primaire oorzaak in één enkel orgaan, de lever. Tegelijkertijd zijn de gevolgen van NAFLD in meerdere organen waarneembaar, zoals in de darm en de pancreas, wat een sterke aanwijzing is voor (verstoorde) communicatie tussen de lever en andere organen.

Procedure P7: Voor inductie van darmkanker door induceerbare *kras*^{G12D} transgeen expressie in de darm (PMID: 29592890) zal van het bekende UAS:Gal4 systeem of TetON (TetA-EcR, inductie door 25 µg/mL doxycycline plus 25 µM tebufenozide gedurende 48h) systeem gebruik gemaakt worden, afhankelijk van welke methode het meest robuust blijkt (reproduceerbaarheid) en daarmee het minste ongerief veroorzaakt (verfijning). Doxycycline i.c.m. tebufenozide toevoeging zorgt ervoor dat de promotor van het transgeen actief wordt, waardoor het eiwit tot expressie komt. Dit zal toegevoegd worden op 8dpf. Het mogelijke voordeel van het TetON systeem is dat de duur waar de zebrafish tumorgroei in de darm ondergaat zo klein mogelijk gehouden kan worden, en/of er meer controle is over de sterkte van de inductie van oncogen expressie. Darmkanker is een ander duidelijk voorbeeld van miscommunicatie tussen verschillende orgaansystemen, in dit geval tussen de darm en de lever (m.n. uitzaaiing vanuit de darm naar de lever), waarin ook EVs een rol lijken te spelen.

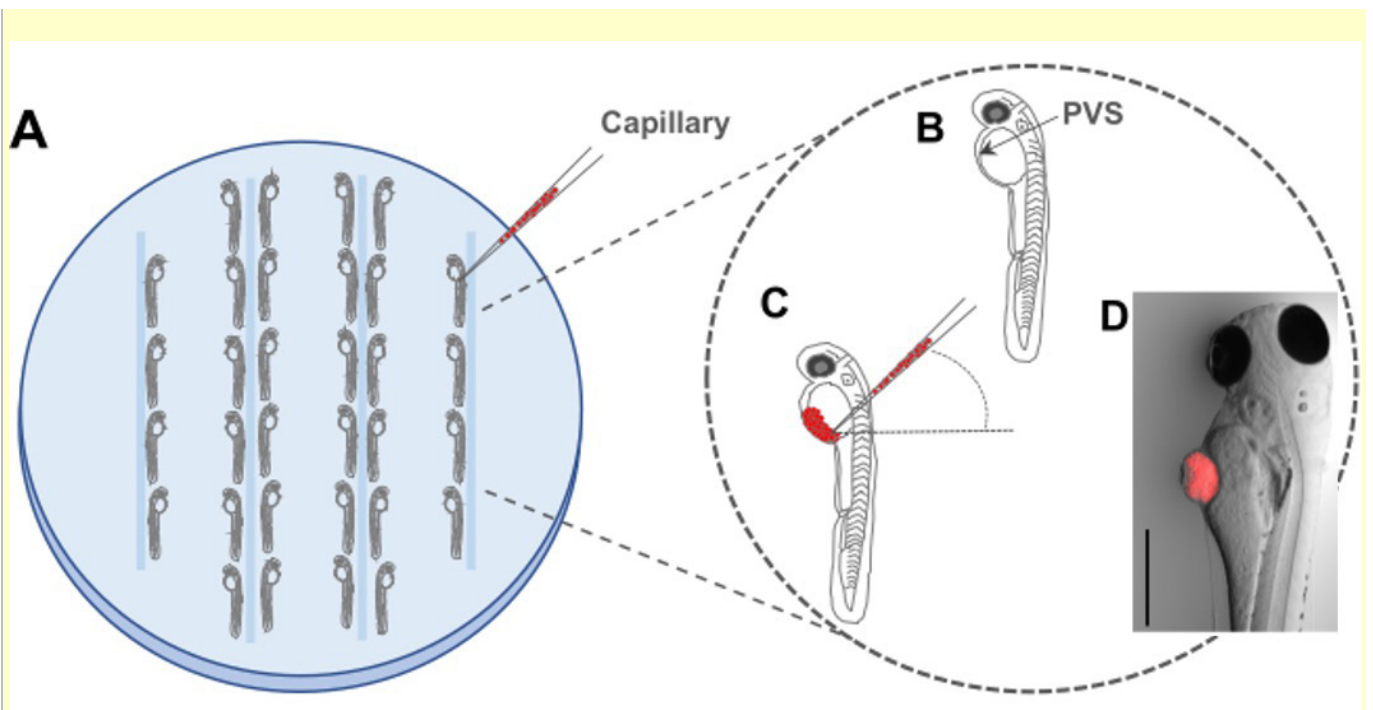


Figuur 2.3 Tijdslijn voor procedure P7 - Weergegeven zijn de verschillende handelingen en de duur ervan. Inductie van darmkanker is weergegeven in blauw, waarop het ontstaan van metaplasie volgt in grijs. Biotine toevoeging voor bepaling eiwitoverdracht (P5) en het alternatief, imaging voor het fluorescent volgen van de EVs (P4) zijn weergegeven in geel. Tevens is de totale duur van het behandelblok aangegeven. De duur van het behandelblok blijft gelijk, maar kan afhankelijk van de resultaten uit P4 verder verschoven worden zodat er uiterlijk op 18dpf met het behandelblok begonnen zal worden en uiterlijk op 29dpf euthanasie zal plaatsvinden. In een klein aantal vissen (max 10) zal daarvoor de imaging (P4) meerdere keren plaatsvinden (max 2 maal per dier) om te bepalen wat de optimale tijd is om EV overdracht (P5) te meten. d=dagen; hpf=hours post fertilization.

Procedure P8: Voor xenotransplantatie van humane darmkanker cellen in de perivitelline ruimte (de ruimte tussen de yolk en het buitenmembraan van de yolk), zal een bestaand protocol gebruikt worden (PMID: 19400945), recentelijk geoptimaliseerd (PMID: 28835536), waar onze medewerkers training zullen ontvangen voor de meest optimale xenografting strategie. Dit wordt in de helft van de gevallen voorafgegaan door injectie van tumor EVs op 32hpf in de perivitelline ruimte. Xenotransplantatie van darmkanker cellen zal worden gebruikt omdat dit de meest efficiënte manier is om naar tumor-geïnduceerde aanleg van bloedvaten te kijken.



Figuur 2.4 Tijdslijn voor procedure P8 - Weergegeven zijn de verschillende handelingen en de duur ervan. EV injectie (helft van de vissen is weergegeven in geel). Xenograft (xenotransplantatie) van tumorcellen in blauw, waarop tumorgroei zal plaatsvinden, weergegeven in grijs. Biotine toevoeging voor bepaling eiwitoverdracht (P5) en het alternatief, imaging voor het fluorescent volgen van de EVs (P4) zijn weergegeven in groen. Tevens is de totale duur van het behandelblok aangegeven. In een klein aantal vissen (max 10) zal de imaging (P4) meerdere keren plaatsvinden (max 2 maal per dier) om te bepalen wat de optimale tijd is om EV overdracht (P5) te meten. d=dagen; hpf=hours post fertilization.



Figuur 2.5 Schematische weergave van zebrafish micro-injectie plaat voor xenografting: A. Uitlijning van verdoofde embryo's in 3% Agar/2% Agarose plaat. B. Grafische weergave van een 2 dpf zebrafish embryo, met een zwarte pijl die de perivitelline ruimte (PVS) aanwijst. C. Kankercellen worden onder een hoek geïnjecteerd in de perivitelline ruimte (PVS). D. Zebrafish larve gexenograft met fluorescente tumor cellen in de PVS. Scalebar is 500 μ m Bron: [10.3791/62373](https://doi.org/10.3791/62373)

Xenografting (~200 geïnjecteerde cellen per embryo) zal plaatsvinden op 2dpf onder anesthesie, waarna de vissen op 34°C gehuisvest zullen worden tot aan het eind van het experiment (maximaal 4 tot 7 dagen na grafting, i.e. 6 – 9dpf). Deze temperatuur (34°C) is experimenteel vastgesteld als beste consensus tussen de optimale temperatuur voor humane cellen (37°C) en zebrafish larvae (27°C) (PMID: 19400945).

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

De berekeningen voor het uitvoeren van experimenten aan wildtype en transgene vissen zijn hierboven reeds gegeven (**Tabel 1.1**, Bijlage 1). Hierbij is uitgegaan van het feit dat de pathologie condities inherent meer variabel zullen zijn, en dus meer dieren vereisen. Voor het fluorescent tracken worden minder dieren gerekend omdat daar elk dier een experiment is, terwijl voor eiwit overdracht naar inschatting zo'n 80-150 larven per experiment gebruikt moeten worden om voldoende eiwitmateriaal te hebben. Omdat het hier fundamenteel onderzoek betreft, zal mogelijk niet elk model volledig uitgewerkt worden e.g. als in de tracking studies blijkt dat er vanuit het darmepitheel of vanuit de commensaal bacteriën in de darm minder EVs uitgescheiden worden dan verwacht. Ook is het mogelijk dat de darm veel meer EVs uitscheidt dan de lever of andersom. Als gevolg hiervan kunnen er bijvoorbeeld verschuivingen in gebruikte aantallen binnen P4 plaatsvinden, waarbij het totale aantal gebruikte dieren óf gelijk blijft, óf zelfs lager komt te liggen dan verwacht. Overigens is "negatief" resultaat hier zeker ook waardevol voor het veld, omdat dit bijvoorbeeld specificiteit van bepaalde EV-communicatie routes aan kan tonen, of kan suggereren dat EV-gemedieerde communicatie maar door enkele organen gebruikt wordt. Het aantal handelingen per dier wordt waar het voor significant ongerief zal zorgen zo laag mogelijk gehouden worden, maar waar proefdieren zonder significant extra ongerief meerdere malen gebruikt kunnen worden (zoals naar verwacht voor **P4**), zal dat zoveel mogelijk gedaan worden om zo het aantal gebruikte proefdieren zo laag mogelijk te houden (zie **Tabel 1.1**, Bijlage 1). Ook zal de opzet van eerst tracken (**P4**) alvorens we tot eiwit analyse (**P5**) over zullen gaan zorgen voor een zo nauwkeurig mogelijke inschatting van o.a. de meest optimale tijdspanne en doelorga(n)en selectie in (**P5**), waardoor we veel minder parameters zullen hoeven te optimaliseren.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, levensstadia, geschatte aantallen per levensstadium, geslacht, genetische wijzigingen en, indien van belang voor het behalen van de doelstelling, de te gebruiken stam.

Volgnr.	Diersoort	Herkomst	Levensstadium	Aantal	Geslacht	Genetisch gewijzigd	Stam
1	<i>Danio rerio</i>	Eigen kweek	larval	3000	Mannetjes en vrouwtjes	Wild type, mutant en transgen	AB

Onderbouw de bovengenoemde keuzes.

Diersoort	De diersoort die gebruikt wordt is de zebravis (<i>Danio rerio</i>), gezien de opgebouwde expertise met het doen van onderzoek aan deze soort.
Herkomst	Dieren zijn gekweekt voor onderzoek in de zebrafish aquarium faciliteit van het Hugo R. Kruytgebouw van de Universiteit Utrecht
Levensstadia	Larval. Doden t.b.v. weefseldonatie kan plaatsvinden vanaf dag 7 na bevruchting, maar zal in de meeste gevallen plaatsvinden bij zebravis larven tussen de 20 en 29dpf.
Aantal	Gezien de procedurele beslisboom (zie ook projectaanvraag) zal het aantal transgene zebravissen dat gebruikt wordt in dierproeven maximaal ca. 3000 zijn. Zie argumentatie onder "A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters, Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters " op pagina 2 en 3.
Geslacht	Mannetjes en vrouwtjes. Seksuele differentiatie vindt plaats tussen 20 – 25 dpf, en daarmee deels niet voor en deels vlak voor het eind van de proeven. Hoewel in de verre toekomst (> 5 jaar) potentiële verschillen in EV-communicatie, tussen de seksen een interessante onderzoeksrichting kan vormen, met name op het vlak van stofwisseling, is dat onderscheid in dit stadium niet relevant.
Genetisch gewijzigd	Naast wild type zebravissen, worden transgene en KO/KD zebravislijnen voorgesteld voor het onderzoek.
Stam	AB.

C. Huisvesting en verzorging

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

Já

Nee > 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.

D. Pijn en welzijnsaantasting

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

Nee

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Click or tap here to enter text.

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

In dit project verwachten we voor het overgrote deel van de verschillende subdoelen (a, b, c) slechts minimale verstoring van de zebravissen. Natuurlijk verlies tijdens het opgroeien van larven tot volwassenheid is onvermijdelijk en inherent aan het kweken van vissen. Onze ervaring leert dat ongeveer 25% van de larven verloren gaat (de meerderheid daarvan vóór dag 5) bij normale kweekpraktijken, ongeacht of het gaat om wildtype of transgene vissen. We voorzien geen verliezen die deze natuurlijke incidentie overstijgen als gevolg van onze experimenten.

Het onderdeel "het induceren van metabole verstoringen" (P6, P7 & P8) is het enige subdoel waar gereede kans is op enige mate van ongerief bij de dieren, vanwege de metabole verstoringen die geïnduceerd worden (dieet geïnduceerde NAFLD, transgen geïnduceerde darmkanker en het xenograften van tumorcellen in de periviteline ruimte). Hierbij geldt echter dat extreem ongerief niet verwacht noch gewenst is, en daarom zoveel mogelijk vermeden zal worden door het gebruik van gestandaardiseerde protocollen met reproduceerbare uitkomsten. Omdat de ontwikkeling van zebravis larven nauwkeurig in kaart is gebracht, kunnen (sterke) afwijkingen relatief eenvoudig worden herkend, waarbij de desbetreffende dieren voortijdig uit de proef gehaald kunnen worden. Hierbij zal worden gelet op (hart) oedeemvorming en morfologische misvorming, zoals kromvorming van de rug. Deze dieren zullen uit de proef gehaald worden.

Voordat volwassen vissen of larven verdoofd worden voor **P4**, wordt een evaluatie uitgevoerd om hun geschiktheid te beoordelen. Dit gebeurt door te letten op tekenen van ziekte of afwijkend zwemgedrag. Dieren die niet gezond lijken, worden niet onderworpen aan procedures. Verdoofd worden ze door onderdompeling in verdunde MS-222-oplossing (40 mg/L MS-222).

We minimaliseren handling en invasieve procedures waar mogelijk, en bij het gebruik van verdoving zorgen we ervoor dat de temperatuur en waterparameters van de verdovingsooplossing zo dicht mogelijk bij die van de thuishouding liggen om stress te verminderen. De anesthesie wordt nauwkeurig gehandhaafd door de terugtrekkingsreflex te testen en de beweging van het operculum te observeren voordat stimuli worden toegepast.

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Zoals hierboven vermeldt is het onderdeel "het induceren van metabole verstoringen" (P6, P7 & P8) het enige subdoel waar gereede kans is op enige mate van ongerief bij de dieren, vanwege de metabole verstoringen die geïnduceerd worden (dieet geïnduceerde NAFLD, transgen geïnduceerde darmkanker en het xenograften van tumorcellen in de periviteline ruimte).

De effecten van NAFLD (**P6**) zullen zich vermoedelijk op eenzelfde manier zullen uiten als bij de mens: vermoeidheid, gewichtsverlies en spierzwakte.

In mindere mate bij het induceren van darmkanker (**P7**) en in meerdere mate bij het xenograften (**P8**) van cellen kan er sprake zijn van matig ongerief als gevolg de procedures. Hierbij zal worden gelet op oedeemvorming bij het hart en morfologische misvorming, zoals kromvorming van de rug.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De symptomen van NAFLD (**P6**) betreffen lipide metabolisme disorder, oxidant stress en vervetting van de lever. Omdat de lever een centrale rol speelt in metabolisme, ligt het voor de hand dat het verwerken van de normale- en de extra afvalstoffen als gevolg van de verhoogde metabole activiteit door NAFLD meer energie vergt van de proefdieren.

De oedeemvorming bij (**P7**) en of (**P8**) kunnen worden geïnduceerd door de grafting procedure zelf i.c.m. de anesthesie (**P8**) maar ook door verstoorde integriteit van de bloedvaten waardoor vocht makkelijker kan weglekken/minder goed kan worden geklaard in de interstitiële ruimte waar de tumor zich bevindt, in dit geval vlak bij het hart. De (incidentele) kromvorming van de rug

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

Schadelijke effecten worden zoveel mogelijk voorkomen door de NAFLD-inductie in samenwerking met de collega van Veterinary Sciences (UU) zoveel mogelijk te optimaliseren en standaardiseren. Dit kan door de concentratie van cholesterol in het dieet zo nauwkeurig mogelijk te bepalen.

Deze optimalisatie geldt ook voor **P7** en **P8** en de medewerkers zullen een specifieke cursus volgen om de beste parameters voor injectie (e.g. duur en concentratie voor inductie van oncogen (P7); aantal cellen en duur van de verschillende stappen (P8)) en de meest zorgvuldige manier van handeling in de vingers te krijgen.

Daarnaast zullen de dieren worden gemonitord op afwijkend zwemgedrag (lage zwemactiviteit, geen interactie met andere vissen, hoog boven in de tank dicht bij het wateroppervlak zwemmen) en morfologische misvorming, zoals kromvorming van de rug. Dieren die deze symptomen in erge mate vertonen zullen uit de proef gehaald worden. Bij dieren die deze symptomen in mindere mate vertonen zal zoveel mogelijk geprobeerd worden om met een lage concentratie anesthesie mogelijke pijn te verlichten, in zoverre het succesvol uitvoeren van de rest van de proef dat toelaat.

E. 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 F.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

In onze aquariumfaciliteit beschikken we over een goed opgeleid team van dierenverzorgers. Dagelijkse routines zijn gepland om tijdens voedingssessies de gezondheid van onze vissen gedetailleerd te monitoren. Elke dag wordt elke zebravis beoordeeld op humane eindpunten, waarbij we letten op onnatuurlijk zwemgedrag, gebrek aan respons op voeding, kleurverandering, lethargie, de vorming van tumoren en scoliose, evenals tekenen van infectie zoals witte vlekken of bloedingen. Dit geldt voor alle vissen, dus ook de dieren die in een experiment zitten. Indien een vis deze indicatoren vertoont, wordt deze uit de tank verwijderd en geëuthanaseerd. Over het algemeen is onze ervaring dat genetisch gemodificeerde zebravissen jonger dan een jaar zelden aan deze criteria voldoen. Bij Tol2-transgenese wordt speciale aandacht besteed aan dierenwelzijn, vooral bij de F2- en F4-nakomelingen, waar potentieel homozygote zebravissen kunnen voorkomen.

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

Uit onze ervaring blijkt dat ongeveer 25% van de larven verloren gaat tijdens het normale kweekproces van vissen, zie bijlage 1. We verwachten dat de ziektemodellen, beschreven in deze bijlage (2), extra ongerief ondervinden, maar dat de kans dat ze daarmee deze criteria halen hoger ligt, zo'n 5% extra. Dit vanwege de relatief korte duur van de experimenten. Uiteraard zijn bij (**P7**) en (**P8**) tumorvorming onderdeel van het experiment, maar gaat dit vooral om verhoogde celdeling/metaplasie in de darm (**P7**), en extra-embryonale/larvale tumorgroei in de perivitelline-ruimte die geïnduceerd/gecontroleerd plaatsvindt (**P8**) en niet het gevolg is van de Tol2 (**P2**).

F. Classificatie van ongerief

Benoem de experiment gebonden factoren die bijdragen aan het ongerief en geef voor elk van deze factoren aan hoe het ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig'. Geef per diersoort en behandelgroep het cumulatieve ongerief aan in percentages van het totale aantal dieren.

We voorzien geen significant nadelige effecten voor het aanhouden van de stabiele lijnen zelf t.b.v. de hier beschreven dierproeven, omdat de vissen worden gekweekt onder gestandaardiseerde omstandigheden.

Zoals aangegeven onder D, is subdoel d ("het induceren van metabole verstoringen") het enige onderdeel waar gerede kans is op enige mate van ongerief bij de dieren, vanwege de metabole verstoringen die geïnduceerd worden (dieet geïnduceerde NAFLD, transgen geïnduceerde darmkanker en het xenograften van tumorcellen in de perivitelline ruimte). Hierbij geldt echter dat ernstig ongerief niet gewenst is en ook niet in het belang van het onderzoek is, en daarom zoveel mogelijk vermeden zal worden door het gebruik van gestandaardiseerde protocollen met reproduceerbare uitkomsten en humane eindpunten, zoals hieronder per procedure vermeld.

Voor procedure **P4** zullen de darmstelsels van de dieren gekoloniseerd worden met commensaal bacteriën en/of zullen de dieren worden bekeken onder de microscoop onder tijdelijke verdoving. Hiervoor verwachten

we slechts licht ongerief van de verdoving zelf. Voor een beperkt aantal dieren (~50; 17%) in pilot-experimenten zullen meerdere (~7) tijdstippen worden gebruikt om het optimale tijdstip voor microscopie-analyse te bepalen, waardoor larven dus meerdere malen verdoofd zullen worden en tussentijds bij zullen komen. Dit komt neer op matig ongerief. De afweging hier is om het totaal aantal dieren te verminderen maar ook het (cumulatief) ongerief per dier zo laag mogelijk te houden. Praktisch gezien houdt dit in dat niet alle dieren voor alle tijdstippen gebruikt zullen worden, maar de metingen verspreid zullen worden over de dieren, zodat elk dier maximaal 2-3 keer gebruikt zal worden. De microscopie zelf is niet invasief, en wordt dus in een klein deel van de vissen tot maximaal 3 maal per vis uitgevoerd, aangezien de vissen na de procedure teruggeplaatst kunnen worden. Door vissen meerdere keren te gebruiken kan het totaal aantal gebruikte proefdieren beperkt worden.

Voor procedure **P5** geldt dat de dieren geëuthanaseerd zullen worden d.m.v. overdosis anesthesie. Hiervoor verwachten we licht ongerief van de verdoving zelf.

Voor procedure **P6** geldt dat maximaal 600 larven (150+450, zie **Tabel 2.1**) een hoog-cholesterol dieet zullen ondergaan. Dit zal in onze inschatting voor matig ongerief zorgen zoals een algemene achteruitgang van conditie (in de mens zorgt NALFD voor vermoeidheid, gewichtsverlies en spierzwakte); omdat het dieet per definitie gecontroleerd wordt door de experimentator, kan de tijdsperiode waarin dit dieet gehanteerd wordt zo kort mogelijk gehouden worden, o.a. door het zo kort mogelijk voor het experimentele eindpunt starten hiervan. Naar verwachting is dit maximaal 2 weken voor het experimentele eindpunt, waarbij volgens de literatuur de additionele mortaliteit ten opzichte van de controlegroep zonder interventie 10-15% bedraagt (PMID: 31182918), terwijl relevante fenotypes als verstoring van lipide metabolisme, oxidant stress en vervetting van de lever in deze periode ook waarneembaar zijn. Om deze additionele mortaliteit te voorkomen, zullen wij de larven nauwgezet monitoren op o.a. significante oedeemvorming of vergroting van de yolk, een vertraagde hartslag en/of het kromtrekken van de rug. Door larven die deze kenmerken vertonen met vroegtijdige interventie uit het experiment te halen en vervolgens te euthanaseren verwachten we deze dieet-geïnduceerde additionele mortaliteit en het daaraan voorafgaande ernstige ongerief te voorkomen.

Voor procedure **P7** geldt dat maximaal 600 larven (150+450, zie **Tabel 2.1**) geïnduceerd zullen worden voor transgen expressie van $kras^{G12D}$ in de darm, en de andere helft niet (controle groep). Dit zal naar onze inschatting voor matig ongerief zorgen, aangezien de controleerbare expressie op een middelmatig niveau gehouden zal worden. In eerste instantie zorgt $kras^{G12D}$ expressie dan voor metaplasie, en geen ongecontroleerde tumorgroei. Om precies die reden heeft het induceerbare en reversibele TetON systeem op papier de voorkeur boven het UAS:Gal4 systeem wat in principe vanaf de vorming van de darm op "aan" staat.

Voor procedure **P8** geldt dat maximaal 600 larven (150+450, zie **Tabel 2.1**) geïnjecteerd zullen worden met wildtype- of gemuteerde tumorcellen die geen/minder EVs uitscheiden. Naar verwachting is in beide gevallen het ongerief vergelijkbaar en matig. Deze verwachting is gebaseerd op het feit dat we een geoptimaliseerd protocol zullen gebruiken waar het aantal cellen dat geïnjecteerd wordt nauwkeurig gecontroleerd wordt. De geïnjecteerde tumorcellen blijven lokaal, en groeien bovenop de yolk, wat een tijdelijk extra-embryonale structuur is, en dus niet rechtstreeks in het embryo zelf, zodat orgaanfunctie door de primaire tumor niet wordt aangetast. Hierdoor wordt er geen ernstig ongerief verwacht in dit onderdeel.

Als er desondanks zichtbaar (ernstig) ongerief optreedt en het dier met oog op de proef niet geëuthanaseerd kan worden, zal worden gekozen voor pijnverdoving (analgesie) door middel van lidocaïne of een vergelijkbaar middel (PMID: 37806085).

Voor P6-P8 worden experimenten gecombineerd met P4 of P5. Fluorescent tracken (P4) en het bepalen van eiwit overdracht (P5) zijn beide ingeschat als lichte mate van ongerief, wat bovenop het inherente ongerief komt van P6, P7 en P8 (matig) komt en dus als cumulatief ongerief geldt. Vanwege de (zeer) lichte mate van ongerief van P4 en P5, verwachten we niet dat het cumulatieve ongerief met P6, P7 en P8 dusdanig toeneemt dat er sprake zal zijn van ernstig ongerief.

Om het dierenwelzijn te waarborgen worden de zebrafissen dagelijks gemonitord, waarbij alleen getrainde personeelsleden en stagiaires onder toezicht toegang hebben tot de vissen. In onze aquariumfaciliteit hebben we een ervaren team van dierenverzorgers. Het mogelijke ongemak als gevolg van de verdoving en het herstel kan niet worden vermeden vanwege de noodzaak van de fin-clip procedure. Bovendien kan de verdoving het ongemak tijdens het knippen van de vin zelf verminderen.

Tabel 2.2 Classificatie van (cumulatief) ongerief proefdieren

Procedure	korte omschrijving		Mate van (cumulatief) ongerief		
			P4	P4	
P4	fluorescent tracken		P4	P4	
		<i>aantallen</i>	250 (83%)	50 (17%)	
		<i>ongerief</i>	licht	matig	
P5	bepalen eiwit overdracht		P5		
		<i>aantallen</i>	900		
		<i>ongerief</i>	licht		Sub totaal
					1200
P6	NAFLD inductie		P6+P4	P6+P5	
Pathologie		<i>aantallen</i>	150 (25%)	450 (75%)	
		<i>ongerief</i>	matig	matig	
P7	darmkanker inductie		P7+P4	P7+P5	
Pathologie		<i>aantallen</i>	150 (25%)	450 (75%)	
		<i>ongerief</i>	matig	matig	
P8	Xenotransplantatie darmkanker		P8+P4	P8+P5	
Pathologie		<i>aantallen</i>	150 (25%)	450 (75%)	
		<i>ongerief</i>	matig	matig	
					Sub totaal
					1800
					TOTAAL dieren
					3000

Tabel 2.2 Overzicht van de classificatie van ongerief voor de (combinaties van) procedures, en de aantallen dieren die deze ondergaan. Het grijs gearceerde deel gaat specifiek over de gegevens van dieren waar pathologie geïnduceerd is.

G. 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

Voor dit onderdeel G zijn de volgende resources geraadpleegd: 3Rs INFO HUB (<https://www.3rsinfohub.de/index.html>), de NAT Database (nat-database.org) en Biomedical research (europa.eu). Tot op heden is er geen alternatief/in vitro model waarmee we EV-communicatie tussen organen kunnen bestuderen, gezien de gelijktijdige activiteit tussen zendende en ontvangende weefsels/organen en de noodzakelijke contacten tussen verschillende celtypen, wiens eigenschappen gedurende dat cellulaire ontwikkelingsproces bovendien veranderen. Er zijn ons geen *in vitro* modellen bekend ter vervanging van vissen waarbij deze complexe interacties kunnen worden bestudeerd, behalve muizen en drosophila (fruitvlieg). Voor muizen geldt dat 1) EVs niet goed gevisualiseerd kunnen worden, en 2) dat het gebruik van zebravissen op zichzelf al een vervanging is (namelijk voor muizen). Voor drosophila geldt dat dit geen vertebraten zijn, en ze niet het kenmerkende lichaamsbouwplan van gewervelden hebben (o.a. gesloten bloedsomloop), daarmee verder van de mens afstaan dan vissen en muizen, maar ook minder geschikt voor hoge-resolutie imaging in latere ontwikkelingsstadia. Multi-organ-on-a-chip modellen missen belangrijke eigenschappen die naar huidig inzicht

	juist cruciaal zijn voor de biologie van EVs, zoals metabole processen direct gelieerd aan voedsel-processing, de verwevenheid/onderlinge afhankelijkheid van orgaansystemen, en de rol van weefsel-specifieke macrofagen en het immuunsysteem. Daarnaast zullen tests gedaan worden voor <i>in vitro</i> validatie van <i>in vivo</i> resultaten. Als onverwachts blijkt dat <i>in vitro</i> assays (delen) van de <i>in vivo</i> proeven kunnen vervangen, kan dit in de toekomst meehelpen om een aantal type dierproeven overbodig te maken.
Vermindering	Hetzelfde geldt voor de optimalisatie van alle tools in zebra vis embryo's, hier doen we zo veel mogelijk proeven t/m dag 6, en hebben we daarom zo weinig mogelijk larven nodig. Om in de toekomst mogelijke vermindering mogelijk te maken zullen we parallel aan de <i>in vivo</i> proeven ook <i>in vitro</i> proeven inzetten om vast te kunnen stellen in welke mate deze correleren. Hoewel ze naar verwachting niet alle <i>in vivo</i> proeven overbodig kunnen maken, kan het resulteren in eenvoudigere proeven of bepaalde modellen.
Verfijning	Alle procedures en strategieën die we beogen, hebben we gekozen om potentieel ongerief zo klein en kort mogelijk te houden en reproduceerbaarheid en replicerbaarheid juist zo hoog mogelijk te krijgen. Hieronder vallen de optimalisatie van de NAFLD-inductie, het gebruikmaken van induceerbare kankermodellen (waardoor de transgene lijn zelf geen ongerief ondervindt, en de timing/grootte van de tumor beter gecontroleerd kan worden). Ook het volgen van de cursus voor reproduceerbaar xenograften zal verder helpen aan verfijning door het gebruik van de optimale handeling. Tenslotte zullen we de dieren blijvend monitoren, en afwijkende dieren tijdig uit experiment halen, waardoor ongerief zoveel mogelijk beperkt blijft.

Zijn er nadelige milieueffecten te verwachten?

Nee

Ja > Benoem de te verwachten milieueffecten en geef aan welke maatregelen zijn genomen om deze tot een minimum te beperken.

Click or tap here to enter text.

H. Hergebruik

Worden er dieren ingezet die eerder in een andere dierproef zijn gebruikt?

Nee > ga verder met vraag I.

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

Click or tap here to enter text.

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

Nee

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

Click or tap here to enter text.

I. Herhaling

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

n.v.t.

J. Plaats waar de dierproef wordt uitgevoerd

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

Nee > Ga verder met vraag K.

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?

Click or tap here to enter text.

3 Einde Experiment

K. Bestemming van de dieren bij einde experiment

Worden de dieren gedood?

Nee > Beschrijf de bestemming van de dieren.

Click or tap here to enter text.

Ja > Geef aan waarom de dieren worden gedood.

De dieren zullen worden gedood t.b.v. weefseldonatie voor analyse eiwitoverdracht m.b.v. massa spectrometrie.

Indien dieren worden gedood, wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van Richtlijn 2010/63/EU toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Vanaf 16dpf onderdompeling in ijswater voor ten minste 5 minuten. Deze methode is snel genoeg om isolatie van de organen en downstream analyse te waarborgen, en daarmee de optimale methode. De tweede methode is niet direct opgenomen in annex IV van de [directive 2010/62/EU](#), maar is hij door een wetenschappelijke commissie, samengesteld door de Europese commissie [voorgesteld als toevoeging voor annex IV](#) (zie antwoord vraag drie op pagina 21). Om die reden zien wij het als een methode die niet alleen onder specifieke omstandigheden mag worden toegepast, maar geldt als de correcte reguliere methode bepaald door de onder experts heersende mening.

Bron: Scientific Committee on Health, Environmental and Emerging Risks SCHEER Revision of Annexes III and IV of Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes regarding accommodation parameters and methods of killing for zebrafish, and accommodation parameters for Passerine birds ([link accessed 22-10-2024](#))

Ja > Betreft het een dodingsmethode die alleen onder specifieke voorwaarden mag worden toegepast?

Nee > Beschrijf de dodingsmethode

Overdosis anesthesie (in de regel: MS-222 200-300mg/L voor meer dan 10 minuten) voor dieren t/m 15dpf. Deze methode is snel genoeg om isolatie van de organen en downstream analyse te waarborgen, en daarmee de optimale methode.

Ja > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Click or tap here to enter text.

Indien dieren worden gedood, maar niet in het kader van de proef, geef aan of herplaatsing is overwogen en waarom hiervan is afgezien.

Herplaatsing is niet mogelijk omdat het transgene lijnen betreft. De NVWA heeft in overleg met de IvD aangegeven dat dieren ouder dan 12 maanden dienen te worden afgevoerd door euthanasie.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : AVD10800202418274
2. Titel van het project : De rol van extracellulaire blaasjes in de regulatie van orgaan homeostase
3. Titel van de NTS : De rol van extracellulaire blaasjes in het in balans houden van organen

4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning
 wijziging van vergunning met nummer :

5. Contactgegevens DEC

Naam DEC : DEC Utrecht
Telefoonnummer contactpersoon : 06-31118069
Emailadres contactpersoon : dec-utrecht@umcutrecht.nl

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

- ontvangen door DEC: 02-08-2024
 aanvraag compleet:
 in vergadering besproken: 07-08-2024
 anderszins behandeld:
 termijnonderbreking(en) van / tot : 14-08-2024 / 23-09-2024 en 30-09-2024 / 01-10-2024
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
 aanpassing aanvraag:
 advies aan CCD: 08-10-2024

7. De aanvraag is afgestemd met de lvD en deze is hiermee akkoord.

8. Eventueel horen van aanvrager

- Datum: 07-08-2024
- Plaats: Utrecht
- Aantal aanwezige DEC-leden: 5
- Aanwezige (namens) aanvrager: Verantwoordelijk onderzoeker
- Strekking gestelde vragen en verstrekte antwoorden: De DEC heeft de onderzoekers o.a. gehoord over de achtergrond, het doel, het aantal dieren met ongerief en de risico's op ongerief bij de transgene lijnen. Hieruit zijn onderstaande vragen, zoals vermeld bij punt A9a en A9b, voortgekomen, die schriftelijk aan de onderzoekers werden voorgelegd.
- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag.

9a. Correspondentie met de aanvrager

- Datum vragen: 14-08-2024
- Datum antwoord: 23-09-2024

- Strekking gestelde vragen en antwoorden:

Projectvoorstel

3.1 Achtergrond

Kunt u uitgebreider beschrijven wat al bekend is over de communicatie met extracellulaire vesicles en wat uw onderzoek aan deze bestaande kennis? Kunt u daarbij tevens uw keuze voor de organen (darm en lever) en de pathologie (NASH en colonkanker) onderbouwen? Studie naar communicatie met EVs gebeurt veelal door EVs te isoleren uit weefselkweken (in vitro) van verschillende celtypes (darm, lever, long, hart, nier etc.) en die dan toe te voegen aan andere weefselkweken, of ze in te spuiten in proefdieren waarna effecten (biochemisch) gemeten worden. Op deze manier is duidelijk geworden dat EVs een rol kunnen spelen in het immuunsysteem (overbrengen van antigenen, moduleren of onderdrukken van afweerrespons), bij weefsel herstel (door groeifactoren en cytokines over te brengen), in neurodegeneratieve ziekten als Parkinsons' en Alzheimer's (verspreiding van verkeerd gevouwen eiwitten zoals amyloid-beta en tau), in het cardiovasculaire systeem (endothelcel- en bloedplaatjes-EVs kunnen bijvoorbeeld angiogenese reguleren), in infectie (EV uitwisseling tussen pathogeen en host), bij embryonale ontwikkeling (cel differentiatie, weefsel organisatie), maar ook bijvoorbeeld bij tumorgroei en metastase.

Tumor EVs zijn dus onder andere betrokken bij de metastase van de primaire tumor. Dit kunnen ze doen door de toekomstige plek van metastase te 'primen'. Dit primen houdt in dat de tumorcellen die van de primaire tumor in de bloedbaan terechtkomen makkelijker kunnen extravaseren (uit te bloedbaan komen) en uitgroeien op plekken waar ook eerst EVs van de primaire tumor zijn geweest (PMID: 22635005; 37059067). Tumor EVs zijn ook betrokken bij tumor angiogenese, het proces waarbij bloedvaten worden aangelegd naar de tumor (PMID: 31646189). Dit proces kunnen ze stimuleren. Verder is er bijvoorbeeld uit in vitro experimenten met gepolariseerde darmepitheel cellen bekend dat gezond darmepitheel ook specifieke EVs uitscheidt aan de kant van de cellen (basolateraal) die naar de interne bloedvaten gericht zijn (PMID: 14633944). Hoewel het aannemelijk is dat dit ook in levende organismen plaatsvindt, is het niet bekend in welke mate dit het geval is, en ook wat de functie van deze EVs vervolgens is. Gebruikmakend van vergelijkbare methoden is bekend dat ook levercellen EVs uitscheiden, en tevens dat de eiwitten die daarin zitten anders zijn in geval van pathologie, waaronder NASH/NAFLD (PMID: 30202821). Als we meer uitzoomen, is inmiddels duidelijk dat alle celtypen in in vitro weefselkweken hoge aantallen EVs uitscheiden.

Er is dus al veel bekend over EVs en hun mogelijke rol in communicatie. Echter is ook duidelijk dat de manieren waarop dezelfde cellen gekweekt kunnen worden, bijvoorbeeld in 2D-monoculturen op plastic of in 3D gemixt met andere celtypen, veel verandert aan de hoeveelheid, de grootte, alsmede de eiwit inhoud van de EVs die uitgescheiden worden (PMID: 30828519; 31506601). Ook is weinig tot geen van de data in een compleet (patho)fysiologische setting gevalideerd (PMID: 26967288). Dit roept de vraag op wat de natuurlijke omstandigheden van een cel in een orgaan én de wederzijdse afhankelijkheid van de verschillende organen precies voor invloed heeft op de hoeveelheid maar ook de eiwitinhoud van de EVs die door deze cellen uitgescheiden worden. Dit is nog totaal onbekend, en daarom richten wij ons in dit onderzoek hoofdzakelijk op twee organen, de darm en de lever, waar op

basis van in vitro experimenten van verwacht wordt dat ze veel EVs uitscheiden. We zullen deze in gezonde toestand, maar ook onder pathologische conditie onderzoeken. De pathologieën, NAFLD en darmkanker, zijn gekozen met de volgende overwegingen: 1) is er voldoende bekend over het effect van de specifieke pathologie op de EVs vanuit de literatuur 2) is het aannemelijk dat de pathologie te maken heeft met verstoring van communicatie via EVs tussen organen 3) zijn de pathologiemodellen beschikbaar en afdoende gekarakteriseerd in zebrafish larven, en tenslotte 4) sluit het pathologiemodel goed aan bij bestaande onderzoekslijnen in het lab en/of elders binnen het instituut. Op basis van deze afwegingen hebben we voor NAFLD en darmkanker gekozen als pathologiemodellen.

Dit is nu op verschillende plekken ingevoegd in de algemene introductie van het projectvoorstel. Voor meer inzicht in de aansluiting van uw onderzoeksvorstel bij de recente literatuur over de functionaliteit, diagnostische waarde en therapeutische opties van extracellulaire blaasjes ziet de DEC graag een toelichting hoe dit onderzoek bij deze activiteiten aansluit.

In dit onderzoek willen we voor het eerst de functionaliteit van EVs in een volledige in vivo setting op een directe manier en precieze manier te bestuderen. Dit doen we door 1) de EVs die in vivo worden uitgescheiden te visualiseren en te volgen in de zebrafish larve met microscopie, om zo de doelorganen te bepalen; 2) de EV uitscheiding specifiek te remmen, dus het remmen van alleen EVs (en geen/zo min mogelijk andere typen communicatie routes), en het remmen van EVs alleen in een specifiek weefsel namelijk de lever of de darm. 3) het bepalen van de eiwit inhoud van EVs die naar specifieke weefsels gaan. Door deze drie strategieën kunnen we er achter komen waar EVs vanuit de darm of lever heen gaan, wat er precies wordt overgedragen in de vorm van eiwitten, en wat het belang hiervan is op de doelorganen tijdens gezondheid of metabole verstoring. Door EV-secretie aan of uit te zetten kunnen we namelijk bepalen wat het effect is op het ontvangende orgaan, met name effecten op e.g. groei, inflammatie en de metabole status van de ontvangende cellen.

Hoewel dit onderzoek geen directe link heeft met diagnostiek of therapeutische toepassingen, zijn er wel aanknopingspunten hiervoor. M.b.t diagnostiek kunnen we verwachten dat er specifieke eiwitten in hogere of juist lagere mate aanwezig zijn in de EVs van weefsels in pathologische vs gezonde toestand. Deze zijn deels al bekend vanuit in vitro en in vivo studies, maar in ons systeem kunnen we heel selectief de EVs uitgescheiden van specifieke weefsels in vivo isoleren, waardoor de resolutie naar verwachting een stuk hoger ligt terwijl de bovengenoemde nadelen van traditionele 2D-monoculturen niet van toepassing zijn.

M.b.t. therapie zal dit onderzoek bijdragen aan een helderder beeld over wat de (eiwit)factoren zijn die bepalen of een EV specifiek naar het ene en niet naar het andere doelorgaan gaat. Hierover is al duidelijk dat integrines een rol spelen in geval van tumor-EVs (PMID: 26524530), maar of dat ook het geval is voor 'normale' EVs in gezonde situaties en of integrines de enige factoren van belang zijn is nog niet bekend. Ook blijft een belangrijke vraag of en hoe EVs die naar specifieke organen gaan kunnen voorkomen dat ze niet worden afgebroken in organen zoals de lever. Deze twee factoren, specifieke targeting van organen en het voorkomen van voortijdige afbraak, zijn twee belangrijke bottlenecks in het drug-targeting veld. Dit is nu verder uitgewerkt in 3.3.1.

3.3 Belang: Uw onderzoek betreft een snel evoluerend gebied waarbij samenwerking

essentieel is. Kunt u uw wetenschappelijke netwerk in het kader van dit project benoemen?
Wetenschappelijke samenwerking is inderdaad essentieel. Dit is nu verder uitgewerkt in 3.2.2.

3.4 Strategie

Kunt u de nummering (met name P5, P6, P7) controleren en waar nodig aanpassen?

Dit is gedaan, onder 3.4.1 d) stonden inderdaad wat foutieve verwijzingen.

Bijlage 1

U verwijst in beide bijlagen naar protocollen, maar de DEC weet niet om welke documenten het gaat en kan er daarom geen waarde aan geven. Wilt u de protocollen als losse bijlagen toevoegen of de verwijzing verwijderen en de precieze handelingen die de dieren ondergaan beter uitwerken?

Waar er wordt verwezen naar handelingen in artikelen die (mogelijk) niet direct voor de DEC toegankelijk zijn, zijn de handelingen in meer detail beschreven. Dat gaat om P1, P6, P7 en P8.

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

U gaat heel veel transgene lijnen genereren. Kunt u toelichten waarom u zoveel nieuwe lijnen nodig heeft?

Het aantal te genereren lijnen valt hoog uit om de volgende redenen: 1) onderzoek naar EVs in zebravissen is nieuw, hierdoor is er nauwelijks iets beschikbaar wat we direct kunnen gebruiken, en het genereren van nieuwe lijnen heeft inherent hoge aantallen nodig zonder dat er een experiment in traditionele zin mee gedaan wordt; 2) het betreft hier fundamenteel onderzoek met een exploratief karakter. Hierdoor weten we bijvoorbeeld nog niet I) welk EV-marker eiwit we het best kunnen gebruiken (zie tabel 1b) II) in welk orgaan, welke type label (e.g. GFP of HALO) het meest robuust werkt, en III) welke manier van in vivo biotinylatie het best werkt. Daarnaast hebben we een aantal lijnen nodig waar mogelijke doelorganen een bepaalde kleur hebben, om zo de organen beter te kunnen identificeren.

Deze tekst is nu verwerkt in Bijlage 1 onder het kopje "Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken."

Kunt u procedure P6, P7 en P8 verder toelichten? Wat wordt er precies gedaan? Graag een tijdslijn met handelingen.

Dit gaat om bijlage 2. De procedures zijn nu in meer detail beschreven, en er zijn tijdslijnen met handelingen toegevoegd.

B. De dieren

Het aantal dieren is voor de DEC niet volledig navolgbaar. Wilt u dit verder toelichten?

Het (hoge) aantal lijnen is hierboven reeds toegelicht, het is ook mede een gevolg van de aangepaste handreiking "genetisch gewijzigde dieren", waardoor de monitoring van nieuwe lijnen vergunning plichtig is gesteld. De berekening waarmee in lijn met die handreiking tot het huidige geschatte aantal wordt gekomen is nu uitgebreider weergegeven in de tekst. In het kort: we zullen 2 (generaties) x 30 vissen doorgroeien naar volwassenheid, rekening houdend met een variatie in sekse-verhouding tussen 1:4 en 1:1 tussen de aantallen M en V, om er per generatie minimaal 7 mannen 7 vrouwen te monitoren. Vanaf 5dpf is de natuurlijke uitval van larven laag (naar schatting tussen de 5-10% uitval), en met een 1:4 ratio hebben we $4 \times 7 = 28$

larven nodig om 7 van het ene geslacht te hebben, waarbij de 21 overige dus het andere geslacht zullen hebben. Om te compenseren voor mogelijke uitval houden we 30 vissen per lijn aan over twee generaties om onder een vergunning de mogelijkheid op ongerief te monitoren. Dat komt neer op 60 vissen per lijn, en met 30 tot 60 lijnen komt dat uit op en totaal van 3600 minimaal, en 7200 vissen maximaal. Deze toelichting is in meer detail beschreven in deel A van Bijlage 1, het onderste blok betreffende "overwegingen en statistische methoden (...) voor het aantal benodigde dieren".

Het aantal aangevraagde dieren is gebaseerd op een scenario waarin alle experimenten met alle lijnen daadwerkelijk worden uitgevoerd. Is dit een haalbaar en realistisch scenario om uit te voeren of zal de praktijk mogelijk anders zijn? Indien de praktijk (werkdruk) waarschijnlijk anders is, zouden de aangevraagde dieraantallen dan daarop aangepast kunnen worden? *Het klopt dat het werkelijke aantal waarschijnlijk lager uitvalt. Dit kan om diverse redenen het geval zijn, zoals een moleculaire tool die niet werkt of een orgaan dat niet/weinig EVs uitscheidt. Dit is echter niet vooraf op papier aan te passen, vandaar dat het aantal te genereren lijnen is ingeschat tussen de 30 en 60. Overigens valt het aantal ook gevoelsmatig hoger uit vanwege de nieuwe regelgeving omtrent het genereren van nieuwe lijnen die over 2 generaties gemonitord moeten worden en als mild ongerief ingeschat dienen te worden, ook al vindt er waarschijnlijk in 95% van de lijnen geen daadwerkelijk ongerief plaats. In Bijlage 2 is het mogelijk dat de aantallen tussen de verschillende experimenten kunnen schuiven, maar het totaal aantal gebruikte dieren gelijk blijft of inderdaad lager uitvalt. Omdat er meerdere werknemers binnen ons onderzoeksteam aan de proeven zullen werken is het niet direct in de lijn der verwachting dat de werkdruk te hoog zal zijn om alle proeven uit te voeren.*

E. Humane eindpunten: U verwacht 25% uitval bij de larven. Kunt u aangeven hoeveel uitval van de proefdieren u verwacht? Mogelijk dat de uitval van de proefdieren 0% is maar dan kunt u het percentage uitval van de dieren die niet onder de WOD vallen als mededeling vermelden voor de volledigheid.

Dat klopt inderdaad, de meeste uitval vindt doorgaans al vóór dag 5 plaats. Op of na dag 5 is dat naar verwachting tussen de 5 – 10%. Dit is nu gepreciseerd in de bijlagen.

F. Classificatie van ongerief: U geeft in de laatste alinea aan dat er geen cumulatief ongerief verwacht wordt. Zou het kunnen dat het hier om een misinterpretatie van het begrip 'cumulatief' gaat, aangezien er sprake is van meerdere handelingen en daardoor ook van cumulatief ongerief? Wilt u dit dan aanpassen?

In Bijlage 1 is aangegeven dat er verwacht wordt dat er geen cumulatief ongerief optreedt. De gedachte hierachter is dat de lijnen zelf uiteindelijk geen inherent ongerief zullen blijken te hebben (hoewel dat onder de nieuwe wetgeving wel als zodanig aangemerkt dient te worden, totdat na 2 gemonitorde generaties het tegendeel blijkt) en er dus geen ongerief van (bijvoorbeeld) de vinknip procedure bovenop komt. Natuurlijk ongerief (als gevolg van een niet aan het experiment gelinkte ziekte of orgaanfalen) kan ook voorkomen en dus ook "cumulatief" zijn met bijv. de vinknip, maar natuurlijk ongerief is niet experiment gebonden en deze vissen worden volgens de standaardprocedures al geëuthanaseerd.

In Bijlage 2 kan wel sprake zijn van cumulatief ongerief, zoals ingeschat in tabel 2.2. Hier stond in de tekst niets expliciet over de aan- of afwezigheid van cumulatief ongerief. Dat is nu

hersteld.

K. Bestemming van de dieren bij einde experiment: Kunt u in bijlage 1 beschrijven wat de bestemming van de dieren is? U heeft nu alleen 'nee' ingevuld?

In bijlage 1 gaat het om het genereren van nieuwe lijnen. Het genereren van een nieuwe lijn is technisch gezien het doel van het experiment, en het lange termijn doel is het in stand houden van de lijn. De dieren zullen daarom volgens standaard protocol worden aangehouden tot ~1,5 jarige leeftijd, en vervolgens worden geëuthanaseerd omdat de volgende generatie dan al aanwezig is. Dit is nu toegevoegd.

Bijlage 2

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: U verwijst naar Tabel 1.1 maar de DEC heeft de indruk dat deze tabel niet bestaat. Wilt u dit corrigeren?

Tabel 1.1 staat in bijlage 1; dat stond inderdaad niet overal goed aangegeven, maar is nu aangevuld.

F. Classificatie van ongerief

De DEC zou graag een overzicht met handelingen en het daarmee gepaard gaande ongerief zien om zo een goede ethische afweging te kunnen maken. De IvD kan u mogelijk hierbij ondersteunen. Ook het aantal malen dat en de frequentie waarmee eenzelfde dier een handeling ondergaat draagt bij aan de mate van ongerief.

Kunt u een onderscheid maken tussen de handelingen voor en na de dag dat de zebravissen onder de WOD vallen?

Het overzicht van de handelingen zijn nu ook in de vorm van een tijdslijn weergegeven (Figuren 2.2, 2.3 en 2.4). Tabel 2.1 geeft daarnaast de verschillende (combinaties) aan met de frequenties per dier. Procedure P4 wordt maximaal 5 keer per dier uitgevoerd in maximaal 100 vissen. De reden hiervoor is dat het juiste time-frame gevonden dient te worden om de precieze start van de behandelblokken (Figuren 2.2, 2.3 en 2.4) te bepalen.

Wat betreft gecombineerde procedures: er worden steeds maximaal twee procedures gecombineerd, namelijk P6 + P4/P5, P7 + P4/P5, P8 + P4/P5. De imaging (P4) in deze combinaties wordt in een beperkt aantal dieren (maximaal 10 per combinatie) twee keer gedaan om te bepalen wat de optimale tijd is om EV overdracht (P5) te meten. Dit is gedaan met oog op het verminderen van het totaal aantal dieren. Als de DEC voorkeur heeft voor het niet meerder malen imageren per dier, maar het gebruik van iets meer dieren is dat ook goed mogelijk en heeft dat geen nadelige gevolgen voor de haalbaarheid van het onderzoek.

De weergegeven aantallen in de tabellen gaan alleen over experimenten ná 120 uur (dag 5).

Er vindt meerdere malen anesthesie plaats. De herhaaldelijke verdoving en het weer bijkomen vindt de DEC ongerief voor de dieren. Wilt u aangeven hoe vaak de dieren verdoofd worden, de anesthesie benoemen als ongerief en meenemen in de classificatie en in het cumulatieve ongerief?

Voor de meeste (combinaties van) experimenten zal er slecht éénmaal anesthesie plaatsvinden. Voor de combinatie van P8+P4 zal er 2 tot 3 maal anesthesie plaatsvinden, wat neerkomt op matig ongerief. Dit is nodig voor pilot-experimenten waar op meerdere tijdstippen gemeten dient te worden, om het optimale tijdstip vast te stellen voor verdere experimenten. Hierbij

wordt een zorgvuldige afweging gemaakt tussen het gebruik van minder proefdieren en het ongerief per proefdier.

De hogere frequentie van de imaging (en daarmee herhaaldelijke verdoving) in een beperkt aantal vissen (~50) is dus gekozen zodat het totale aantal gebruikte vissen lager uit zal vallen. Maar dit zal ook verspreid worden over de dieren, zodat niet elk dier voor elk tijdstip verdoofd hoeft te worden. In de herziene versie heeft de aanvrager de frequentie van P4 per dier daarom van (maximaal) 5 naar (maximaal) 3 keer aangepast.

Heeft anesthesie effect op de voedselopname van de vissen? Wat zijn uw ervaringen hiermee?

Tijdens (volledige) anesthesie kunnen vissen geen voedsel opnemen uit de omgeving. De darmperistaltiek gaat wel door, en dus ook de opname/absorptie van voedingsstoffen van al opgenomen voeding.

Klopt het dat lijnen met ongerief niet worden aangehouden? Wilt u dit duidelijk vermelden of anderszins aangeven wat u met de lijn met ongerief gaat doen?

Lijnen met ongerief vanuit erfelijke aanleg zullen niet worden aangehouden, aangezien we het vergelijk tussen gezond en pathologie willen maken, en intrinsiek ongerief een verstoord beeld zal geven. Dit is nu specifiek benoemd onder Bijlage 1 punt D (om dat daar de te genereren lijnen worden beschreven).

In bijlage 2 staat bij K, bestemming: 'de NVWA heeft in overleg met de IvD aangegeven dat dieren ouder dan 12 maanden dienen te worden afgevoerd door euthanasie. Kunt u de overwegingen hierbij toelichten?

Deze afweging is gemaakt op basis van de volgende 2 overwegingen: 1) Vissen hebben hun piek in fertiliteit tussen 6 en 12 maanden, daarna neemt de vruchtbaarheid af alsmede de kwaliteit van het legsel. 2) Oudere vissen hebben vaak een verzwakt immuunsysteem. Hierdoor kunnen opportunistische infecties optreden. Pathogenen hebben hierdoor kans zich aan te passen en beter het immuunsysteem te leren omzeilen, en daardoor op termijn ook gezonde vissen met een normaal functionerend immuunsysteem te infecteren.

In de praktijk houden zorgen we ervoor dat rond 12 maanden er een nieuwe generatie is gestart. Als deze ook gezond en vruchtbaar blijkt te zijn, kunnen we vervolgens de eerste generatie euthanaseren. Dat gebeurt daarmee vaak rond de 18 maanden.

Niet Technische Samenvatting

De NTS is voor het grote publiek. Wilt u vakjargon en moeilijke woorden zoals in de titel, 'euthanasie' en 'vislijn' vervangen zodat de NTS ook voor leken leesbaar is? Bij de 'trefwoorden' geeft u uitleg maar deze uitleg hoort volgens de DEC niet bij de trefwoorden te staan. Dit moeten zoektermen zijn die een leek zou kunnen gebruiken.

Gedaan.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

9b. Correspondentie met de aanvrager

- Datum vragen: 30-09-2024
- Datum antwoord: 01-10-2024

Strekking gestelde vragen en antwoorden:

B. De dieren en de NTS: De aantallen zebravissen komen niet overeen. U vermeldt in de bijlagen 10200 dieren waarvan 8350 met licht en 1850 met matig ongerief vs. NTS 9000 dieren waarvan 7750 met licht en 1250 met matig ongerief. Wilt u de juiste aantallen vermelden en overeen laten komen?

Dat is inderdaad correct opgemerkt door de DEC en nu gecorrigeerd in de NTS.

F. Classificaties en ongerief. Bij de vraag "Geef per diersoort en behandelgroep het cumulatieve ongerief aan in percentages van het totale aantal dieren." ontbreken de percentages. Wilt u de percentages toevoegen?

Dat klopt inderdaad, die zijn nu in de tabel (2.2) weergegeven, en waar toepasselijk ook in de tekst.

U heeft de vraag "Heeft anesthesie effect op de voedselopname van de vissen?" beantwoord maar de vraag was door de DEC niet duidelijk gesteld. Het ging om het effect op de voedselopname van de vissen bij eventuele langdurige pijnbehandeling met lidocaïne. Kunt u aangeven wat het effect is?

Voor (totale) anesthesie zeker. Voor pijnbestrijding zonder verdoving (analgesie) is dit niet heel direct onderzocht, maar geeft de literatuur wel aan dat dit zeer waarschijnlijk niet het geval is. Wat namelijk bekend is, is dat pijnsensatie zelf een effect heeft op gedrag, waaronder ook gereduceerde voedselopname. Deze reductie wordt opgeheven door toepassing van analgesia zoals lidocaïne (PMID 29402345; 28424313), maar is getest in larven van minder dan 6 dagen oud, of kortdurende behandelingen van oudere dieren (< 1 dag). Er is dus kort samengevat geen direct onderzoek gedaan hiernaar waar vissen zonder pijn met en zonder lidocaïne behandeling zijn vergeleken, maar op korte termijn is het bekend dat negatieve effecten van pijn op voedselopname juist worden opgeheven.

- 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 zijn geen DEC-leden betrokken bij het betreffende project.

C. Beoordeling (inhoud):

1. De aanvraag is toetsbaar en heeft voldoende samenhang. Het betreft fundamenteel exploratief onderzoek naar de rol van extracellulaire blaasjes (*extracellulair vesicles* - EVs) in de fysiologie en pathofysiologie in zebravissen. Het gaat om een inventarisatie van welke extracellulaire blaasjes naar welke organen gaan, hoe de blaasjes daar aankomen en welke informatie (eiwitten) er in de blaasjes zit. Om dit te onderzoeken wordt een zebravismodel gebruikt met verschillende transgene lijnen (fok zonder ongerief). De functie van de EV's wil men o.a. achterhalen door de uitscheiding van de blaasjes te bestuderen bij gezonde dieren. Daarnaast zal de uitscheiding van

de EV's gevolgd worden bij zieke dieren: colonkanker en niet-alcoholische leververvetting. Hierbij wordt ook onderzocht naar welk orgaan de blaasjes gaan en welke signalen (signaalmoleculen) daarmee worden overgebracht.

2. Voor zover de DEC bekend, is er geen mogelijk tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de dierexperimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie, te weten fundamenteel onderzoek, sluit aan bij de hoofddoelstelling(en).

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het inventariserende project is *in vivo* nagaan welke extracellulaire blaasjes naar welke organen gaan, hoe de EV's daar aankomen en welke informatie (in de vorm van eiwitten) er in de EV's aanwezig is. Het uiteindelijke doel van het project is om meer begrip te krijgen over deze specifieke EV-communicatieroutes vanuit de lever en de darm naar andere organen in de zebrafissen in gezondheid, en ook bij experimenteel pathologische veranderingen. De DEC is van mening dat er een duidelijke relatie is tussen het directe en het uiteindelijke doel, en dat het doel gerechtvaardigd is in de context van het biologisch onderzoeksveld en de behoeften vanuit de gezondheidszorg.
5. De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn: de proefdieren, de onderzoekers, de (inter)nationale samenwerkingspartners en uiteindelijk de gezondheidszorg en haar patiënten. De zebrafissen en larven hebben er als proefdieren belang bij gevrijwaard te blijven van de dierproeven, de genetische modificatie en de euthanasie. Voor de individuele onderzoeker en de (inter)nationale samenwerkingspartners kan het van groot belang zijn om na jarenlang onderzoek en inzet op dit gebied aansprekende resultaten te boeken, maar in de uiteindelijke afweging kent de DEC daar weinig gewicht aan toe. Het is daarbij zeker van belang dat men een database t.a.v. EV-communicatie op wil stellen en via *open source* aan wetenschappers wil aanbieden, zodat de resultaten gedeeld kunnen worden. Ook de (inter)nationale wetenschappelijke samenwerking is volgens de DEC van essentieel belang, aangezien het om een snel evoluerend gebied gaat. De opgedane kennis in dit project kan nieuwe aanknopingspunten bieden voor (medicijn)onderzoek naar een therapie voor colonkanker of niet-alcoholische leververvetting, waardoor dit onderzoek van belang is voor de toekomstige gezondheidszorg en humane patiënten met deze ernstige en veelvoorkomende ziektes.
6. De aanvrager geeft niet aan nadelige effecten op het milieu te verwachten. De DEC ziet geen aanleiding om aan te nemen dat zich toch nadelige effecten zullen voordoen.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de ervaren onderzoeksgroep (met o.a. het zebravismodel, het visualiseren van EV's en het genereren van transgene lijnen) en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd en dragen eraan bij dat de doelstellingen behaald kunnen worden, dat aan de 3V-beginselen voldaan kan worden en dat voorkomen kan worden dat mens, dier en milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven.
8. Het project is goed opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen. De focus ligt op onderzoek naar eiwitten omdat men verwacht dat eiwitten een grote en essentiële rol spelen in het proces. Tevens heeft de onderzoeksgroep veel ervaring met proteomics. Men zou ook de rol van lipiden willen onderzoeken maar dat is in dit project niet haalbaar. De DEC onderschrijft deze keuze. De gekozen 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 EU richtlijn)
- Zwerfdieren (10h)
- Hergebruik (1e lid 2)
- Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
- Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
- Dodingsmethode niet volgens bijlage IV EU richtlijn (13c lid 3)

Voor dit onderzoek is het nodig om genetisch gemodificeerde zebravissen te genereren en aan te houden. De fok zal zonder ongerief zijn. Het aantal benodigde transgene lijnen is volgens de DEC voldoende toegelicht, evenals dat lijnen met ongerief vanuit erfelijke aanleg niet worden aangehouden, waarbij de kans op ongerief als gevolg van de ingebrachte transgenen zeer klein is.

10. De dieren worden in de aquariumfaciliteit niet geheel gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de EU-richtlijn. De dieren (bijlage 1) worden voor maximaal drie dagen individueel gehuisvest i.v.m. de benodigde genotypering (huidswabs), waarbij de zebravissen elkaar nog wel kunnen zien en ruiken. De DEC ziet de noodzaak hiervan in en vindt de termijn reëel.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. De transgene lijnen zijn nodig voor de aanhechtingseiwitten die het mogelijk maken om de eiwitten in de blaasjes zichtbaar te maken met behulp van fluorescerende stoffen,

waardoor zichtbaar wordt of het eiwit wel of niet in een bepaald orgaan terecht komt. Bij een klein deel van de dieren zal in verband met genotypering een huidswab of een vinknip uitgevoerd worden. De daarop volgende handelingen bestaan uit scannen (fluorescentie-microscoop), eiwitbepaling, het al dan niet induceren van darmkanker of niet-alcoholische leververvetting, xenotransplantatie van darmkanker, en anesthesie, waardoor licht tot matig ongerief ontstaat.

De DEC heeft doorgevraagd over de frequentie van anesthesie, omdat herhaaldelijke verdoving en bijkomen volgens de commissie ongerief veroorzaakt. De onderzoeker heeft de frequentie volgens de DEC voldoende onderbouwd en het ongerief juist geclassificeerd.

12. De integriteit van de dieren wordt met name fysiek aangetast door de huidswab of de vinknip, fluorescent-tracking, inducering van niet-alcoholische leververvetting of darmkanker, xenotransplantatie van darmkanker, (meermalige) anesthesie, en voor alle dieren uiteindelijk de vroegtijdige dood.
13. De humane eindpunten zijn voor iedere bijlage dierproeven goed gedefinieerd, en het percentage dieren, vallend onder de WOD, dat naar verwachting een humaan eindpunt bereikt is gering en goed ingeschat. Daarbij vinden zowel de onderzoekers als de DEC dat ook zorgvuldigheid betracht moet worden ten aanzien van embryo's/larven die nog niet onder de WOD vallen.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, zoals bijvoorbeeld multi-organ-on-a-chip-modellen. Naast de *in vivo* proeven worden *in vitro* proeven uitgevoerd om de mate van correlatie na te gaan, zodat mogelijk in toekomstig onderzoek minder proefdieren nodig zijn.
15. Het aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en er is een heldere strategie om ervoor te zorgen dat tijdens het project met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. De DEC realiseert zich dat voor dit onderzoek veel zebrafissen worden opgevoerd, maar vindt het aantal desondanks reëel. Vanaf dag 5 voeden de dieren zich zelfstandig en beginnen darm en lever echt goed te werken. Vanwege de metabole functie is de verwachting dat de biologisch relevante uitscheiding van de blaasjes na dag 5 begint.

De DEC heeft verder gediscussieerd over de noodzaak van de vele nieuwe transgene vislijnen, waardoor een groter aantal dieren benodigd is. De onderzoeker heeft volgens de DEC voldoende toegelicht dat deze lijnen noodzakelijk zijn om na te gaan welke specifieke markers nodig zijn om de EV's te visualiseren en te kunnen volgen. Het zebrafismodel wordt gebruikt omdat de juveniele stadia transparant zijn, waardoor de endogeen gevormde EV's onderzocht

kunnen worden (de natuurlijke secretie/uitscheiding van de blaasjes) waarvan de precieze functie nog niet bekend is. Men wil niet alleen de blaasjes volgen; om de functie te begrijpen moet men de blaasjes ook kunnen beïnvloeden, waarvoor de verschillende transgene lijnen noodzakelijk zijn.

Voor het creëren van nieuwe vislijnen wordt de pGLET-procedure gebruikt, wat volgens de onderzoeker mogelijk een besparing van maximaal 40% van de dieren op de klassieke methode oplevert. Men is hier al van uitgegaan bij de berekening van het benodigde aantal dieren. Een verdere vermindering van het aantal dieren hiervoor lijkt dan ook niet mogelijk.

16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project is zodanig opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Zo zal voor de genotypering bij de meeste dieren een huidswab worden afgenomen in plaats van de meer belastende vinknip.
17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Dieren van beide geslachten zullen in gelijke mate worden ingezet.
19. Transgene zebravissen ouder dan 12 maanden (bijlage 1) worden in verband met afnemende vruchtbaarheid en verhoogd risico op infecties gedood, evenals uiteindelijk de genetisch gemodificeerde dieren uit de lijnen. De ingezette (transgene) dieren voor bijlage 2 worden in het kader van het project gedood voor post-mortem histologisch onderzoek. De dieren worden op een passende wijze, in overeenstemming met bijlage IV van de EU richtlijn, gedood.
20. De vraag over hergebruik is niet van toepassing omdat de dieren gedood worden in het kader van het experiment.

NTS

21. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd, al blijft de materie begrijpelijkerwijs mogelijk complex voor 'leken'. Daarnaast wordt 'ongemak' vermeld waar 'ongerief' wordt bedoeld.

D. Ethische afweging

1. De morele vraag die de DEC dient te beantwoorden is of het belang van dit onderzoek, namelijk exploratief *in vivo* onderzoek naar de rol van extracellulaire blaasjes in de fysiologie en pathofysiologie in (transgene) zebravissen, de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de gebruikte proefdieren rechtvaardigt.

2. Er vindt een aantasting van welzijn en integriteit van maximaal 10.200 proefdieren plaats, waarvan 8.350 zebavissen licht en 1.850 zebavissen matig ongerief zullen ervaren. Het genereren en onderhouden van de benodigde transgene zebavislijnen betreft fok zonder ongerief. Deze dieren zijn ook geïncubeerd in de aanvraag, omdat elke nieuwe genetische lijn twee generaties opgevolgd moeten worden om eventueel ongerief in kaart te brengen. Lijnen die dan aangemerkt moeten worden als 'fok met ongerief' zullen niet worden aangehouden of gebruikt. Het genereren van een groot aantal nieuwe lijnen valt onder vergunningplichtige dierproeven. De dieren hiervoor, en voor de opvolging van de eerste twee generaties nakomelingen ter vaststelling van mogelijk ongerief, zijn in de aanvraag opgenomen. Lijnen die aangemerkt moeten worden als 'fok met ongerief' zullen niet aangehouden of gebruikt worden.

De DEC realiseert zich dat er al veel onderzoek gedaan wordt t.a.v. communicatie vanuit en tussen organen, maar ziet zeker de meerwaarde en vernieuwende kracht van dit onderzoek. Indien de hierboven genoemde doelstellingen behaald worden, dan zal dit project ertoe bijdragen dat meer inzicht verkregen wordt in de signaalfunctie van extracellulaire blaasjes in de complexe *in vivo* situatie. Dit kan mogelijk nieuwe aanknopingspunten bieden voor verder (medicijn)onderzoek t.a.v. van veelvoorkomende ernstige humane ziektes zoals colonkanker en niet-alcoholische leververvetting. Het is aannemelijk dat de fundamentele doelstelling behaald zal worden. Daarvoor is de inzet van een grote hoeveelheid proefdieren noodzakelijk, maar de onderzoekers doen al het mogelijke om het ongerief voor de dieren en het aantal dieren tot een minimum te beperken.

3. Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat het in kaart brengen van specifieke EV-communicatieroutes vanuit de lever en de darm naar andere organen en de inventarisatie van signalen die daarbij worden overgebracht in gezonde zebavissen en onder experimenteel geïnduceerde pathologische omstandigheden, een substantieel belang vertegenwoordigt, en dat dit belang opweegt tegen de aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren. De relatie tussen het directe en het uiteindelijk doel is voldoende helder. Het is aannemelijk dat de directe doelstelling behaald zal worden. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. 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 er geen sprake zal zijn van onbedoelde negatieve effecten voor mens, dier en milieu als gevolg van de dierproeven. Het gebruik van de proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is daarmee 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 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/dilemma's naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies.



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

Universiteit Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0800 789 0789
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD10800202418274

Bijlagen

2

Datum 2 augustus 2024

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 2 augustus 2024. Het gaat om uw project "De rol van extracellulaire blaasjes in de regulatie van orgaanhomeostase.". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD10800202418274. 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, stuur een e-mail naar info@zbo-ccd.nl of neem telefonisch contact met ons op: 0800 789 0789.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:

2 augustus 2024

Aanvraagnummer:

AVD10800202418274



Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10800
Naam instelling of organisatie: Universiteit Utrecht
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]
Postbus: 12007
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: Assistant Professor
Afdeling: Biologie
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 september 2024
Geplande einddatum: 30 augustus 2028
Titel project: De rol van extracellulaire blaasjes in de regulatie van orgaanhomeostase.
Titel niet-technische samenvatting: De rol van extracellulaire blaasjes in de regulatie van orgaanhomeostase.
Naam DEC: DEC Utrecht
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.937,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting

Ondertekening

Naam:

[Redacted]

Functie:

[Redacted]

Plaats:

Utrecht

Datum:

25 juli 2024



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

UU-ASC
Postbus 80.011
3508 TA UTRECHT


**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0800 789 0789
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD10800202418274
Bijlagen
2

Datum 2 augustus 2024
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur
Factuurdatum: 2 augustus 2024
Vervaldatum: 1 september 2024
Factuurnummer: 2418274
Ordernummer: CB.841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD10800202418274	€ 1.937,00

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 te 's Gravenhage.

From: info@zbo-ccd.nl
To: [Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht](#); [CvB postmap \(UBD BS\)](#)
Cc: dec-utrecht@umcutrecht.nl
Subject: Aanhouden AVD10800202418274
Date: dinsdag 15 oktober 2024 09:31:32

CAUTION: This email originated from outside of Utrecht University. Do not click links or open attachments unless you recognize the sender and know the content is safe.

Geachte [REDACTED]

Op 02-08-2024 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "De rol van extracellulaire blaasjes in de regulatie van orgaanhomeostase" met aanvraagnummer AVD10800202418274. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht 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

U heeft uw NTS ingediend in een Word format. Kunt u uw herziene NTS indienen in het daarvoor bestemde Excel bestand?

U vraagt een projectduur aan van vier jaar, zoals genoemd in uw aanvraagformulier. In uw NTS noemt u een projectduur van 60 maanden. Kunt u dit in overeenstemming brengen?

In uw NTS verwijst u op enkele plekken naar de bijlagen dierproeven. De bijlagen dierproeven zijn niet inzichtelijk voor het algemeen publiek. Kunt u deze verwijzingen verwijderen?

In uw NTS spreekt u over het euthanaseren of inslapen van de dieren. De CCD vindt dat het woord doden een beter beeld geeft bij wat er met de dieren gebeurt. Kunt u 'euthanasie' en 'laten inslapen' aanpassen in 'doden'?

In uw NTS onder de kop 'Vervanging' gebruikt u de term 'multi-organ-on-a-chip'. Deze term zal voor het algemene publiek lastig navolgbaar zijn. Kunt u deze term aanpassen of uitleggen?

Onduidelijkheden

De titels van de bijlagen dierproeven komen niet overeen met de titels van de bijlagen genoemd in de tabel onder 3.4.3 van het projectvoorstel. Kunt u deze in met elkaar overeenstemming brengen?

In bijlage 3.4.3.1 onder 'F. Classificatie van ongerief' mist een benoeming van het ongerief dat de dieren ondergaan. Kunt u hier in percentages aangeven welke mate van cumulatief ongerief bij de dieren zal worden verwacht?

Kunt u daarnaast ook in bijlage 3.4.3.2 de percentages cumulatief ongerief weergeven onder F.?

In bijlage 3.4.3.1 onder 'K. Bestemming van de dieren bij einde experiment' noemt u dat

de dieren zullen worden gedood in het kader van de proef. Kunt u aangeven onder K. of er een methode van doden uit bijlage IV van de richtlijn 2010/63/EU wordt toegepast en zo ja, welke?

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 dit bericht op. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

Wanneer een beslissing

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

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,
Namens de Centrale Commissie Dierproeven



www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

.....
T: 0800 789 0789
E: info@zbo-ccd.nl

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.

The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.



Geadresseerde

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 93118
2509 AC
Den Haag

Afzender

[Redacted]

Bezoekadres

Dept. of Cell Biology, Neurobiology &
[Redacted]
Utrecht

Telefoon

E-mail

Website

[Redacted]

Datum

30-03-2024

Onderwerp

Rebuttal CCD commentaar op
AVD10800202418274

Geachte Centrale Commissie Dierproeven,

Hartelijk dank voor het in ter beoordeling nemen van het project "De rol van extracellulaire blaasjes in de regulatie van orgaanhomoeostase" met aanvraagnummer AVD10800202418274. In uw correspondentie op 25 Oktober 2024 geeft u aan enkele onduidelijkheden te zijn tegengekomen in de aanvraag. Bijgaand vindt u de beantwoording op de door u opgeworpen vragen.

Met vriendelijke groet,

[Redacted signature block]



REBUTTAL

In bijlage 3.4.3.1 onder 'F. Classificatie van ongerief' noemt u dat de dieren geen (0%) cumulatief ongerief ervaren. Dit is echter geen juiste inschatting, gezien de dieren licht of matig ongerief ervaren en daarmee cumulatief licht tot matig ongerief ervaren. Kunt u deze inschatting aanpassen?

Dit is aangepast.

De aantallen dieren genoemd in bijlage 3.4.3.2 onder 'B. De dieren' en 'F. Classificatie van ongerief' komt niet overeen. Kunt u dit in overeenstemming brengen en tevens de NTS hierop in overeenstemming brengen?

In bijlage 3.4.3.2 worden onder B 3000 dieren opgevoerd. Onder F worden deze 3000 opgesplitst over de procedures zowel in de tekst als in de tabel (2.2). Het totaal blijft hierbij op 3000. Dit is in overeenstemming met de NTS, waar gesproken wordt over 1200 vissen (niet ziekte modellen) en 1800 vissen (ziekt modellen), totaal ook 3000 voor het tweede deel.

Zo komen we bij 3.4.3.1 uit op 6840 vissen met licht ongerief en 360 met matig ongerief, en in 2.4.3.2 op 1150 vissen met licht ongerief en 1850 met matig ongerief. In totaal is dat 7990 vissen met licht en 2210 vissen met matig ongerief, wat samen op 10200 komt. Dit stond daarmee foutief in de NTS, en is nu gecorrigeerd.



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

Universiteit Utrecht

[Redacted]

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0800 789 0789
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD10800202418274

Bijlagen

3

Datum 4 november 2024

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [Redacted]

Op 2 augustus 2024 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "De rol van extracellulaire blaasjes in de regulatie van orgaanhomeostase" met aanvraagnummer AVD10800202418274. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het is toegestaan om uw project uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. Deze vergunning wordt afgegeven voor de periode van 4 november 2024 tot en met 30 augustus 2028.

De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.

Procedure

Advies dierexperimentencommissie

Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie DEC Utrecht (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 8 oktober 2024. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

Nadere vragen aanvrager

Op 15 oktober 2024 en 25 oktober 2024 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op de genoemde projectduur, verwijzingen naar de bijlagen dierproeven en het gebruik van vakjargon in de NTS, de benoemde titels van de bijlagen in het projectvoorstel en de benoeming van het ongerief en het lot van de dieren beschreven in de bijlage dierproeven. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Datum:

4 november 2024

Aanvraagnummer:

AVD10800202418274

Overwegingen

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

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 93118, 2509 AC 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. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisende situatie.

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 vergunninghouder valt.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl, stuur een e-mail naar info@zbo-ccd.nl of neem telefonisch contact met ons op: 0800 789 0789.

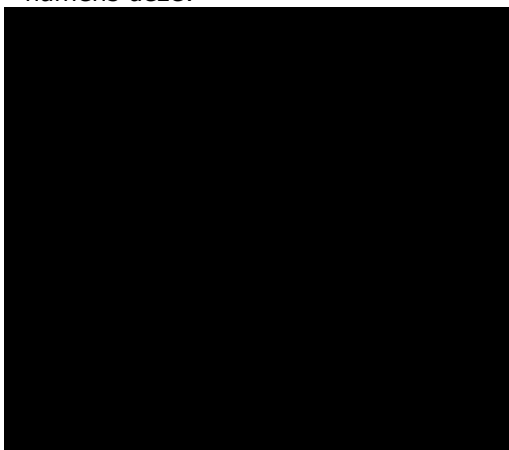
Datum:

4 november 2024

Aanvraagnummer:

AVD10800202418274

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

**Bijlagen:**

- Projectvergunning
- 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 Utrecht
Adres: Postbus 12007
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT
Deelnemersnummer: 10800

deze projectvergunning voor het tijdvak 4 november 2024 tot en met 30 augustus 2028, voor het project "De rol van extracellulaire blaasjes in de regulatie van orgaanhomeostase" met aanvraagnummer AVD10800202418274, na advies van dierexperimentencommissie DEC Utrecht. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Assistant Professor. Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 2 augustus 2024
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 30 oktober 2024;
 - b Bijlagen dierproeven
 - 3.4.3.1 Genereren van transgene lijnen nodig ter beantwoording van de onderzoeksvragen, zoals ontvangen op 30 oktober 2024;
 - 3.4.3.2 Behandeling en euthanasie t.b.v. weefseldonatie voor analyse extracellulaire blaasjes (EV) overdracht tussen organen van genetisch gemodificeerde zebravissen, zoals ontvangen op 30 oktober 2024;
 - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 30 oktober 2024;
 - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 8 oktober 2024
 - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 23 oktober 2024, 30 oktober 2024.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
3.4.3.1 Genereren van transgene lijnen nodig ter beantwoording van de onderzoeksvragen			
	Zebravissen (Danio rerio) / AB	7.200	6,2% Matig 93,8% Licht
3.4.3.2 Behandeling en euthanasie t.b.v. weefseldonatie voor analyse extracellulaire blaasjes (EV) overdracht tussen organen van genetisch gemodificeerde zebravissen			
	Zebravissen (Danio rerio) / AB	3.000	46,7% Matig 53,3% Licht

Aanvraagnummer: AVD10800202418274

Geldende voorschriften

Wij wijzen u op onderstaande geldende voorschriften, die volgen uit artikel 1d, vierde lid, artikel 10, eerste lid en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.
- Het is verboden een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.



Aanvraagnummer:

AVD10800202418274

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, derde lid van de wet. Uit artikel 10b, eerste lid van de wet 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, eerste lid van de wet de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven. Artikel 10b, tweede en derde lid van de wet schrijven 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 van de wet 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

Aanvraagnummer:
AVD10800202418274

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

Einde van een dierproef

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of 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 van de wet moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

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

In artikel 13d van de wet 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.