



Utrechtse Wetenschapswinkels,
voor maatschappijgericht onderzoek

De muis achter het transgene diermodel

Sanne Jense

P-UB-2005-01

Wetenschapswinkel Biologie
Afdeling Proefdierkunde, Universiteit Utrecht

De muis achter het transgene diermodel

Een inventarisatie van de gezondheids- en welzijnsschade bij het maken van transgene muizen.

Sanne Jense

Wetenschapswinkel Biologie, Universiteit Utrecht

Hoofdafdeling Dier, Wetenschap en Maatschappij, afdeling Proefdierkunde, Universiteit Utrecht

januari 2005

P-UB-2005-01

Colofon

<i>Rapportnummer</i>	P-UB-2005-01
<i>ISBN</i>	90-5209-146-3
<i>Prijs</i>	€ 6,20
<i>Verschenen</i>	januari 2005
<i>Druk</i>	eerste
<i>Titel</i>	De muis achter het transgene diermodel <i>Een inventarisatie van de gezondheids- en welzijnsschade bij het maken van transgene muizen.</i>
<i>Auteur</i>	Sanne Jense
<i>Uitgever</i>	Wetenschapswinkel Biologie, Universiteit Utrecht Padualaan 8, 3584 CH Utrecht. tel. 030-2537363 www.bio.uu.nl/wetenschapswinkel
<i>Begeleiders</i>	Prof. dr. V. Baumans en dr. P. van Loo, Hoofdafdeling Dier, Wetenschap en Maatschappij, afdeling Proefdierkunde, Universiteit Utrecht
<i>Projectcoördinator</i>	ir. M.A. Vaal, Wetenschapswinkel Biologie, Universiteit Utrecht
<i>Opdrachtgever</i>	drs. F.P. Wassenberg, Vereniging Proefdiervrij, Den Haag
<i>Illustratie omslag</i>	Proefdieren in de mist, Bas Kijzers, Copyright Vereniging Proefdiervrij
<i>Vormgeving omslag</i>	Frouke Kuijer, afdeling Beeldverwerking en Vormgeving, Universiteit Utrecht
<i>Reproductie</i>	Repro FSB, Universiteit Utrecht
<i>Copyright</i>	Het is niet toegestaan (gedeelten van) deze uitgaven te vermenigvuldigen door middel van druk, fotokopie, microfilm of op welke andere wijze dan ook. Overname van gedeelten van de tekst, mits met bronvermelding, is wel toegestaan. Toezending van een bewijsexemplaar wordt zeer op prijs gesteld.

Inhoudsopgave

Voorwoord	5
Samenvatting	7
1 Inleiding	9
1.1 <i>introdunctie</i>	9
1.2 <i>aanleiding en doelstellingen</i>	10
1.3 <i>onderzoeksvragen en afbakening</i>	11
2 De CBD-procedure	13
2.1 <i>de oprichting van de Commissie Biotechnologie bij Dieren (CBD)</i>	13
2.2 <i>wat is de CBD en hoe gaat ze te werk?</i>	13
2.3 <i>het welzijns gedeelte van de beoordeling</i>	14
3 Technieken in de biotechnologie	17
3.1 <i>het creëren van transgene muizen</i>	17
3.2 <i>pronucleaire microinjectie</i>	17
3.3 <i>embryonale stamcelinjectie</i>	19
3.4 <i>andere technieken</i>	21
4 Transgenese: gevolgen voor de muis	23
4.1 <i>oorzaken van welzijnsschade</i>	23
4.2 <i>welzijnsschade als gevolg van de technieken</i>	24
4.3 <i>welzijnsschade als gevolg van de genetische verandering</i>	29
4.4 <i>vervolgschade</i>	30
4.5 <i>de beschikbaarheid van kennis over de Nederlandse situatie</i>	31

5	Conclusies en aanbevelingen	33
5.1	<i>de resultaten van het onderzoek</i>	33
5.2	<i>de beschikbare informatie en de lacunes daarin</i>	33
5.3	<i>monitoring van effecten en verzameling van kennis in databanken</i>	36
5.4	<i>uitbreiding vragenlijst schade-effectrapportage (SER)</i>	37
5.5	<i>alle aanbevelingen samengevat</i>	39
	Woordenlijst	41
	Literatuurlijst	44
	Bijlagen	48
	<i>Bijlage 1 de welzijnsvragen op het aanvraagformulier, inclusief toelichting</i>	48
	<i>Bijlage 2 lijst van geïnterviewden en interview</i>	50

Voorwoord

Mijn interesse binnen de biologie ligt met name op het gebied van de wetenschapscommunicatie. Het schrijven van dit rapport sloot daar voor mijn gevoel heel goed op aan: niet alleen moest ik zo schrijven dat het ook voor leken leesbaar bleef, maar daarnaast heb ik ervaren hoe het voelt om een soort tolk te zijn tussen de wetenschap en een maatschappelijke organisatie.

Een onderzoek over welzijn van proefdieren is vaak een gevoelige kwestie, helemaal als de opdrachtgever een dierenbelangenorganisatie is. Dankzij de begeleiding door Proefdierkunde, en daarmee mijn positie binnen de wetenschappelijke wereld, is alles gelukkig soepel verlopen.

Ik wil ten eerste natuurlijk alle vijf mijn begeleiders bedanken: dr. Pascalle van Loo en prof. dr. Vera Baumans, beiden van de afdeling Proefdierkunde, ir. Manon Vaal van de Wetenschapswinkel Biologie en drs. Frank Wassenberg en mr. Valentijn Wösten namens de Vereniging Proefdiervrij. Bedankt voor alle hulp en ideeën, en voor jullie vele en zeer nuttige commentaar.

Daarnaast bedank ik alle geïnterviewden voor hun medewerking: prof. dr. Tjard De Cock Buning, dr. Martje Fentener van Vlissingen, dr. Marco Hoekman, drs. Janne Kuil, dr. Mirjam van der Meer, ir. Kees van Reenen en prof. dr. Bert van Zutphen.

Sanne Jense

Utrecht, januari 2005

Samenvatting

Wanneer een onderzoeker in Nederland transgene dieren wil 'maken', moet deze hiervoor een vergunning aanvragen bij de minister van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit. De minister wordt over het al of niet verlenen van een vergunning geadviseerd door de Commissie Biotechnologie bij Dieren (CBD). Een onderzoeker geeft in zijn aanvraag onder andere een inschatting van de gezondheids- en welzijnseffecten op de dieren van de voorgenomen handelingen. Volgens de Vereniging Proefdiervrij worden er in de vergunningspraktijk onvoldoende eisen aan deze inschatting gesteld. Zij mist in de beantwoording van dit gedeelte van het aanvraagformulier de schade-effectrapportage waar de wet om vraagt. Door de Wetenschapswinkel Biologie van de Universiteit Utrecht is, in samenwerking met de Afdeling Proefdierkunde van dezelfde universiteit, voor Proefdiervrij een onderzoek uitgevoerd met de volgende centrale vraagstelling:

Welke eisen kunnen er redelijkerwijs, gelet op de thans beschikbare dan wel te ontwikkelen kennis, aan een effectrapportage ten behoeve van een vergunningsaanvraag voor het maken van transgene dieren gesteld worden, om maximaal inzicht te krijgen in de effecten van de handelingen op de dieren, waaronder in hoofdzaak de effecten op gezondheid en welzijn?

Naast het beantwoorden van deze vraag zijn ook aanbevelingen gedaan om een betere bundeling en beschikbaarheid van reeds bekende informatie over ongerief bij transgene dieren tot stand te brengen.

Voor de beantwoording van deze vraag en het opstellen van de aanbevelingen is een uitgebreide literatuurstudie uitgevoerd en zijn interviews afgenomen met acht Nederlandse deskundigen op het gebied van dierproeven.

Onderzocht is hoe de schade-effectrapportage bij vergunningsaanvragen op dit moment plaatsvindt, welke technieken er gebruikt worden om transgene dieren (meestal muizen) te maken, wat er over deze technieken bekend is wat betreft gezondheids- en welzijnseffecten en wat er nog aan kennis ontbreekt.

Uit de analyse van acht recent door de CBD behandelde aanvraagformulieren blijkt dat de schade-effectrapportage waar de wet om vraagt op dit moment inderdaad onvoldoende plaatsvindt. Deels ligt dat echter aan de manier waarop de vraag naar gezondheids- en welzijnseffecten nu geformuleerd is: het is voor de onderzoeker niet duidelijk genoeg wat het ministerie van LNV precies wil weten.

Uit de literatuurstudie naar de verschillende technieken om transgenen te maken en de gezondheids- en welzijnseffecten van die technieken is gebleken dat er wel degelijk informatie bestaat die nu vaak ontbreekt, maar die wel gegeven zou kunnen worden.

Enkele voorbeelden daarvan zijn: de aantallen niet-transgene dieren die gebruikt worden om een transgeen dier te creëren en hun ongeriefcores; de schade die dieren later kunnen ondervinden als gevolg van de *in vitro* manipulatie van het embryo; de intentionele schade als gevolg van het gebruikte genconstruct.

De kennis over (de omvang van) veel van de mogelijke schade bij transgenen is (nog) zeer beperkt. Er bestaan echter genoeg mogelijkheden om deze kennis, ook op korte termijn, uit te breiden.

Uiteindelijk zijn aanbevelingen opgesteld, waarvan dit de belangrijkste zijn:

Het is wenselijk dat de minister van LNV de CBD opdracht geeft om

- een uitgebreidere maar ook veel specifiekere vragenlijst in te voeren in plaats van de huidige vraag naar gezondheids- en welzijnseffecten op het aanvraagformulier.
- een lijst op te stellen met mogelijke verfijningen voor elk onderdeel van een techniek, die bij elke aanvraag naast het formulier gelegd kan worden.
- een terugkoppeling te maken van de verzamelde welzijnsgegevens, na afloop van een onderzoek.

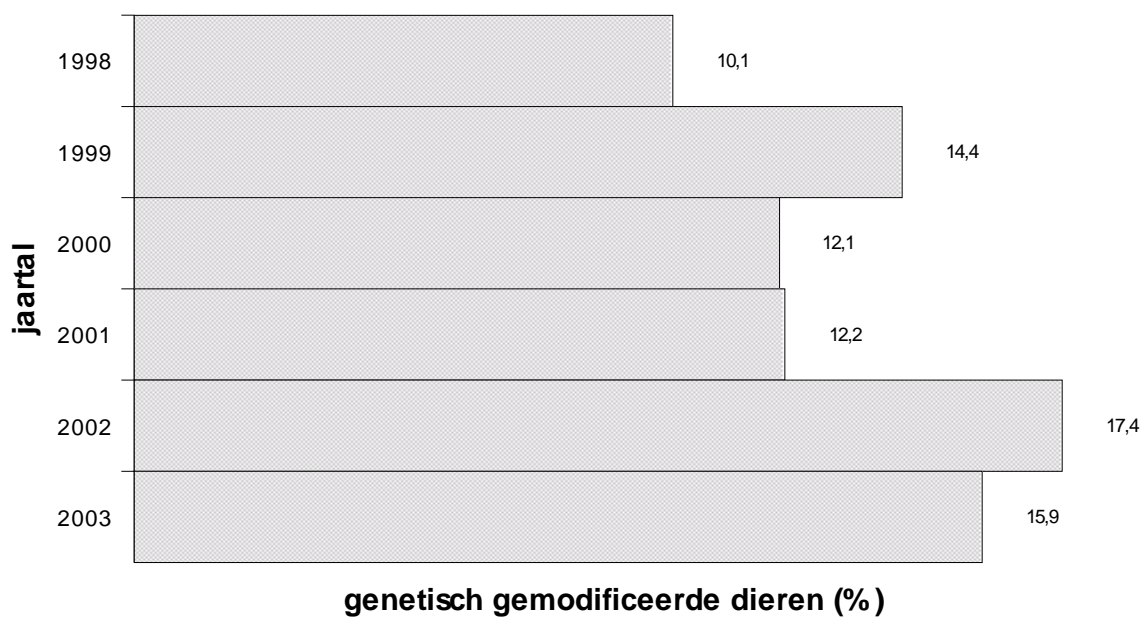
Het is wenselijk dat de overheid

- een nationaal programma opzet voor de monitoring van bestaande transgene lijnen.
- gericht onderzoek (zo nodig) faciliteert en stimuleert om de kennis te vergroten over de mogelijke risico's bij transgenese en de incidentie ervan.
- de resultaten van de bovenstaande twee projecten en/of de tijdens het onderzoek verzamelde welzijnsgegevens beschikbaar maakt in een openbare databank.

Inleiding

1.1 introductie

Transgene diermodellen spelen een steeds grotere rol in het biomedische onderzoek. Ongeveer een zesde van alle in 2003 in Nederland gebruikte proefdieren waren genetisch gemodificeerde (transgene) dieren, zie Figuur 1.1. Het maken van transgene dieren heeft een andere status dan 'conventionele' dierproeven, omdat het ingrijpen in het DNA van een organisme als extra ethisch probleem wordt beschouwd. De Tweede Kamer wil hierover de maatschappelijke discussie op gang houden. Vandaar dat gekozen is voor een openbare procedure voor de vergunningsaanvraag, in tegenstelling tot de vertrouwelijke procedure die geldt voor het aanvragen van dierproeven in het algemeen. Deze vergunningsplicht geldt overigens alleen voor het maken van een *nieuwe* transgene lijn. Bij experimenten met al bestaande transgene lijnen wordt de vertrouwelijke procedure gevolgd.



Figuur 1.1

Aandeel van de genetisch gemodificeerde dieren ten opzichte van het totaal aantal gebruikte dieren. Het totale aantal dierproeven in 2003 was 620.875 [Voedsel en Waren Autoriteit, 2003].

Wanneer een onderzoeker in Nederland transgene dieren wil 'maken', moet deze hiervoor een vergunning aanvragen bij de Minister van Landbouw, Natuurbeheer en Voedselkwaliteit (LNV). De minister laat zich voor het nemen van de beslissing om al dan niet een vergunning te verlenen, adviseren door de Commissie Biotechnologie bij Dieren (CBD). Om tot een oordeel te komen over de aanvaardbaarheid van de genetische ingreep, dient door de onderzoeker een aanvraagformulier ingevuld te worden, waarin hij/zij¹ een inschatting maakt van de te verwachten effecten van de handelingen op de te maken transgene dieren, waaronder ook de effecten op gezondheid en welzijn van de dieren.

Volgens de Vereniging Proefdiervrij worden er in de vergunningspraktijk onvoldoende eisen aan deze inschatting gesteld. Zij mist in de beantwoording van dit gedeelte van het formulier de schade-effectrapportage waar de wet om vraagt. Proefdiervrij wil graag antwoord op de vraag welke gegevens, gelet op de beschikbare en toegankelijke informatie, van de vergunningsaanvragers gevraagd kunnen worden, zodat van een zorgvuldige en samenhangende rapportage van de effecten van de handelingen op de dieren gesproken kan worden.

1.2 aanleiding en doelstellingen

1.2.1 de aanleiding van het onderzoek

Er zijn eerder al wel enkele rapporten geschreven over het functioneren van de CBD [bijvoorbeeld: van Vliet en Tillie 2000; Paula, 2001] en de onderliggende wetgeving. Deze hebben echter alle als thema ofwel het bestuurlijk functioneren van de commissie ofwel de ethische afweging.

De welzijnsbeoordeling daarentegen wordt in deze rapporten als vanzelfsprekend afgedaan. Deze wordt blijkbaar gezien als het niet-controversiële gedeelte van de beoordeling en het functioneren ervan wordt niet in twijfel getrokken. Dat laatste is echter precies wat Proefdiervrij nu wel wil doen. Zij gelooft dat juist op dit terrein de procedure zorgvuldiger kan.

De vraag of en zo ja hoe dit gerealiseerd zou kunnen worden, werd bij de Wetenschapswinkel Biologie van de Universiteit Utrecht neergelegd. Deze accepteerde het project en vond medewerking bij de Hoofdafdeling Dier, Wetenschap en Maatschappij, afdeling Proefdierkunde van de faculteit Diergeneeskunde voor de wetenschappelijke begeleiding van het project.

1.2.2 probleemstelling

Artikel 66 van de Gezondheids- en Welzijnswet voor Dieren (GWD) stelt vast dat een vergunning verplicht is voor biotechnologische handelingen bij dieren. Artikel 67 stelt:

Artikel 67

1. Bij een aanvraag voor een vergunning als bedoeld in artikel 66 dient in ieder geval te worden overgelegd:

a. een overzicht van de handelingen welke de aanvrager voornemens is te verrichten dan wel te laten verrichten;

b. een door of vanwege de aanvrager opgestelde rapportage ter zake van de effecten van de handelingen op dieren, waaronder begrepen de gezondheid en het welzijn van dieren. (cursief van de auteur)

¹ Verder (voor de leesbaarheid) aangeduid als 'hij'.

2. Onze Minister (van LNV, auteur) stelt regelen omtrent het indienen van een aanvraag en omtrent de behandeling daarvan. Daarbij kan onder meer worden bepaald:

- a. welke gegevens en bescheiden moeten worden overgelegd alvorens een aanvraag in behandeling kan worden genomen;
- b. dat een aanvraag eerst in behandeling wordt genomen nadat een daarvoor vastgesteld bedrag is voldaan;
- c. welke kosten van het onderzoek, voortvloeiend uit een aanvraag, ten laste van de aanvrager worden gebracht;
- d. in welke gevallen een aanvraag voor een vergunning niet ontvankelijk wordt verklaard.

Het onderwerp van dit onderzoek is dus hoe het antwoord op de vraag onder 1.b. in de praktijk ingevuld moet worden. Volgens de rest van dit artikel 67 worden de vereisten van zo'n rapportage door de minister vastgesteld. Volgens Proefdiervrij is dat nu nog niet voldoende het geval. De situatie op dit moment is dat zo'n rapportage wel verplicht is, maar dat er verder geen expliciete eisen aan gesteld worden.

1.2.3 doelstelling van dit onderzoek

Op basis van de hierboven genoemde vragen en problemen, was het doel van dit onderzoek antwoord te geven op de volgende vraag:

Welke eisen kunnen er redelijkerwijs, gelet op de thans beschikbare dan wel te ontwikkelen kennis, aan een effectrapportage ten behoeve van een vergunningsaanvraag voor het maken van transgene dieren gesteld worden om maximaal inzicht te krijgen in de effecten van de handelingen op de dieren, waaronder in hoofdzaak de effecten op gezondheid en welzijn?

Naast het beantwoorden van deze vraag zijn ook aanbevelingen gedaan om een betere bundeling en beschikbaarheid van reeds bekende informatie over ongerief bij transgene dieren tot stand te brengen.

1.3 onderzoeksvragen en afbakening

1.3.1 onderzoeksvragen

De probleemstelling is verder uitgewerkt in de volgende onderzoeksvragen. Voor de beantwoording is gebruik gemaakt van een uitgebreide literatuurstudie en van interviews met acht Nederlandse deskundigen op het gebied van dierproeven.

Betreffende de welzijnseffecten van de toegepaste technieken:

- Welke technieken worden gebruikt om transgene dieren te maken?
- Welke welzijnseffecten en fysiologische en gedragseffecten hebben de technieken, die worden gebruikt om transgene dieren te maken, op de dieren?
- Hoe groot is de onzekerheid omtrent de effecten van de toegepaste biotechnologische technieken?
- Hoe worden de welzijnseffecten van de toegepaste technieken momenteel gerapporteerd bij een vergunningsaanvraag, in welke mate, en is er eenduidigheid in de rapportage?

- Welke aanvullende informatie over ongerief veroorzaakt door de biotechnologische technieken kan redelijkerwijs in een schade-effectrapportage worden meegenomen?
- Welke aanbevelingen kunnen worden gedaan om de welzijnseffecten van de toegepaste technieken beter te rapporteren in de schade-effect rapportage?

Betreffende de welzijnseffecten van genexpressie:

- Wat voor welzijnseffecten en fysiologische en gedragseffecten kan genexpressie op de transgene dieren hebben?
- Hoe groot is de onzekerheid omtrent de welzijnseffecten van genexpressie bij transgene dieren?
- Hoe worden de welzijnseffecten van genexpressie bij transgene dieren momenteel gerapporteerd bij een vergunningsaanvraag, in welke mate, en is er eenduidigheid in de rapportage?
- Welke aanvullende informatie over ongerief door genexpressie kan redelijkerwijs in een schade-effectrapportage worden meegenomen?
- Welke aanbevelingen kunnen er worden gedaan om de welzijnseffecten van de genexpressie beter te rapporteren in de schade-effect rapportage?

Betreffende de bundeling en centralisatie van gegevens over het welzijn van transgene dieren:

- Welke aanbevelingen kunnen er gedaan worden voor het bundelen en centraliseren van de gegevens over het welzijn van transgene dieren zodat deze voor alle partijen beter beschikbaar zijn?
- Welke partijen kunnen een rol spelen in deze bundeling en centralisatie?

1.3.2 afbakening

Dit onderzoek richt zich slechts op de vragen die onderdeel zouden moeten uitmaken van een schade-effectrapportage die aan het CBD overlegd moet worden als onderdeel van het 'Aanvraagformulier vergunning Besluit biotechnologie bij dieren' [CBD, 2004]. Er is niet gekeken naar de verdere aanvraagprocedure, er is geen onderzoek gedaan naar het afwegen van de belangen van het proefdier tegen de maatschappelijke belangen en er is geen onderzoek naar juridische aspecten gedaan. De uiteindelijke aanbevelingen zijn gebaseerd op de informatie over het welzijn van transgene dieren die beschikbaar is en redelijkerwijs in een schade-effectrapportage opgenomen zou kunnen worden, en niet op een ethische analyse.

Het zwaartepunt van het onderzoek ligt, gezien de actuele situatie in Nederland, bij de effecten van de biotechnologische technieken op muizen. Gegevens over effecten op andere dieren (zoals ratten en landbouwhuisdieren) maken ook onderdeel uit van het onderzoek, aangezien over deze diersoorten aanzienlijk meer welzijnsgegevens beschikbaar zijn. De aandacht daarvoor beperkt zich echter tot die gegevens die relevant (kunnen) zijn voor onderzoek waarbij muizen zijn betrokken.

Ongewervelden zijn in dit onderzoek buiten beschouwing gelaten. Wat betreft technieken is klonen niet onderzocht (behalve de aspecten ervan die ook relevant zijn voor de andere technieken), omdat dit in Nederland op dit moment niet gebeurt en om het onderzoek niet onnodig complex te maken.

De CBD-procedure

2.1 de oprichting van de Commissie Biotechnologie bij Dieren

Biotechnologie bij planten en micro-organismen is sinds de jaren tachtig van de vorige eeuw een onderwerp geweest waarover maatschappelijke onrust bestond. Toen eind jaren tachtig ook dieren (waaronder landbouwhuisdieren; denk aan 'stier Herman') genetisch gemanipuleerd werden, werd de onrust heviger en leidde uiteindelijk tot de oprichting van een commissie die de minister van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij (LNV, tegenwoordig staat deze afkorting voor Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit) moest adviseren inzake biotechnologie bij dieren [Paula, 2001].

Op 24 april 1989 installeerde de minister van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij (tegenwoordig Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit) deze commissie van advies. Ze heeft ongeveer een jaar bestaan. Het doel was het produceren van een rapport met beschrijving van de probleemvelden en aanbevelingen voor een toetsingskader. Het ging oorspronkelijk alleen om landbouwhuisdieren en gezelschapsdieren, maar de commissie heeft op eigen initiatief ook andere proefdieren betrokken [Commissie van Advies Ethiek en Biotechnologie bij Dieren, 1990].

Het resultaat van de bevindingen van deze commissie en de politieke discussie over biotechnologie in de tweede kamer was de instelling van artikel 66 en 67 van de Gezondheids- en Welzijnswet voor Dieren (GWD) en als gevolg daarvan de oprichting van de Commissie Biotechnologie bij Dieren (verder aangeduid als CBD).

2.2 wat is de CBD en hoe gaat ze te werk?

De CBD werd ingesteld ten behoeve van zorgvuldigheid, openheid en uniformiteit van de beoordeling van biotechnologisch onderzoek.² Vóór 1990 werd dit soort onderzoek door de dierexperimentencommissies (DEC's) behandeld, voor zover die toen al bestonden.³ Deze oordelen op dit moment nog steeds over grote delen van experimenten met transgene dieren, namelijk alle aspecten daarvan die volgens de Wet op de Dierproeven (WoD) als dierproef beschouwd worden (namelijk die

² Zie het Besluit Biotechnologie bij Dieren.

³ Pas sinds 1997 hebben DEC's een wettelijke status en is een positief oordeel van de DEC noodzakelijk voor het uitvoeren van een dierproef.

aspecten waarbij gewervelde dieren ongerief ondervinden). De CBD beoordeelt in principe alleen de toelaatbaarheid van de DNA-verandering op zich. Ze zegt echter expliciet dat ze ook de vervolgschade in haar afweging mee laat tellen.

'Een vergunning zou slechts kunnen worden verleend, indien naar het oordeel van de minister van LNV (a) de betreffende handelingen geen onaanvaardbare gevolgen hebben voor de gezondheid van dieren en (b) tegen de handelingen geen ethische bezwaren bestaan' [Rozemond, 1990; zie ook: Brom et al., 1996].

Voor het verkrijgen van een vergunning voor het maken van transgenen bestaat inmiddels een uitgebreide, deels openbare procedure. Allereerst dient de onderzoeker een aanvraag in bij het ministerie van LNV, bestaande uit een ingevuld aanvraagformulier (het volledige formulier is te downloaden van www.minInv.nl). Vervolgens kan de CBD hierover zondig aanvullende vragen stellen. Na beantwoording van die vragen geeft ze haar advies, waarna de minister een ontwerpbesluit opstelt.

Tegen dit ontwerpbesluit kunnen burgers en organisaties vier weken lang bedenkingen indienen. Bij voldoende belangstelling wordt er een openbare hoorzitting gehouden, waarop ook de aanvrager uitgenodigd wordt om zijn onderzoek toe te lichten. Tijdens deze hoorzitting en tot enkele weken erna kan iedereen die dat wil ook nog bedenkingen indienen tegen het onderzoek. De CBD neemt deze in overweging en reageert er schriftelijk op. Eventueel wordt een tweede, herzien advies aan de minister opgesteld. De minister neemt dit advies in de praktijk meestal over in zijn besluit. De hele procedure duurt ongeveer zeven maanden [Paula, 2001].

2.3 het welzijns gedeelte van de beoordeling

Zoals in Hoofdstuk 1, paragraaf 1.2.2, al gezegd is, draait het in dit rapport om artikel 67, lid 1.b. van de GWD. De vragen op het aanvraagformulier die dit gedeelte van de wet in de praktijk brengen, zijn vraag nummer 19 en 20 (met name 19):

19) Geef een inschatting van de mogelijke positieve en negatieve effecten van de te verrichten biotechnologische handelingen op de gezondheid, het welzijn, het gedrag, het uiterlijk en de zelfredzaamheid van de bij het onderzoek betrokken dieren. Wat zijn de eigenschappen van het beoogde fenotype? Geef het effect van de handelingen aan per lijn of groep van lijnen en/of kruising en/of conditionele modificatie en/of per beoogd fenotype.

20) Op welke wijze worden de gezondheid, het welzijn en het functioneren van de bij het onderzoek, in het kader waarvan de biotechnologische handelingen worden verricht, betrokken dieren bewaakt en gecontroleerd? Op welk moment en aan de hand van welke criteria wordt beslist dat de dieren die ten gevolge van de biotechnologische handelingen schade aan gezondheid en welzijn ondervinden gedood worden? [CBD, 2004]

De adviescommissie merkte al in 1990 op, met nadruk, dat risk-assessment bij genetische modificatie heel lastig is, omdat gevolgen moeilijk te voorspellen zijn en beproefde methodieken daarvoor ontbreken. Stimuleren van verdere ontwikkeling van onderzoek naar gevolgen en methodieken was naar haar mening zeer belangrijk voor de verdere ontwikkeling van het toetsingskader. De overheid zou hiervoor middelen beschikbaar moeten stellen [Commissie van Advies Ethiek en Biotechnologie bij Dieren, 1990].

Uit de antwoorden die de onderzoekers op vraag 19 en 20 geven, blijkt niet dat dat advies opgevolgd is. De beantwoording van vraag 19 blijft meestal zeer kort (5 tot 18 regels tekst; gemiddeld 12) en oppervlakkig. Er worden vaak argumenten gebruikt waarvan de relevantie niet geheel duidelijk is. Uit analyse van acht recente formulieren van vier verschillende aanvragers blijkt dat deze vraag meestal afgedaan wordt met één of twee van de volgende drie argumenten:

- In vergelijkbare experimenten of bij vergelijkbare genconstructen is nooit veel ongerief waargenomen, dus hier verwachten we het ook niet.
- De mutatie is conditioneel/induceerbaar, dus de biotechnologische handeling op zich levert geen schade op (pas na inductie, eventueel). Zie het kader hieronder voor meer uitleg.
- Voorspellingen van effecten zijn speculatief.

Het eerste argument zou relevant kunnen zijn, als dit vergezeld zou gaan van een literatuurvermelding, maar dat is in deze acht casussen niet het geval. Het tweede argument is, zoals het nu geformuleerd wordt, onjuist. Ook bij induceerbare mutaties bestaat een kans op onbedoelde schade. Bovendien gaat deze vraag over het fenotype dat het *doel* is van het onderzoek, en dat is het fenotype *na* inductie. Het laatste argument is simpelweg geen antwoord op de vraag.

Conditionele modificatie:

Ook wel aangeduid als 'induceerbare modificatie'. Het is een techniek die steeds vaker wordt toegepast bij het maken van transgenen. Wat de techniek inhoudt is dat er een extra stukje DNA aan het genconstruct wordt toegevoegd, dat er voor zorgt dat dit niet tot uitdrukking kan komen.

Op het moment dat de onderzoeker begint met zijn experiment dient hij de dieren een bepaalde stof toe die er voor zorgt dat het construct 'geactiveerd' wordt. Pas vanaf dat moment gaat het dier dus de afwijking vertonen waarvoor het een model is.

Wat is het nut van conditionele modificatie?:

Het is een verfijning van de techniek. Het ongerief voor de dieren wordt beperkt tot de duur van het experiment, in plaats van de duur van hun leven. In sommige gevallen wordt ook de ernst van het ongerief beperkt, bijvoorbeeld als men het gen alleen op een bepaalde plaats in het lichaam tot uitdrukking laat komen, in plaats van door het hele lichaam. Vooral voor de dieren die alleen voor de fok gebruikt worden en niet voor experimenten, kan het een belangrijke verfijning zijn.

Een klein nadeel er van is dat als het construct onverwacht letale effecten heeft, een dier zeer snel kan sterven na toediening van de activerende stof [pers. comm. Fentener van Vlissingen, 2004].

Het antwoord op vraag 20 lijkt op het eerste gezicht wat uitgebreider (4 tot 29 regels tekst; gemiddeld 15⁴), maar het gaat hier over het algemeen om een standaardformulering. Alle aanvragers

⁴ Waarbij vermeld dient te worden dat als de twee formulieren van één van de aanvragers niet meegerekend zouden worden dit gemiddelde daalt tot 9,5 regels.

melden dat er dagelijks toezicht plaatsvindt⁵. De meesten noemen ook nog hun 'ervaren proefdierverzorgers, biotechnici en onderzoekers'. Bij twee van de aanvragers vindt na afloop van het experiment een welzijnsevaluatie plaats. De helft van de aanvragers noemt het welzijnsdagboek (hoewel dat wettelijk verplicht is) en het feit dat de DEC het welzijn van de dieren in de gaten houdt. Iets minder dan de helft meldt dat de dieren bij ernstig ongerief gedood zullen worden. Criteria daarvoor worden echter niet gegeven, men laat dat over aan de DEC.

⁵ Eén van de geïnterviewde deskundigen, die zelf betrokken is geweest bij een welzijnsinventarisatie [namelijk die van Hazekamp et al., 1999], meldt dat dit in de praktijk echter (vanwege tijdgebrek) niet gebeurt! [de Cock Buning, pers. med., 2004]

Technieken in de biotechnologie

3.1 het creëren van transgene muizen

Dit hoofdstuk beschrijft in het kort de technieken die gebruikt worden om muizen transgeen te maken. Er zijn hiervoor twee veel gebruikte methoden, namelijk Pronucleaire Microinjectie (MI) en Embryonale Stamcelinjectie (ES). De handelingen die nodig zijn voor beide methoden worden eerst besproken op celniveau, en daarna ook op muisniveau. Tevens worden per techniek de voordelen en de nadelen voor de onderzoekers van het toepassen van de techniek genoemd. De nadelen van een techniek zijn vaak ook de oorzaken van welzijnsschade voor de muizen.

Naast de MI- en ES-technieken worden enkele andere technieken die in Nederland (nog) nauwelijks gebruikt worden, kort aangestipt.

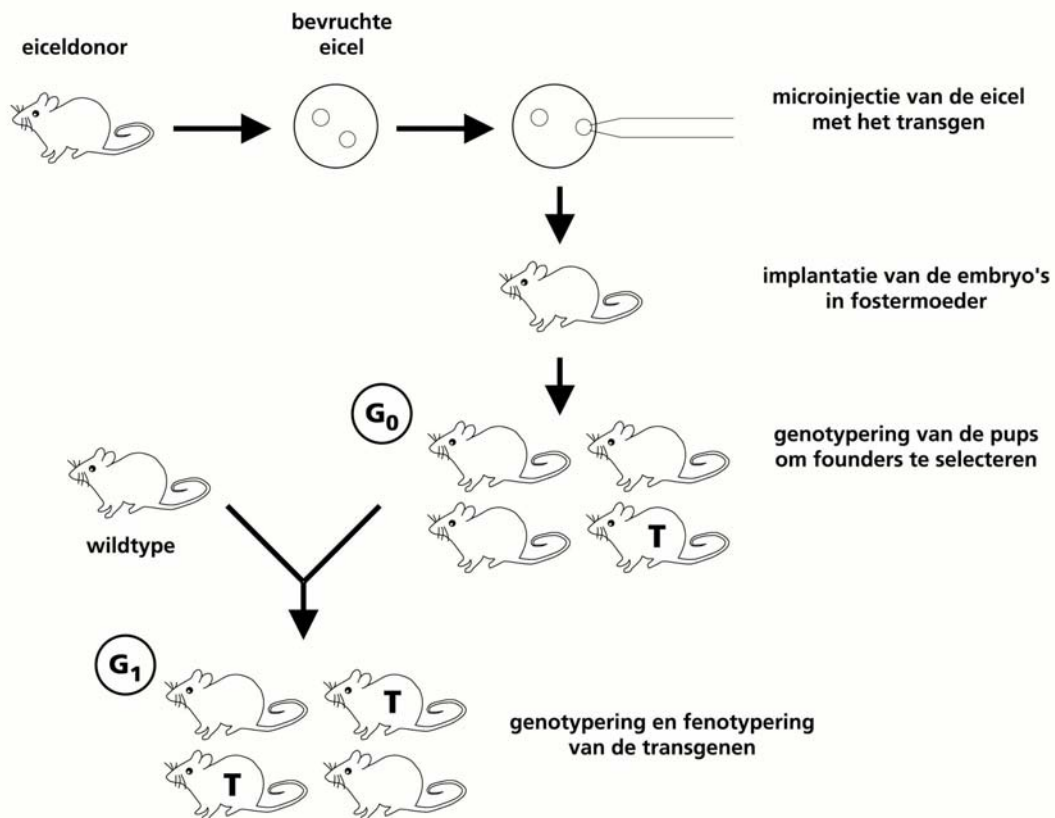
In dit hoofdstuk komt als gevolg van het onderwerp behoorlijk wat vakjargon voor, al deze termen worden in de woordenlijst achter in het rapport verklaard. Voor een meer uitgebreide beschrijving van technieken in de biotechnologie zie van der Meer [2001] en Robinson et al. [2003].

3.2 pronucleaire microinjectie

3.2.1 wat gebeurt er op celniveau?

Bij pronucleaire microinjectie wordt een genconstruct geïnjecteerd in het DNA van een net bevruchte eicel [van der Meer, 2001]. Het genconstruct komt vervolgens op een willekeurige plaats in het gastheer-DNA terecht, vaak in meerdere kopieën [Pinkert, 2003], zie ook Figuur 3.1.

Een injectiepipet wordt gevuld met een oplossing met daarin het genconstruct dat men aan het DNA wil toevoegen. Dit wordt geïnjecteerd in de mannelijke pronucleus, omdat deze groter is dan de vrouwelijke kern. Vervolgens worden de embryo's *in vitro* gekweekt tot ze het tweecellig stadium bereiken, waarna ze gereed zijn voor implantatie [van der Meer, 2001].



Figuur 3.1
De MI-techniek [Gebaseerd op: Robinson et. al, 2003]

3.2.2 wat gebeurt er met de muizen?

Om aan voldoende eicellen te komen worden zeer jonge vrouwtjesmuizen (rond de drie weken oud) met hormonen gesuperovuleerd en vervolgens gedekt door mannetjes van dezelfde stam. De bevruchte eicellen (gemiddeld 15-30 per vrouwtje) worden na ongeveer 16 uur geogst, de moeders worden gedood.

Een tweede groep vrouwtjes, de 'fostermoeders' wordt pseudo-zwanger gemaakt door ze te laten paren met gevasectomeerde mannetjes. Dit brengt ze in de juiste hormonale staat om de embryo's niet af te stoten. Er worden per muis 10-20 embryo's geïmplanteerd; 10-30% hiervan wordt voldragen. Als de jongen die hieruit resulteren 2-3 weken oud zijn wordt hun genetische status vastgesteld aan de hand van weefsel verkregen uit een oor of staartbiopsie. 10-30% van de pups is transgeen, dit is Generatie 0 (G_0), de founders (zie Figuur 3.1).

Het totale succespercentage bedraagt dus 1-10% van de geïnjecteerde eicellen. Het transgen bevindt zich echter alleen dan in alle cellen van de muis als het al vóór de eerste deling integreert met het eigen DNA. Is dit niet het geval, in ongeveer 30% van de pups, dan is de muis mozaïsch. Dat houdt in dat het transgen maar in een deel van de cellen aanwezig is. Dit kan betekenen dat het transgen niet of nauwelijks in de geslachtscellen aanwezig is en dus niet aan de nakomelingen doorgegeven wordt.

De pups die het nieuwe gen wél in al hun cellen bezitten en doorgeven, de zogenaamde 'founders', worden gekruist met wildtype muizen. De founders kunnen niet met elkaar gekruist worden, omdat het genconstruct op een willekeurige plaats in het DNA ingebouwd is. Elke founder is dus het startpunt voor een unieke transgene lijn [van der Meer, pers. med., 2004]. Van G_1 , de nakomelingen van de

founders, zal gemiddeld de helft drager zijn van het transgen. Als die transgene status definitief is vastgesteld kan men deze pups onderling laten paren en is men klaar om een nieuwe lijn op te starten: door de heterozygoten van G_1 met elkaar te kruisen verkrijgt men in G_2 homozygote transgenen [van der Meer, 2001].

3.2.3 voor- en nadelen van MI

Het belangrijkste voordeel van MI is dat het een relatief snelle en eenvoudige techniek is, in sommige gevallen is de eerste generatie muizen al geschikt voor onderzoek. Ook lijkt er vooralsnog geen limiet te zijn aan het formaat van het geïnjecteerde DNA fragment.

Het grootste nadeel van MI is dat de mate van expressie van het gen sterk afhangt van de plaats in het genoom waar het terechtkomt. Het construct wordt namelijk op een random plaats ingebouwd in het genoom. Bovendien ondergaat het gastheer-DNA regelmatig (in 7-20% van de gevallen [van Reenen, pers. med., 2004]) schadelijke veranderingen, de zogenaamde 'insertionele mutaties'. De oorzaak daarvan is dat het genconstruct bijvoorbeeld midden in een belangrijk gen 'ingeplakt' wordt, waardoor dat gen niet meer kan functioneren [Pinkert, 2003].

Het construct kan daarnaast soms met meer dan 1000 kopieën tegelijk ingebouwd worden, dit aantal is onvoorspelbaar en kan een veel te sterke genexpressie veroorzaken. Het is tenslotte mogelijk dat mozaïcisme optreedt in de eerste generatie transgenen waardoor het transgen niet in de geslachtscellen terechtkomt [Robinson et al., 2003]. Gevolg van dit alles is dat maar een zeer klein percentage van de pups een geschikte founder is (gemiddeld 10,2% [Hazekamp et al., 1999]).

Om het aantal muizen en het ongerief voor die muizen zo veel mogelijk te beperken, zouden transgene lijnen gehandhaafd moeten worden als homozygoten. Dat scheelt in terugkruisen en er hoeven geen DNA-biopsies meer gedaan te worden. Dat is echter niet altijd mogelijk omdat homozygotie ongezonde of zelfs letale fenotypes op kan leveren (door recessieve insertionele mutaties) [Robinson et al., 2003].

3.3 embryonale stamcelinjectie

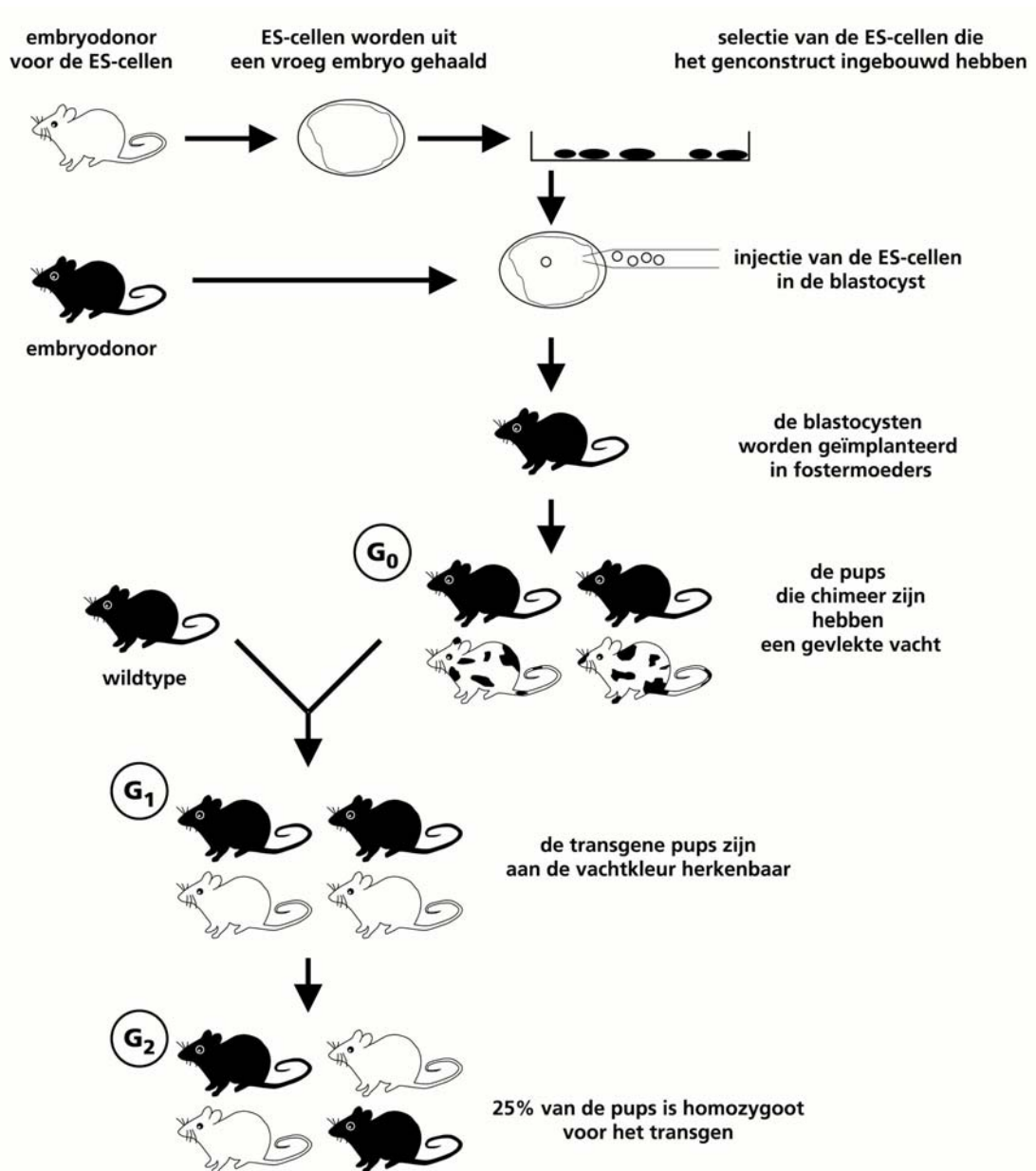
3.3.1 wat gebeurt er op celniveau?

Embryonale stamcelinjectie (ES) wordt gebruikt voor het maken van zogenaamde knock-outs (een dier waarbij een bepaald gen uitgeschakeld is) en knock-ins (een dier waarbij een bepaald gen extra sterk geactiveerd is).

Net als bij MI worden een aantal zeer jonge vrouwtjes gesuperovuleerd en gepaard met mannetjes van dezelfde stam. Eén tot twee dagen later worden ze gedood en de embryo's worden verwijderd. Ze bevinden zich inmiddels in het morula-stadium en ze worden nog één dag in vitro doorgekweekt tot ze het blastocyst-stadium bereikt hebben; het embryo is dan bolvormig met een buitenwand en in het centrum van het embryo bevinden zich embryonale stamcellen (ES cellen) [van der Meer, pers. med., 2004], zie ook Figuur 3.2.

De ES cellen worden uit de embryo's geogst en op kweek gezet. Ze kunnen vrij lang in deze toestand bewaard blijven en gemakkelijk vermenigvuldigd worden.

Het genconstruct wordt ingebracht met behulp van electroporatie: de cellen worden aan een elektrische puls blootgesteld, wat de celmembraan tijdelijk uit elkaar doet vallen, zodat het vreemde DNA de celkern binnen kan dringen.



Figuur 3.2

De ES-techniek [Gebaseerd op: Robinson et. al, 2003]

De gemodificeerde ES cellen worden in nieuwe blastocysten uit andere muizen, meestal zelfs van een andere stam, geïnjecteerd. Hiervoor worden meestal muizen met een andere vachtkleur gebruikt, zodat de chimere (de dieren waarbij de gemodificeerde ES cellen geïntegreerd zijn met de rest van het embryo en dus in de uiteindelijke weefsels terechtgekomen zijn) later aan een gevlekt patroon te herkennen zullen zijn. Hiervoor worden vrouwtjes meestal niet gesuperovuleerd (dat blijkt namelijk misvormde blastocysten op te leveren) en er worden volgroeide vrouwtjes (6-8 weken) voor gebruikt [Robinson et. al, 2003].

De blastocyst wordt met een pipet vastgezogen en via een smalle naald worden er een aantal (8-10) ES cellen in geïnjecteerd. Als alles goed gaat worden deze deel van de 'inner cell mass' van de blastocyst en dragen ze bij aan de vorming van het embryo.

De geïnjecteerde blastocysten worden geïmplanteerd in pseudo-zwangere vrouwtjes, de fostermoeders. Ongeveer 25% van de pups die geboren worden zal chimeer zijn, ofwel deels bestaan uit transgeen weefsel. Slechts enkelen hiervan geven het transgen ook door aan hun nakomelingen (1 tot 25% van de chimere [Hazekamp et al., 1999]). Er bestaat een correlatie tussen de mate van verkleuring van een pup en de kans dat het transgen zich ook in de geslachtscellen bevindt.

De chimere muizen worden gekruist met wildtype, de G_1 , die zo ontstaat zal als het goed is 50% heterozygoten voor het transgen bevatten. De heterozygoten worden weer met elkaar gekruist, waarop 25% van de nakomelingen homozygoot zal zijn voor het transgen (mits het geen letale effecten heeft). Vanaf deze G_2 kan dan bijvoorbeeld het effect van het uitvallen van een bepaald gen bestudeerd worden (knock-outs) [van der Meer, 2001].

3.3.2 wat gebeurt er met de muizen?

De behandeling van de muizen verschilt niet veel met die bij MI. Wat wel anders is, is dat de embryo's in een later stadium geïmplanteerd worden, en dat de eerste generatie (G_0) chimeer is (zie Figuur 3.2).

3.3.3 voor- en nadelen van ES

Het grote voordeel van ES is dat de transgene stamcellen in vitro al geselecteerd kunnen worden, op aanwezigheid en locus van het transgen, dat scheelt veel onnodig implanteren, wat bij MI niet te voorkomen is [van der Meer, 2001]. Een ander voordeel is dat het met deze techniek mogelijk is om modificaties conditioneel te maken. Dat houdt in dat het vreemde gen pas tot expressie komt wanneer het dier een bepaalde stof toegediend krijgt [Robinson et al., 2003]. Nieuwe technieken zijn in ontwikkeling, waarmee men geen chimere meer creëert, maar volledig transgene individuen, die dus ook allemaal transgene nakomelingen krijgen [Pinkert, 2003].

Een nadeel is dat deze techniek alleen bij muizen toegepast kan worden. Voor andere soorten is het nog niet gelukt om de veranderde stamcellen ook in de geslachtscellen te krijgen [Bishop, 1999]. Ook zou de langdurige kweek van stamcellen en embryo's in vitro de kans op DNA-schade kunnen vergroten.

3.4 andere technieken

Nuclear transfer cloning is de techniek die in Nederland gewoonlijk wordt aangeduid met 'klonen'. Het is de manier waarop grotere zoogdieren transgeen gemaakt worden. Klonen vanuit een cel van een volwassen dier wordt in Nederland op het moment niet gedaan, maar het is ook mogelijk om vanuit embryocellen dezelfde techniek toe te passen. Dit is ook wat er gedaan is tijdens het 'stier Herman' project. De techniek lijkt dan veel op ES. Er worden echter geen stamcellen in embryo's geïnjecteerd. In plaats daarvan worden de kernen van gemanipuleerde embryostamcellen geïnjecteerd in leeggemaakte eicellen, waarna deze zich tot nieuwe embryo's ontwikkelen [van Reenen, 2001]. Voor muizen wordt deze techniek zelden gebruikt, omdat ES een praktischere alternatief is. De welzijnseffecten zullen ongeveer gelijk zijn aan die bij ES. Wel moet opgemerkt worden dat grotere zoogdieren hiervan tamelijk veel gezondheidsschade kunnen ondervinden (zie ook paragraaf 4.1.3).

Er bestaan nog een aantal andere technieken, waarvan er twee in de toekomst belangrijker zouden kunnen worden. De eerste is 'Sperm mediated DNA transfer', wat er op neer komt dat de modificaties van het DNA al in de spermacel plaatsvinden en op die manier in het embryo terechtkomen.

Dit zou heel interessant kunnen zijn voor onderzoekers, maar de techniek is nog omstrede (het werkt soms wel en soms niet) [Gandolfi, 2000; Maione, 1998]. Welzijnseffecten zullen vermoedelijk lijken op nuclear transfer cloning, maar milder zijn, omdat er geen electroporatie van de eicel hoeft plaats te vinden.

De tweede wordt gewoonlijk aangeduid met 'Lentivirale vectoren'. Hierbij worden aangepaste virussen (de zogenaamde retrovirussen) gebruikt om grote stukken DNA *in vivo* in delende of niet-delende cellen in te brengen. Dit werkt ook bij volwassen mensen, het is dus zeer geschikt voor genterapie [Kafri, 2000]. Muizen worden op dit moment al gebruikt als model voor genterapie met behulp van retrovirussen [Ikawa, 2003; zie ook: Caplen, 1998 en Naldini, 1998]. De grootste vrees wat betreft welzijn en gezondheid is dat de ziekteverwekkende eigenschappen van de virussen alsnog tot uitdrukking komen.

Transgenese: gevolgen voor de muis

4.1 oorzaken van welzijnsschade

In dit hoofdstuk worden de gevolgen voor het welzijn en de gezondheid van dieren (meestal muizen) beschreven die het gevolg zijn van de handelingen om de dieren transgeen te maken. De welzijnsschade voor de muizen is in te delen in vijf categorieën. Deze komen in dit hoofdstuk uitgebreid aan bod. Telkens zal de oorzaak van de schade worden genoemd, waarna in een kader de mate van ongerief en ideeën voor verbetering van de situatie opgesomd worden. De vijf categorieën komen kort samengevat hier op neer:

De eerste twee zijn gevolgen van de gebruikte **technieken**. Deze worden behandeld in paragraaf 4.2. Ten eerste is er de schade aan de gebruikte dieren voor het maken van de lijn: de embryodonoren, fostermoeders, gevasectomeerde mannetjes, etc. Ten tweede ontstaat er schade aan de embryo's die toe te schrijven is aan de gebruikte *in vitro* technieken. Deze schade staat los van de eigenschappen van het genconstruct dat ingebracht is: bijvoorbeeld insertionele mutaties, letale homozygotie en LOS (Large Offspring Syndrome).

De derde en de vierde vorm van schade zijn gevolgen van het ingebrachte genconstruct. Deze twee komen ter sprake in paragraaf 4.3. De derde vorm is de **intentionele** schade die optreedt als gevolg van de nieuwe genen (of de knock-out van een gen), het gaat hier immers vaak over ziektemodellen. Dit is dus schade die expliciet door de onderzoeker beoogd wordt. Deze schade is gewoonlijk redelijk voorspelbaar en humane eindpunten kunnen hiervoor vastgesteld worden. Ten vierde is er ook nog de **onbedoelde** schade als gevolg van de modificatie, de onvoorspelbare effecten van het nieuwe gen (verstoring van complexe systemen, overexpressie, expressie op verkeerde momenten of plaatsen, onverwachte interacties met lichaamseigen producten, etc.).

De vijfde vorm van schade is de **vervolg schade**. Gezondheidsschade kan overgedragen worden aan volgende generaties of zich pas in latere generaties openbaren. Het in stand houden van een lijn door middel van fok levert veel 'overtollige' dieren op; het invriezen van embryo's kan weer andere schade veroorzaken.

De gebruikte indeling van het ongerief in gering/matig/ernstig is de standaard manier om ongerief in te delen [Voedsel en Waren Autoriteit, 2003]. De oordelen die gegeven zijn over de ernst van het ongerief bij een specifieke handeling zijn afgeleid van het voorbeeldlijstje uit de 'Registratie dierproeven en proefdieren 1989' [Veterinaire Hoofdinspectie van de Volksgezondheid, 1989]. Sinds enkele jaren is er

geen officiële voorbeeldlijst meer, maar deze lijst reflecteert nog steeds in grote lijnen de consensus onder de Nederlandse proefdierdeskundigen. De in dit hoofdstuk gegeven oordelen zijn overigens geen vaststaande feiten, maar inschattingen aan de hand van de huidige stand van de kennis.

In de laatste paragraaf zal ingegaan worden op de vraag in hoeverre kennis over de incidentie van al deze vormen van schade in de Nederlandse laboratoria beschikbaar is.

4.2 welzijnsschade als gevolg van de technieken

4.2.1 introductie

In deze paragraaf zal de schade aan welzijn en gezondheid besproken worden van alle dieren die betrokken zijn bij het creëren en in stand houden van een transgene lijn. Hieronder vallen dus ook dieren die zelf niet transgeen zijn. Dit zal per techniek beschreven worden, het kan hierbij nuttig zijn om af en toe terug te bladeren naar Figuur 3.1 (blz.18) en Figuur 3.2 (blz. 20) in hoofdstuk drie.

4.2.2 microinjectie

De **eiceldonoren** zijn zeer jonge vrouwelijke muizen (in de regel ongeveer drie weken oud) die met behulp van hormonen worden gesuperovuleerd. Vervolgens worden deze gepaard met volwassen vruchtbare mannetjes. De bevruchte eicellen worden verwijderd; ten behoeve hiervan worden de eiceldonoren gedood [Robinson et al., 2003]. Omdat onvolgroeide vrouwtjes gepaard worden met volgroeide mannetjesmuizen, zijn de gebruikte mannetjes vaak veel groter dan de vrouwtjes [van der Meer, 2001].

Oorzaken van ongerief bij het verkrijgen van eicellen:

Het injecteren van de eiceldonoren met hormonen (*gering*); de paring van feitelijk onvolwassen vrouwtjes met veel grotere volwassen mannetjes (*gering tot ernstig*⁶); het doden van de donoren ten behoeve van het verwijderen van de bevruchte eicellen (*gering*).

Mogelijke verbeteringen:

Men zou oudere vrouwtjes kunnen gebruiken. De reden dat dit niet gebeurt, is dat met de huidige methode de opbrengst (in aantal bruikbare eicellen) veel hoger zou zijn. Of dit werkelijk zo is, is echter nooit afdoende door middel van onderzoek bewezen [van der Meer, 2001]. Op ten minste één plek in Nederland worden vrouwtjes van ca. 6 weken gebruikt, en men vindt de opbrengst prima [Baumans, pers. med., 2004].

De ***in vitro* injectie van de bevruchte eicel** met het genconstruct is op zich geen vorm van ongerief, maar kan tijdens of na ontwikkeling van het embryo wel ongerief veroorzaken. De plaats waar het transgen integreert in het DNA is bij MI namelijk totaal onvoorspelbaar. De kans is ongeveer 5-15%

⁶ Er is hier nooit onderzoek naar gedaan. Uit anekdotische informatie lijkt wel naar voren te komen dat de vrouwtjes ontsnappingsgedrag vertonen [Baumans, pers. med., 2004].

[Hazekamp et al., 1999] dat een construct terecht komt in een gedeelte van het DNA dat nodig is voor de (embryonale) ontwikkeling, of voor andere noodzakelijke levensfuncties. Dat gedeelte kan vervolgens niet meer goed functioneren, met als resultaat een verstoorde ontwikkeling. Dit soort schadelijke insertionele mutaties zijn vaak al voor de geboorte fataal en worden dan niet als ongerief beschouwd. Ze kunnen echter ook pas later in het leven naar boven komen.

Een tweede nadeel van de onvoorspelbare locatie van het construct is dat de mate van expressie van het transgen sterk kan variëren tussen de muizen. Gevolg van deze twee problemen is dat maar een zeer klein percentage van de embryo's dat het construct ingebouwd heeft zowel levensvatbaar is als het gen in de juiste mate en met de juiste patronen in tijd en ruimte tot uitdrukking brengt. Er moeten dus vaak behoorlijk veel embryo's geproduceerd worden, er zijn daardoor veel eiceldonoren nodig en veel draagmoeders met als gevolg veel 'overtollige' muizen⁷ [Robinson et al., 2003].

De manipulaties aan het zeer jonge embryo kunnen daarnaast onafhankelijk van (de aanwezigheid van) het genconstruct DNA-schade veroorzaken. In paragraaf 4.2.4 zal hier verder op ingegaan worden.

Oorzaken van ongerief bij de *in vitro* injectie van de bevruchte eicel:

De lage efficiëntie van de techniek. Hierdoor zijn zeer veel dieren nodig om één goede transgene lijn te creëren. Bijna al deze dieren worden na gebruik gedood. Tevens is er risico op gezondheidsschade door ongewenste DNA-beschadiging.

Mogelijke verbeteringen:

Op een andere techniek overstappen, voor muizen kan dat ES zijn [Robinson et al., 2003]. Verder zou men de lijn zeer goed fenotypisch moeten analyseren, zodat alle welzijnschade opgemerkt wordt, en vervolgens het in stand houden van de lijn heroverwogen kan worden.

Wanneer de eicellen geïnjecteerd zijn, worden ze **geïmplanteerd** in zogenaamde '**fostermoeders**'. Deze fostermoeders worden eerst gedekt door gevasectomeerde mannetjes om schijnzwangerschap op te wekken. Vervolgens worden via een buikoperatie onder anesthesie de eicellen geïmplanteerd in deze dieren. Na het voldragen van de embryo's zorgen ze voor de jongen totdat deze gespeend kunnen worden. Hierna worden de fostermoeders meestal gedood [Robinson et al., 2003].

Er bestaan nog veel vragen over de gevolgen van de implantatie voor de pups. Een aspect dat volgens Hazekamp et al. [1999] vaak over het hoofd gezien wordt is dat als fostermoeders gewoonlijk onervaren vrouwtjes gebruikt worden. Deze verzorgen hun jongen slechter dan vrouwtjes die al eerder geworpen hebben en er is een grotere kans op kannibalisme van de pups door de moeder. In het algemeen wordt juist bij voorkeur een stam gebruikt die goede moeders zijn. Kannibalisme kan ook veroorzaakt worden door verstoring van het nest, bijvoorbeeld omdat men graag snel wil zien of er jongen zijn geboren [Baumans, pers. med., 2004]. Het doden van de jongen door de (draag)moeder lijkt bij transgene dieren in het algemeen wel vaker voor te komen (de auteur geeft geen cijfers) [van der Meer, 2001]. Hazekamp et al. [1999] vonden dat de pupsterfte bij transgene moeders in de eerste drie weken ruim twee keer zo hoog ligt (21% tegenover 9%) als bij niet-transgenen [Hazekamp et al., 1999]. Niet onderzocht is of dat aan de pups ligt, aan een verhoogde kans op verstoring, of aan de moeders.

⁷ Om precies te zijn: gemiddeld 50 muizen per transgene *founder*, waarvan er gemiddeld 27 gedood worden tijdens de procedure. Er worden standaard drie *founders* gemaakt voor een nieuwe lijn, en in totaal dus 150 dieren gebruikt. [Hazekamp et al., 1999].

Oorzaken van ongerief bij het implanteren van de embryo's:

Het onvruchtbaar maken van de dekmannetjes, vasectomie (*matig*); het implanteren van de embryo's bij de fostermoeders (*matig*); het doden van de fostermoeders (*gering*); de verhoogde kans op het kannibaliseren van pups door de draagmoeder als gevolg van stress, mogelijke afwijkingen aan de pups of gebrek aan ervaring (*ernstig*).

Mogelijke verbeteringen:

Men kan genetisch onvruchtbare mannetjes gebruiken, maar het in stand houden van zo'n deels onvruchtbare lijn kost een groot aantal muizen. De fostermoeders zouden na afloop gebruikt kunnen worden voor andere experimenten [Robinson et al., 2003]. Het samen huisvesten met ervaren vrouwtjes in een rustige omgeving kan helpen om kannibalisme te voorkomen [Hazekamp et al., 1999].

De jongen, G₀, worden na het spenen getest op aanwezigheid van het transgen: de **genotypering**. Dit brengt voor de pups vaak ongerief mee. Genotypering met behulp van PCR gebeurt nu meestal aan de hand van een ponsje uit het oor of het afgeknipte topje van de staart. Ook teenknippen of bloed afnemen zijn regelmatig gebruikte methodes. Deze veroorzaken allen in meer of mindere mate stress voor de muizen [Broome et al., 1999]. Overbodige (want niet transgene) pups, de overgrote meerderheid, worden meestal gedood [Robinson et al., 2003].

Oorzaken van ongerief bij de genotypering:

Het afnemen van bloed of weefselmonsters voor DNA testen (*gering tot matig*); het doden van de niet-transgene pups (*gering*).

Mogelijke verbeteringen:

Er bestaan ook niet-invasieve alternatieven voor het genotyperen van dieren, maar om economische, historische en andere redenen worden deze nauwelijks toegepast. Dat terwijl deze minstens zo efficiënt kunnen zijn en veel minder ongerief veroorzaken. Twee (bijna) niet invasieve technieken zijn het verzamelen van keutels en het verzamelen van speeksel bij muizen. Voor PCR heeft dit bewezen goed te werken [Broome et al., 1999; Pinkert, 2003]. Ook zou men speciaal hiervoor een extra stuk aan een genconstruct kunnen toevoegen dat een duidelijk effect heeft op het uiterlijk (bijv. een fluorescentie-gen) [Pinkert, 2003]. Niet transgene nestgenoten kunnen vaak gebruikt worden als controlegroepen in het experiment, of bijvoorbeeld als dekmannen [Robinson et al., 2003].

Als een nieuwe lijn eenmaal met succes gecreëerd is moet deze ook nog **gefenotypeerd** worden. Dit bestaat gewoonlijk uit een aantal gedragstesten die weinig ongerief opleveren en het fysiologisch analyseren van enkele dieren, die hiervoor gedood worden. Bij sommige lijnen worden ook onvoldragen embryo's bekeken [Crawley, 1999].

Voor de fenotypering van een nieuwe lijn bestaat geen vast protocol, zelfs niet binnen de verschillende instituten. In elk geval in de instituten waarvan voor dit onderzoek medewerkers geïnterviewd zijn, is het een zaak voor de individuele onderzoekers. Wat deze vervolgens precies doen, hangt af van het model waar het om gaat en de experimenten die ze er mee willen gaan doen.

Standaard is het doden van enkele dieren voor een uitgebreide fysiologische en weefselanalyse. In veel gevallen zal ook bloed worden afgenomen. Voor die modellen waarbij afwijkingen in gedrag of zintuigen verwacht worden, zullen de daarvoor relevante tests uitgevoerd worden.

Oorzaken van ongerief bij de fenotypering:

Het type tests en daarmee de mate van ongerief hangt sterk af van het model waar het om gaat. Het doden van enkele dieren (*gering*) en bloed afnemen (*gering tot matig*) gebeurt bijna altijd. Ook allerlei gedragstesten vinden regelmatig plaats (*geen tot matig; zeer variabel*).

Mogelijke verbeteringen:

Het afnemen van bloed moet op de minst onaangename manier gebeuren (welke dat is hangt af van de benodigde hoeveelheid). Gedragstesten kunnen vaak verfijnd worden om de stress voor de muis te verminderen.

4.2.3 embryonale stamcelinjectie

Hierbij bestaan dezelfde problemen als bij micro-injectie, met drie uitzonderingen: ten eerste worden de embryo's in een later stadium verwijderd en geïnjecteerd. Ten tweede zijn er de mogelijke effecten van chimeer zijn: het is goed voor te stellen dat de aanwezigheid van twee verschillende sets DNA in één dier tot problemen kan leiden (bijvoorbeeld androgynie). In de literatuur is daar echter niets over terug te vinden. Ten derde is genotypering van de pups pas nodig in G_1 , bij G_0 (de chimere) kan men immers naar de vachtkleur kijken [Robinson et al., 2003].

4.2.4 DNA schade als gevolg van *in vitro* manipulaties

Als gevolg van de *in vitro* manipulatie van embryo's kan er later schade aan het welzijn optreden. Mechanische schade aan het DNA, de *in vitro* cultuur op zichzelf en het inbrengen van de embryo's kunnen alle de normale embryonale ontwikkeling beïnvloeden. Als er een mutatie optreedt in een fysiologisch gezien belangrijk gen, kan dat leiden tot nadelige invloeden op het dierwelzijn [van der Meer, 2001].

Deze schade wordt veroorzaakt op het niveau van het DNA, en kan in twee aspecten opgedeeld worden. Het eerste daarvan is de mechanische schade aan het DNA; het gaat dan voornamelijk om insertionele mutaties. Het tweede aspect is dat DNA als gevolg van *in vitro* manipulaties vaak zogenaamde methyleringsveranderingen ondergaat. Deze veranderingen zorgen er voor dat bepaalde genen aan of juist uitgeschakeld worden en kunnen een grote invloed hebben op de ontwikkeling van het dier [Roemer et al., 1997].

mechanische schade aan het DNA: insertionele mutaties en letale homozygotie

Bij micro-injectie ondergaat het gastheer-DNA in 5-15% van de gevallen voor het dier schadelijke veranderingen: 'insertionele mutagenese'. De oorzaak hiervan is dat een nieuw gen midden in een ander, belangrijk gen terechtkomt en daardoor de expressie van dat andere gen verstoort [Pinkert, 2003]. Bij ES bestaat de kans daarop ook, maar deze is minder dan 5% [Hazekamp et al., 1999]. De term 'letale homozygotie' komt vaak in dezelfde context voor. Dit houdt in dat een muis die één exemplaar van het nieuwe gen heeft en één lichaamseigen exemplaar weinig of geen symptomen vertoont (het vreemde gen is recessief). Een muis die echter twee exemplaren van het nieuwe gen heeft sterft voor of kort na de geboorte.

Een voorbeeld van beide verschijnselen is de volgende casus. Dit is één van de beruchtste gevallen van ernstige gezondheidsschade als gevolg van insertionele mutaties: bij een transgene muislijn bleken nakomelingen die homozygoot waren voor het transgen onder andere geen of misvormde poten te hebben en ernstige hersenafwijkingen. Dit was maar in één van de drie lijnen met dit construct het geval, en was dus het gevolg van een recessieve insertionele mutatie in die lijn. Blijkbaar was er een gen verstoord met belangrijke functies voor de embryonale ontwikkeling. Heterozygoten vertoonden een normaal fenotype [McNeish et al., 1988].

De eerder genoemde frequenties voor insertionele mutagenese kunnen in de praktijk overigens hoger zijn, omdat sommige mutaties tijdens een vroeg embryonaal stadium dodelijk zijn terwijl andere onopgemerkt blijven. De mate van ongerief hangt af van de functie van het gemuteerde gen [van der Meer, 2001].

gevolgen van *in vitro* manipulaties: methyleringsveranderingen

Methylering van DNA is een mechanisme om de genexpressie te reguleren. In het algemeen kan men zeggen dat een gemethyleerd gen niet tot expressie komt. Dit is een onmisbaar proces voor embryonale ontwikkeling en de weefsel- of leeftijdspecifieke expressie van genen. *In vitro* manipulaties van embryo's kunnen het methyleringspatroon verstoren, vooral klonen staat hier bekend om. Grote zoogdieren die hiermee gecreëerd worden, vertonen vaak het 'Large Offspring Syndrome' (LOS), een verzameling gezondheidsproblemen waarvan een verhoogd geboortegewicht het meest zichtbare is, zie ook het kader hieronder.

Large Offspring Syndrome, beschrijving:

LOS is een probleem dat met name bekend is van transgene runderen en schapen. De symptomen zijn onder andere: een verhoogd geboortegewicht (soms zelfs een verdubbeling), misvormde foetussen, meer spontane abortussen en doodgeboortes (of overlijden kort na de geboorte) en langere zwangerschap [van Reenen et al., 2001].⁸ Bij muizen lijkt het minder een probleem, maar er bestaan enkele studies die er op wijzen dat het belangrijker zou kunnen zijn dan men denkt.

Omvang van het probleem:

De meeste dieren waarbij deze verschijnselen gezien worden waren gemaakt met de Nuclear Transfer techniek (klonen). In een experiment met deze techniek bij muizen vertoonde 96% LOS-achtige afwijkingen. Deze werden ook doorgegeven aan de volgende generatie, wat wijst op de Nuclear Transfer als oorzaak van de problemen [Roemer et al., 1997].

Bij het Stier Herman project echter, kwamen de problemen juist niet meer voor in de volgende (op normale wijze verwekte) generatie, wat juist weer wijst op de *in vitro* manipulatie op zich als oorzaak van LOS [van Reenen en Blokhuis, 1997]. Een ander argument daarvoor is dat muizen uit ingevroren of lang in cultuur gebleven cellen vergelijkbare symptomen vertonen [Dean et al., 1998; Roemer et al., 1997].

Ook wordt het geïnjecteerde nieuwe DNA vaak gemethyleerd en daarmee geïnactiveerd, wat waarschijnlijk een verdedigingsmechanisme van de cel is. Het is een mogelijke verklaring voor het lage

⁸ Complete beschrijving van LOS in: Young, 1998.

succespercentage van transgenese. Dit probleem is ook relevant op de lange termijn, voor het handhaven van transgene lijnen bijvoorbeeld, want het aldus uitschakelen van een gen kan ook later nog gebeuren en het is overerfbaar [Doerfler et al., 1997]. Daarnaast is ook cryopreservatie van embryo's een mogelijke oorzaak van methylatieveranderingen [Roemer et al., 1997].

In een experiment met muizen uit 1997 heeft men afwijkingen gevonden (onder andere verslechterde groei) bij 96% van de gemanipuleerde dieren. De gebruikte techniek was Nuclear Transfer, ofwel klonen. Deze afwijkingen werden geassocieerd met een verhoogde DNA methylatie, en opmerkelijk genoeg zetten deze zich voort in meer dan de helft van de volgende generatie. Er was ook sprake van een verhoogde pupsterfte, met name bij de nakomelingen van de gekloonde muizen. Het leek er bovendien op dat de afwijkingen ook naar de verdere generaties doorgegeven werden [Roemer et al., 1997].

Methylatieveranderingen zijn echter zeker niet alleen een probleem bij klonen. Bij de muis zorgt langdurige cultuur van ES cellen voor abnormale foetussen. In een onderzoek uit 1998 is bij door middel van ES gecreëerde foetussen gekeken of dit samenhangt met zich ophopende veranderingen in methylisering. In de vier bekeken genen zijn deze inderdaad gevonden, en deze bleven aanwezig na de implantatie. Er is hier alleen gekeken naar de foetussen, hierin zijn vergelijkbare stoornissen als bij LOS gevonden. Ook in andere studies zijn afwijkingen gevonden bij foetussen die uit lang in cultuur gebleven ES cellen gegroeid waren (waaronder doodgeboorte) [Dean et al., 1998].

Zowel de *in vitro*-cultuur als de nuclear transfer kunnen dus een oorzaak zijn voor LOS en andere problemen. Er is nog onvoldoende onderzoek gedaan om de twee factoren te scheiden [Young en Fairburn, 2000].

4.3 welzijnsschade als gevolg van de genetische verandering

De hoeveelheid ongerief ten gevolge van de biotechnologische procedures (inclusief insertiemutaties) is over het algemeen kleiner dan de hoeveelheid ten gevolge van de expressie van het transgen [van der Meer, 2001].

Er kan hierbij onderscheid gemaakt worden tussen twee types schade. Ten eerste de **intentionele** schade die optreedt als gevolg van de nieuwe genen (of de knock-out van een eigen gen), deze is als het goed is redelijk voorspelbaar en humane eindpunten kunnen hiervoor vastgesteld worden. Ten tweede is er de **onverwachte** schade als gevolg van onvoorspelbare effecten van het nieuwe gen (verstoring van complexe systemen, overexpressie, expressie op verkeerde momenten of plaatsen, onbekende interacties met lichaamseigen producten etc.).

Wat deze schade inhoudt hangt volledig af van het genconstruct waar het om gaat. In het algemeen valt er weinig over te zeggen.

expressie van het ingebouwde genconstruct zoals het bedoeld is (intentionele schade)

Intentionele schade is het verwachte ziektebeeld. De kans op het optreden van dit verwachte ziektebeeld is zeer groot, de onderzoeker probeert immers een ziektemodel te maken. Het exacte ongerief hangt af van het ziektemodel waar het om gaat. Om dit ongerief te beperken gebruikt men vaak induceerbare mutaties (zie ook het kader in paragraaf 2.3) of genconstructen waarvan de expressie beperkt blijft tot bepaalde weefsels of ontwikkelingsmomenten. Onbekend is hoe groot de kans is dat zo'n construct alsnog onverwacht, dan wel op de verkeerde plaats of tijd tot uitdrukking komt.

onbedoelde effecten van het ingebouwde transgen

Het kan zijn dat de stof die nieuw geassimileerd wordt, of niet meer geassimileerd wordt, een onbekende rol heeft in een complexer systeem, waardoor dit complete systeem verstoord wordt. Het is niet bekend hoe groot de kans hierop is.

Het kan ook zijn, met name bij micro-injectie, dat er meerdere kopieën (tot 1000+) in het genoom ingebouwd zijn, waardoor het gen veel te sterk tot expressie komt. Hierdoor kunnen extreme effecten ontstaan als het gen effect heeft op de ontwikkeling. Of er kunnen toxische concentraties ontstaan van de stof die geassimileerd wordt.

Bij het inbouwen van een gen van een andere soort kan het zijn dat de stof die geassimileerd wordt een eerder onbekende interactie aangaat met een lichaamseigen stof, waardoor ongerief voor het dier kan ontstaan. De kans hierop is eveneens onbekend.

gevolgen van de gebruikte achtergrondstam

De achtergrondstam die gebruikt wordt voor het maken van een nieuwe lijn wordt vaak als factor over het hoofd gezien. Afhankelijk van het effect dat men wil bereiken kan deze echter wel degelijk zeer relevant zijn (denk bijvoorbeeld aan een 'agressie' gen in een van nature al agressievere stam). De gebruikte stam heeft een sterke invloed op de manier en de mate waarin een genconstruct tot expressie komt. Voor het maken van transgenen worden vaak dezelfde inteeltstammen gebruikt als gastheer, en dan met name twee stammen genaamd '129' en 'C57Bl/6'. Dit zijn echter beide stammen die stereotiep gedrag vertonen, wat ongerief kan veroorzaken voor de muis zelf en voor zijn kooigenoten [Hazekamp et al., 1999].

Een ander probleem is dat men inteeltstammen gebruikt (dit is nodig om de variatie binnen het experiment te beperken), die juist vanwege hun gebrek aan genetische variatie vaak veel ernstiger fenotypes vertonen dan wildtype muizen [Doetschmann, 1999]. Bovendien zijn ze om dezelfde reden ook vatbaarder voor ziektes.

4.4 vervolgschade

Als een lijn eenmaal gecreëerd is, kan bij het verder doorfokken mogelijk leed zich nog voortzetten, de **vervolgschade**. Dat kan dan zowel om intentionele als om onbedoelde schade gaan. Het doorfokken met dieren die als gevolg van een genetische modificatie ongerief ondervinden, wordt beschouwd als een dierproef [Voedsel en Waren Autoriteit, 2003]. In sommige gevallen blijven er veel 'overtollige' dieren geboren worden, die dan gewoonlijk gedood worden [Robinson et al., 2003]. In 2003 zijn er in totaal 109.631 transgene muizen gedood, die geen onderdeel uitmaakten van een experiment. Het gaat dan vaak om proeven waarbij ofwel alleen de mannetjes, of alleen de vrouwtjes gebruikt worden. Dit wordt alleen als dierproef geregistreerd wanneer het gaat om een lijn die per definitie ongerief vertoont [Voedsel en Waren Autoriteit, 2003].

In aanvragen staat daarnaast vaak dat men van plan is om gemaakte transgene lijnen met elkaar te kruisen. Men verkrijgt dan een zogenaamde 'dubbelmutant'. Deze vertoont vaak veel ernstigere gezondheidsschade dan zijn ouders. Het is voor de CBD moeilijk om dit te toetsen, omdat het in letterlijke zin niet onder de vergunningsplicht valt (er wordt geen embryo gemanipuleerd). De CBD weegt het echter wel mee.

Ook kan onbedoelde schade in sommige gevallen pas in latere generaties naar boven komen. Bijvoorbeeld: de vrouwtjes van de nieuwe stam kunnen om de een of andere reden heel slechte moeders blijken, waardoor de pupsterfte enorm hoog is. Ook kan het gebeuren dat een gezondheidsprobleem alleen bij vrouwtjes of alleen bij mannetjesmuizen voorkomt, waardoor het pas later opgemerkt wordt.

Als laatste zou je onder vervolgschade nog het experiment zelf kunnen rekenen. Dat is echter vaak vertrouwelijk en daarom niet geschikt voor de openbare procedure van de CBD. De DEC beoordeelt het uiteraard wel. Het activeren van een induceerbare mutatie (zie kader op blz.15) als onderdeel van dat experiment, valt echter wel degelijk onder de CBD-procedure.

4.5 de beschikbaarheid van kennis over de Nederlandse situatie

Er bestaat geen Nederlandse databank voor welzijnsgegevens van laboratoriummuizen. Er zijn wel internationale databanken over inteeltstammen, maar die laten welzijn gewoonlijk buiten beschouwing. De enige bron van informatie zijn de artikelen die wetenschappers publiceren na afloop van hun onderzoek. Er is hierover in Nederland echter wel eerder, in 1999, een onderzoek uitgevoerd [Hazekamp et al., 1999]. In 2003 is een herziene versie van dit rapport verschenen [Cohen et al., 2003]. Hoewel dit rapport onder wetenschappers niet onomstreden is, wordt er toch veel naar verwezen in dit rapport: het is namelijk vrijwel de enige bron die concrete cijfers geeft over schade bij transgene muizen.

Hazekamp et al. hebben in 1999 een inventarisatie uitgevoerd van de beschikbare kennis over welzijnseffecten in drie Nederlandse instellingen voor het maken van transgenen. Hun conclusies waren dat er onvoldoende kennis beschikbaar is over de welzijnseffecten van biotechnologie op dieren om hier goed onderbouwde discussies over te voeren. Niet alleen het maatschappelijk debat lijdt hieronder, ook onderzoekers worden met onverwachte neveneffecten geconfronteerd en adviescommissies missen informatie voor het geven van goede adviezen.

Het blijkt dat er bij onderzoekers en andere betrokkenen bij het maken van transgenen wel degelijk al veel informatie aanwezig is, maar dat deze om diverse redenen niet gepubliceerd wordt (oa. omdat men geen tijd wil besteden aan zaken die toch niet beoogd werden en omdat welzijnsproblemen negatieve nieuws waarde hebben).

Gegevens over transgene lijnen, zoals voortplantingssucces en gezondheidsproblemen worden intern wel bijgehouden, maar niet gepubliceerd. Het is echter wel een bestaande bron van gegevens. Gedurende 6 maanden zijn door Hazekamp et al. alle gebeurtenissen in drie 'transgene units' geregistreerd, zodat er een goed beeld is ontstaan van het wel en wee van genetisch gemodificeerde muizen in laboratoria anno 1999. Ongeveer 8500 nesten zijn geanalyseerd. Tijdens een bijbehorende workshop bleek dat de resultaten representatief waren voor ten minste drie andere locaties.

De kans op het succesvol creëren van een founder hangt af van onder meer de werking van het genconstruct, de ervaring en opleiding van de analisten en de kwaliteit van het in te brengen DNA. Het gemiddelde percentage geslaagde transgenen bij micro-injectie is 10,2%. Er zijn ongeveer 50 dieren nodig om één founder te produceren, waarvan er gemiddeld 27 gedood worden. Al deze dieren dienen geregistreerd te worden bij registratie van biotechnologisch onderzoek. Bij embryonale stamcelinjectie is het percentage geslaagde chimere 50,5%. Het aantal geslaagde mutanten in F1 ligt vervolgens tussen de 25,6 en de 0,9%. Dit is nog te variabel om een gemiddelde te geven.

Er blijkt meer sterfte te zijn onder nakomelingen van transgenen dan onder die van wildtype dieren: drie maal zoveel pups worden dood geboren (4,7% tegen 1,3%) en ruim twee maal zo veel sterven voor of tijdens het spenen (21% tegen 9%).

Ook is er niet genoeg tijd binnen de laboratoria om de transgenen voortdurend goed te monitoren. Hazekamp et al. [1999] adviseren om hiervoor een gespecialiseerde welzijnsmedewerker aan te stellen. Het ongerief wordt nu door de onderzoekers bijgehouden, maar hiervoor is geen standaard, noch zijn deze mensen daarvoor getraind. De welzijnsmedewerker dient dit te doen, de gegevens noteert deze in een centraal databestand. Ook houdt hij contact met de patholoog, samen vormen zij dan het welzijnsteam. In de praktijk blijkt het instellen van zo'n speciale medewerker echter niet haalbaar, bovendien zouden diens werkzaamheden sterk overlappen met die van de artikel 14 functionaris [Baumans, pers. med., 2004].

Het voortdurend monitoren van de transgenen en het centraal registreren van deze gegevens is op zich wel een goed idee. Zulke centrale databestanden bestaan nu nog niet, hoewel enkele instellingen al wel hun eigen, plaatselijke databank hebben. In zo'n bestand zouden alle relevante gegevens over alle gebruikte lijnen moeten komen, met betrekking tot fok, ontwikkeling en andere specifieke eigenschappen en ongeriefscores per lijn [Cohen et al., 2003].

Conclusies en aanbevelingen

5.1 de resultaten van het onderzoek

In dit hoofdstuk wordt de doelstelling van dit onderzoek, zoals geformuleerd in paragraaf 1.2.3 op pagina 11, uitgewerkt: de formulering van vragen voor een schade-effectrapportage en het opstellen van aanbevelingen voor databanken. In paragraaf 5.2 staat welke informatie er redelijkerwijs meer gevraagd zou kunnen worden in een schade-effectrapportage dan nu gevraagd wordt. Daarna komt in paragraaf 5.3 de monitoring van effecten van een genetische verandering aan bod, en het opzetten van databanken om die informatie in te verzamelen. Onder andere met behulp van de meningen van de acht deskundigen die voor dit onderzoek geïnterviewd zijn, worden dan aanbevelingen gedaan voor verbetering van de beschikbaarheid van kennis. In de laatste paragraaf, 5.4, worden alle aanbevelingen uit de eerdere paragrafen nog eens kort samengevat.

5.2 de beschikbare informatie en de lacunes daarin

5.2.1 wat is bekend en wat niet?

De hoofdvraag in dit rapport is welke informatie er redelijkerwijs meer gevraagd zou kunnen worden dan nu het geval is, in een schade-effectrapportage ten behoeve van een vergunning voor het maken van transgene dieren.

Het probleem met de huidige vraag op het formulier (vraag 19, zie Bijlage 1) is dat er gevraagd wordt naar een *voorspelling* van de effecten van een genetische verandering. Omdat deze specifieke verandering per definitie nooit eerder heeft plaatsgevonden (anders zou de vergunning niet verstrekt worden) vinden veel onderzoekers dit een onzinnige vraag. Wat kunnen ze immers zeggen over de effecten van iets dat nog niet gebeurd is? Hun antwoorden blijven dan ook vaak oppervlakkig en ze gebruiken, zoals in hoofdstuk twee al geconcludeerd is, vaak argumenten die niet ter zake doen of geen antwoord zijn op de gestelde vraag.

Het zou beter zijn als in deze vraag naar *risico's* gevraagd werd, in plaats van naar *effecten*. Dat is namelijk iets waarover **wel** kennis aanwezig is. Welke risico's er bestaan is over het algemeen redelijk in kaart gebracht. In hoofdstuk vier van dit rapport is getracht daar een zo volledig mogelijk beeld van te geven. Van een aantal van die risico's is ook al de omvang bekend, althans een schatting daarvan aan de

hand van de huidige kennis - zie tabel 5.1. Van een aantal is die niet bekend, maar met gericht onderzoek, experimenteel dan wel inventariserend, zouden ook die gegevens gevonden kunnen worden.

In tabel 5.1 is een lijst opgesteld van alle mogelijke risico's voor de muizen en de incidentie/omvang van elk risico, voor zover bekend. Het gaat hierin om de tweede, derde en vierde soort schade zoals die in hoofdstuk vier gedefinieerd zijn. De getallen in de tabel zijn weergaven van de op dit moment beschikbare kennis. De hoeveelheid bronnen voor exacte percentages is op dit moment zeer beperkt, dus deze inschattingen zouden in de loop van de tijd nog sterk kunnen veranderen.

Tabel 5.1

Risico's voor gezondheid en welzijn van de muis bij het maken van transgene lijnen

Risico	Incidentie van schade	Uitbreiding van de kennis door
Dodgeboorte	4,7%; normaal is dat 1,3% ^a	Bijhouden en inventariseren
Pupsterfte	21%; normaal is dat 9% ^a	Bijhouden en inventariseren
Kannibalisering van de pups door de moeder	Onbekend	Gericht onderzoek, permanente observatie van dieren
Schadelijke effecten van chimeer zijn (alleen bij ES)	Onbekend	Inventarisatie, gecombineerd met gericht onderzoek
Schadelijke insertionele mutaties	MI: 5-15% ^a of 7-20% ^b ES: <5% ^a	Inventarisatie, gecombineerd met gericht onderzoek
Letale homozygotie	Onbekend (vrij hoog? ^a)	Inventarisatie van doodgeboortes en pupsterfte
LOS en vergelijkbare syndromen als gevolg van methylatieveranderingen	Bij Nuclear transfer is 96% gevonden ^c , voor andere technieken onbekend	Gericht onderzoek
De intentionele effecten van het genconstruct	Als het goed is bijna 100%; maar in het geval van kruisingen tussen verschillende transgene lijnen zijn deze vaak onvoorspelbaar.	nvt
Onbedoelde schadelijke effecten van het genconstruct	Onbekend	Inventarisatie, gecombineerd met gericht onderzoek

^a[Hazekamp et al., 1999]

^b[van Reenen, pers. med., 2004]

^c[Roemer et al., 1997]

Een gedeelte van de effecten is wel volledig voorspelbaar, namelijk de effecten op de (niet-transgene) dieren die nodig zijn voor het creëren van een transgene founder (bijvoorbeeld de embryodonoren) – de ‘eerste’ vorm van schade uit hoofdstuk vier. Ook de mate van ongerief voor deze dieren is van tevoren bekend.

De vijfde vorm van schade, de vervolgschade, is een andere kwestie. Gedeeltelijk hangt deze af van de intentionele schade ofwel de schade die te voorspellen valt (zie paragraaf 4.3). De onbedoelde vervolgschade daarentegen is moeilijk van tevoren te voorspellen. Pas nadat een nieuwe lijn gemaakt is wordt duidelijk of dit een probleem zal zijn. Daarmee komen we bij een nieuw knelpunt: de monitoring nadat de transgene lijn gemaakt is.

5.2.2 **aanbevelingen voor het uitbreiden van de kennis**

Voor de ‘eerste’ vorm van schade, de vaststaande schade als gevolg van de techniek, zou men heel gemakkelijk een korte standaardlijst met ongeriefscores bij het formulier kunnen voegen. Daarop hoeven dan alleen eventuele afwijkingen van de standaardprocedure en de redeneringen achter die afwijkingen genoteerd te worden. Tabel 5.2 is een aanzet tot zo’n lijst.

Tabel 5.2
Voorspelbaar ongerief als gevolg van de techniek

Betrokken dieren	Oorzaak en mate van ongerief
Eiceldonoren	Hormooninjectie voor de superovulatie: <i>gering</i> Paring op zeer jonge leeftijd: <i>onbekend</i> Operatie met dodelijke afloop: <i>gering</i>
Embryo’s	Risico op onbedoelde DNA-schade: <i>variabel</i>
Dekmannetjes	Vasectomie (operatie): <i>matig</i>
Fostermoeders	Implantatie embryo’s (operatie): <i>matig</i>
Pups	Intentionele schade: <i>variabel</i> Verhoogde kans op kannibalisme: <i>ernstig</i> Genotypering: <i>gering tot matig</i> Fenotypering: <i>gering tot matig</i> Doden van de niet-transgenen: <i>gering</i>

Een probleem aan deze lijst is echter het oordeel dat gegeven wordt over de ernst van het ongerief. Dit probleem kwam al naar voren in hoofdstuk vier, waar ook oordelen werden gegeven over de mate van ongerief (waaronder de inschattingen in Tabel 5.2). Net als in hoofdstuk vier zijn deze hier dus afgeleid van het meer dan vijftien jaar oude lijstje van de Veterinaire Hoofdinspectie van de Volksgezondheid [1989]. Op dit moment is er namelijk geen officiële voorbeeldlijst meer. Het zou een

goede zaak zijn om weer zo'n voorbeeldlijst in te stellen. Zeker voor een veelgebruikte procedure als het maken van transgenen moet dat geen groot probleem zijn.

Voor alle vormen van schade behalve de eerste zou het beter zijn als men vroeg naar *risico's*, in plaats van naar *effecten*. Dat is namelijk iets waarover **wel** van tevoren kennis aanwezig is, althans gedeeltelijk (tabel 5.1). Deze kennis dient nog wel verder uitgebreid te worden. Als dat niet lukt vanuit de onderzoeksgroepen en universiteiten, zou de overheid hiervoor fondsen vrij kunnen maken, of dit soort onderzoek anderszins stimuleren. In tabel 5.1 staat heel kort voor elk risico aangegeven welk type onderzoek het meest geschikt is om de kennis over de incidentie ervan uit te breiden.

5.3 monitoring van effecten en verzameling van kennis in databanken

5.3.1 de huidige toestand en de visie van de deskundigen

Op dit moment heeft de CBD een zeer beperkte terugkoppeling achteraf van de onderzoeken waarvoor ze toestemming geeft. Deze bestaat eigenlijk alleen uit de verplichting om bij een verlenging van een vergunning het welzijnsdagboek over de afgelopen vergunningsperiode te overhandigen. Als een vergunning niet verlengd wordt, doet de CBD helemaal niets met de verzamelde welzijnsgegevens. Veel van de geïnterviewde deskundigen vinden dit een zwak punt in de procedure.

Op deze manier komt er helaas niet snel meer kennis beschikbaar over de gevolgen van transgenese voor de dieren.

Slechts één van de deskundigen heeft bezwaar tegen het idee van een openbare databank. Het bezwaar dat diegene had is de vrees dat mensen er alleen in zullen lezen wat hen uitkomt, omdat de context van een artikel ontbreekt.

De uitvoering van zo'n project is een heel andere kwestie. Binnen Nederland zien de meeste deskundigen het niet snel gebeuren, omdat het veel te veel moeite en tijd zou kosten, terwijl zo'n project juist flexibiliteit en snelheid nodig heeft. Ook veelgenoemd is het feit dat er in Nederland te weinig onderzoek aan transgenen plaatsvindt om in deze aspecten snel meer inzicht te krijgen, waardoor het alleen als internationaal project zinvol zou zijn. Nederland zou zich dan het beste kunnen aansluiten bij een bestaand initiatief, zoals Tbase (een databank over inteeltlijnen) [Dennis, 2002].

Een andere visie is dat de informatie nu eigenlijk al beschikbaar is, in de vorm van de welzijnsdagboeken. Deze zouden heel goed gebruikt kunnen worden als bron voor een databank. Dat zou ook goed zijn voor de motivatie van degenen die dit invullen. Die zien het welzijnsdagboek nu vaak als overbodig werk, omdat er achteraf meestal niets meer mee gebeurt.

5.3.2 aanbevelingen wat betreft databanken

Er kan een nationaal programma opgezet worden voor het monitoren van de transgene lijnen. Aspecten zoals doodgeboorte, pupsterfte en letale homozygotie kunnen prima op zo'n manier geïnventariseerd worden – zie Hazekamp et al. [1999]. Een commissie zoals die van Hazekamp zou hiervoor permanent aangesteld kunnen worden. Dat kan vanuit de overheid, maar het zou ook een interuniversitair initiatief kunnen zijn, er zouden namelijk heel goed interessante publicaties uit zo'n onderzoek kunnen voortkomen. Een mogelijkheid zou een interuniversitaire commissie zijn, met tevens een lid vanuit de CBD en één vanuit de inspectie.

Men zou tevens de informatie uit de verplichte welzijnsdagboeken na afloop van een onderzoek in een centrale databank kunnen invoeren. Zo'n project zou het beste vanuit de overheid gecoördineerd kunnen worden, omdat zij degene is die het welzijnsdagboek verplicht stelt. De uitvoering gebeurt dan wel door de universiteiten zelf, aangezien die de juiste expertise hebben.

Vervolgens kan een begin gemaakt worden met het opzetten van een nationale, openbaar toegankelijke databank. Dit is veel werk en om het op korte termijn zinvol te maken moet volgens de deskundigen aansluiting gezocht worden bij internationale initiatieven.

5.4 uitbreiding vragenlijst schade-effectrapportage

5.4.1 voorstel voor een uitgebreide vragenlijst

In plaats van de huidige vraag negentien op het aanvraagformulier (zie Bijlage 1) zou een meer uitgebreide vragenlijst geschikter zijn voor een goede inschatting van de welzijns- en gezondheidsschade bij transgene dieren. Artikel 67 van de GWD eist nu al een effectrapportage met betrekking tot de schade aan gezondheid en welzijn. Het aanvraagformulier zal dus geheel binnen de bestaande wet aangepast kunnen worden.

Veel van de geïnterviewde onderzoekers vrezen voor een verdere verzwaring van de procedure. Ze waarschuwen dat verdere vertragingen in de procedure, die nu al meer dan zes maanden duurt, alleen maar weezin zal oproepen. Enkelen vrezen zelfs dat het zou kunnen resulteren in verplaatsing van onderzoek naar het buitenland. De eis van een schade-effectrapportage is letterlijk gezien echter geen 'verzwaring' van de procedure, maar slechts een kwestie van een verbeterde naleving van de wet. Om een goede afweging te kunnen maken, moet de CBD beschikken over volledige informatie.

De onderstaande vragen zijn echter op zo'n manier geformuleerd dat het antwoord makkelijk op te zoeken is voor een onderzoeker die goed in de materie thuis is. Per vraag is duidelijk om welk aspect van de techniek het gaat en in plaats van meningen wordt er gevraagd naar feiten, kansen of gefundeerde inschattingen. Hoewel het dus wel degelijk een uitbreiding van de procedure is om deze vragen te stellen, is het slechts in geringe mate een verzwaring.

Uitbreiding vragenlijst

Toelichting: vermeld bij alle gegeven percentages of inschattingen de bron. Vermeld eventuele verfijningen en geef een redenering wanneer mogelijke verfijningen niet toegepast (kunnen) worden.

De eerste vorm van schade: standaardschade door de techniek

- 1) Hoeveel dieren zijn nodig voor het creëren van de lijn(en) en in welke mate zullen deze dieren ongerief ondervinden? (*Zie Tabel 5.2 voor ongeriefschattingen.*) Geef ook aan welke methodes gebruikt zullen worden voor anesthesie, analgesie, het doden van de muizen en de genotypering van de pups.

Hoeveel van deze dieren zullen naar schatting gedood worden gedurende het proces van het creëren van de transgene lijn? (Gemiddeld zijn dat 81 van de 150)

- 2) Hoe zullen de muizen gefenotypeerd worden? (Als dit een standaard testbatterij is, referentie vermelden) Zou dit ongerief kunnen veroorzaken en hoe ernstig zal dat ongerief zijn?

De tweede vorm van schade: onbedoelde schade door de techniek

- 3) Welke van de onderstaande typen onbedoelde schade kunnen mogelijk optreden bij de gebruikte techniek en diersoort? Geef zo mogelijk percentages, anders een inschatting (gering/redelijk/groot/zeker).
- Insertionele mutaties + letale homozygotie
 - Overexpressie van het construct of verkeerd getimedde/gelokaliseerde expressie (ook bij induceerbare expressie de kans geven op ongewenste expressie)
 - LOS (large offspring syndrome) en vergelijkbare syndromen als gevolg van de *in vitro* manipulatie van het embryo (methylatieveranderingen)

De derde vorm van schade: de intentionele effecten van het genconstruct

- 4) Wat zijn de te verwachten directe effecten van elk van de gebruikte constructen op de gezondheid en het welzijn van de dieren? Geef ook schattingen van ongeriefniveaus en zo mogelijk de kans op optreden en de duur van de schade. Hiervoor kan gekeken worden naar de symptomen van mensen met de betreffende ziekte (in geval van een ziektemodel) en naar symptomen van vergelijkbare transgenen.
- 5) Bent u van plan kruisingen uit te gaan voeren tussen de aangevraagde transgene lijnen of tussen de aangevraagde lijn(en) en al bestaande lijnen? Welk(e) fenotype(s) probeert u daarmee te bereiken? Geef een inschatting van de gezondheids- en welzijnsschade (en de kans daarop) die daarbij naar verwachting zal kunnen optreden.

De vierde vorm van schade: de onbedoelde effecten van het genconstruct

- 6) Bestaan er (internationaal) al vergelijkbare modellen? Zo ja, wat is hierover bekend aan (onverwachte) gezondheids- en welzijnsproblemen dat mogelijk relevant zou kunnen zijn voor uw transgene lijn(en)?
- 7) Wat is/zijn de gebruikte achtergrondstam(men)? Is/zijn hiervan specifieke welzijnsproblemen bekend? Zo ja, welke? (129, bijvoorbeeld, vertoont stereotiep gedrag) Zouden deze problemen kunnen interfereren met uw transgene diermodel?

De vijfde vorm van schade: de vervolgschade

- 8) Geef een zo exact mogelijke schatting (max./min.) van het aantal transgene dieren dat u in het kader van deze vergunning zal gaan fokken (gerekend vanaf de founder(s)). Hoeveel van deze dieren zullen naar verwachting ongerief ondervinden en hoe ernstig zal dat ongerief zijn?

Bijvoorbeeld:

Aantal dieren: (minimaal 10 experimenten met 5 keer 6 muizen → 10x30=) 300 muizen minimaal, maximaal 400 muizen (evt. 2 experimenten extra en ter vervanging van zieke dieren). Bij de fok zullen alleen de transgene dieren zelf betrokken zijn, wat in totaal een verdubbeling van het bovengenoemde aantal van 300-400 betekent (want alleen de mannetjes zullen in de experimenten gebruikt worden). Totaal: 600-800 muizen.

Te verwachten ongerief: van de transgene fokdieren zal 0-5% gering ongerief ondervinden (het gaat om een conditionele modificatie). Van de dieren gebruikt voor de experimenten zal naar verwachting 45% gering ongerief ondervinden, ongeveer 50% matig ongerief en <5% ernstig ongerief. Voor de laatste categorie zijn in overleg met de DEC humane eindpunten vastgesteld.

Geef ook aan hoeveel niet-transgene dieren hierbij naar schatting betrokken zullen zijn in het kader van de fok.

5.4.2 aanbevelingen

Het is wenselijk dat de CBD naast de bovenstaande vragenlijst een lijst aanlegt van mogelijke verfijningen op elk punt van de procedure. De publicatie van Robinson et al. [2003] zou hiervoor een goed startpunt kunnen zijn. Deze kan dan bij elke aanvraag naast het ingevulde formulier gelegd worden. Bij elke verfijning die niet toegepast is (zonder opgave van reden) kan dan een aanvullende vraag gesteld worden. Dit stimuleert ook de onderzoekers om nog eens te overwegen of hun onderzoek wel op de meest optimale manier plaatsvindt.

Op deze manier komt er veel meer informatie over welzijnsproblemen bij transgenen beschikbaar dan nu het geval is. Ook voor de wetenschappers zelf zal de bruikbare informatie toenemen. Een groot voordeel is dat de gebieden waarop verder onderzoek nodig is, zo bij elk nieuw formulier opnieuw onder de aandacht komen. Dat zal zeker het vergroten van de betreffende kennis stimuleren.

5.5 alle aanbevelingen samengevat

Het is wenselijk dat de minister van LNV de CBD opdracht geeft om

- een standaardlijst te gaan gebruiken met schade als gevolg van de technieken om transgene lijnen te maken (zie Tabel 5.2), waarop door de aanvrager alleen afwijkingen vermeld hoeven te worden.
- een uitgebreidere maar ook veel specifiekere vragenlijst in te voeren, zoals voorgesteld in paragraaf 5.3, in plaats van de huidige vraag 19 (zie Bijlage 1).
- een lijst op te stellen met mogelijke verfijningen voor elk onderdeel van een techniek, die bij elke aanvraag naast het formulier gelegd kan worden.
- een terugkoppeling te maken van de gegevens uit de welzijnsdagboeken, na afloop van een onderzoek.

Het is wenselijk dat de overheid

- een officiële voorbeeldlijst opstelt met ongeriefbeoordelingen voor transgene lijnen.
- een nationaal programma opzet voor de monitoring van bestaande transgene lijnen.
- gericht onderzoek (zo nodig) faciliteert en stimuleert om de kennis te vergroten over de mogelijke risico's bij transgenese en de incidentie ervan (zie tabel 5.1).
- de resultaten van de bovenstaande twee projecten en/of de gegevens uit de welzijnsdagboeken beschikbaar maakt in een openbare databank.

Verklarende woordenlijst

Achtergrondstam	De muizenstam waarvan het DNA veranderd wordt om een transgene lijn te maken.
Allel	Een variant van een bepaald gen; gewoonlijk bevat een cel van elk gen twee allelen.
Artikel 14 functionaris	De wettelijk verplichte proefdierdeskundige van een instituut.
Biopsie	Het nemen van een weefselmonster van een levend dier.
Blastocyst-stadium	Het ontwikkelingsstadium van een embryo waarin dit de vorm heeft van een bol met een holle binnenkant.
Chimeer	Een muis die ontstaan is uit een vermenging van cellen van twee genetisch verschillende muizen, herkenbaar aan een gevlekte vacht.
CBD	Commissie Biotechnologie bij Dieren.
Conditionele modificatie	Een genetische verandering die pas na toediening van bepaalde stoffen een effect heeft.
DEC	Dierexperimentencommissie.
DNA-methylatie	<i>Zie Methylatie.</i>
Electroporatie	Het door middel van een elektrische puls doorlaatbaar maken van de cel voor grote moleculen (zoals DNA).
Embryonale stamcelinjectie	De techniek voor het maken van transgenen waarbij gemodificeerde stamcellen uit het ene embryo geïnjecteerd worden in de blastocyst van een normale muis. Deze versmelten vervolgens tot een enkel, transgeen, embryo.
Embryonale stamcellen	Cellen uit het binnenste van een vroeg embryo, die zich in potentie nog tot elk weefseltype kunnen ontwikkelen.
ES	<i>Zie Embryonale Stamcelinjectie.</i>
Fenotype	Het geheel van de zichtbare (of meetbare) karakteristieken van een organisme.
Fenotyperen	Het bepalen van de uiterlijke, fysiologische en gedragskenmerken van een organisme.
Fostermoeder	De vrouwtjesmuis die de transgene embryo's geïmplanteerd krijgt; ze voldraagt, baart en zoogt de pups tot ze drie weken oud zijn.
Founder	Het 'startdier' van een transgene lijn.

G₀	De pups die als embryo transgeen gemaakt zijn. (<i>Generatie 0</i>)
G₁	De nakomelingen van G ₀ .
Gastheer-DNA	Het DNA van het transgeen te maken organisme.
Genconstruct	Het veranderde gen dat men in het transgeen te maken organisme inbrengt, inclusief eventuele hulpgenen (bijvoorbeeld om de modificatie conditioneel te maken).
Genotype	De genetische samenstelling van een organisme, al zijn DNA.
Genotyperen	Het bepalen van de genetische samenstelling van een organisme.
Heterozygoot	Een organisme dat twee verschillende allelen voor een bepaald genenpaar bezit. In dit geval één 'normale' en één gemodificeerde versie.
Homozygoot	Een organisme dat twee gelijke allelen voor een bepaald genenpaar bezit. In dit geval tweemaal de gemodificeerde versie.
Homozygotie, letale	Het verschijnsel dat dieren die tweemaal de gemodificeerde variant van een gen bezitten voor of rond de geboorte sterven.
Insertionele mutatie	Schadelijke verandering in het DNA, veroorzaakt doordat een genconstruct midden in een belangrijk ander gen ingebouwd wordt.
Inteeltstam	Een muizenstam waarbinnen nauwelijks genetische variatie bestaat (door meer dan 20 generaties van broer x zus kruisingen).
<i>In vitro</i>	'Buiten het lichaam', ofwel in een reageerbuis/petrischaal.
<i>In vivo</i>	In een levend organisme.
Knock-in	Een organisme waarbij de expressie van een specifiek gen versterkt of veranderd is.
Knock-out	Een organisme waarbij de expressie van een specifiek gen uitgeschakeld is.
Large offspring syndrome	Een verzamelnaam voor een aantal symptomen, waaronder een verhoogd geboortegewicht, dat met name bij gekloond vee vaak waargenomen wordt.
LOS	<i>Zie Large Offspring Syndrome.</i>
Methylatie	Een natuurlijk proces in de cel voor het aan of uitschakelen van genen.
MI	<i>Zie Microinjectie.</i>
Microinjectie	De techniek voor het maken van transgenen waarbij bevruchte eicellen het genconstruct geïnjecteerd krijgen en vervolgens uitgroeien tot transgene embryo's.
Model	Ook wel diermodel. Het gebruiken van een andere diersoort om menselijke ziektes of afwijkingen te bestuderen.
Morula-stadium	Het ontwikkelingsstadium van een embryo waarin dit de vorm heeft van een massieve bol.
Mozaïcisme	Het verschijnsel (bij MI) dat het genconstruct zich slechts in een deel van de cellen van het transgene organisme bevindt.
Overexpressie	Een sterkere expressie van een gen dan gewoonlijk.
Pronucleaire microinjectie	<i>Zie Microinjectie.</i>
Pseudozwanger	De hormonale toestand van een vrouwtjesmuis nadat ze gepaard heeft met een onvruchtbaar mannetje. Ze zal in deze toestand geïmpla-

	teerde embryo's niet afstoten.
Recessief	Het recessieve allel van een gen is het allel dat <i>niet</i> tot uitdrukking komt, als er twee verschillende allelen van dat gen aanwezig zijn (en het organisme dus <i>heterozygoot</i> is).
Stereotiep gedrag	Schijnbaar doelloos, herhaald gedrag met een vast patroon, bijvoorbeeld cirkels lopen, op en neer springen, etc.
Superovulatie	Een hormonaal opgewekte eisprong, waarbij meer eicellen dan gewoonlijk vrijkomen.
Transgeen	Een organisme dat (op kunstmatige wijze) genetisch veranderd is.
Transgen	Een genconstruct dat in een transgeen te maken organisme wordt ingebracht.
Vasectomenen	Het steriliseren (onvruchtbaar maken) van een mannetjesdier.
Wildtype	Een muis die niet van bepaalde transgene lijn komt.

Literatuurlijst

Baumans, V. (2004)

Persoonlijke mededeling. Proefdierdeskundige, Universiteit Utrecht.

Bishop, J. (1999)

Transgenic Mammals. Pearson Education Limited, Harlow, Essex.

Brom, F. W. A., M. T. Hilhorst, R. H. J. ter Meulen en J. M. G. Vorstenbosch (1996)

Het toetsen van biotechnologische handelingen bij dieren. Rapport van een commissie van externe deskundigen ten behoeve van de Commissie Biotechnologie bij Dieren. Utrecht.

Broome, R. L., L. Feng, Q. Zhou, A. Smith, N. Hahn, S. M. Matsui en M. Bishr Omary (1999)

Non-invasive transgenic mouse genotyping using stool analysis. Federation of European Biochemical Societies Letters 462: 159-160.

Caplen, N. J. (1998)

Lentiviral vectors: aids for gene therapy. Molecular Medicine Today 4(2): 51.

Cock Buning, T. de (2004)

Persoonlijke mededeling. Vrije Universiteit, Amsterdam.

Cohen, N., A. Hazekamp en T. de Cock Buning (2003)

Gezondheid en welzijn van genetisch gemodificeerde dieren. Ministerie van LNV, directie Wetenschap en Technologie, Den Haag.

Commissie Biotechnologie bij Dieren (2004)

Aanvraagformulier voor een vergunning Biotechnologie bij dieren, versie juni 2004

www.minInv.nl → Biotechnologie

Commissie van Advies Ethiek en Biotechnologie bij Dieren (1990)

Ethiek en Biotechnologie bij Dieren. Rapport van de Commissie van Advies Ethiek en Biotechnologie bij Dieren, Wageningen.

Crawley, J. N. (1999)

What's wrong with my mouse? Wiley-Liss, New York.

Dean, W., L. Bowden, A. Aitchinson, J. Klose, T. Moore, J. J. Meneses, W. Reik en R. Feil (1998)

Altered imprinted gene methylation and expression in completely ES cell-derived mouse fetuses: association with aberrant phenotypes. *Development* 125: 2273-2282.

Dennis, M. B., Jr. (2002)

Welfare issues of genetically modified animals. *ILAR* 43 (2): 100-109.

Doerfler, W., R. Schubbert, H. Heller, C. Kämmer, K. Hilger-Eversheim, M. Knoblauch en R. Remus (1997)

Integration of foreign DNA and its consequences in mammalian systems. *Trends in Biotechnology* 15: 297-301.

Doetschmann, T. (1999)

Interpretation of phenotype in genetically engineered mice. *Laboratory Animal Science* 49 (2): 137-143.

Fentener van Vlissingen, M. (2004)

Persoonlijke mededeling. Erasmus Universiteit, Rotterdam.

Gandolfi, F. (2000)

Sperm-mediated transgenesis. *Theriogenology* 53: 127-137.

Hazekamp, A., N. Cohen en T. de Cock Buning (1999)

Gezondheid en welzijn van transgene dieren: data en voorlopige conclusies. Voorlopige gegevens gepresenteerd op de workshop gehouden op 1 december 1999 te Utrecht. Afdeling Dierproefvraagstukken, Universiteit Utrecht, Utrecht.

Ikawa, M., N. Tanaka, W. W.-Y. Kao en I. M. Verma (2003)

Generation of transgenic mice using lentiviral vectors: a novel preclinical assessment of lentiviral vectors for gene therapy. *Molecular Therapy* 8(4): 666-673.

Kafri, T., H. van Praag, F. H. Gage en I. M. Verma (2000)

Lentiviral vectors: regulated gene expression. *Molecular Therapy* 1(6): 516-521.

Maione, B., M. Lavitrano, C. Spadafora en A. A. Kiessling (1998)

Sperm-mediated gene transfer in mice. *Molecular Reproduction and Development* 50: 406-409.

McNeish, J. D., W. J. Scott en S. S. Potter (1988)

Legless, a novel mutation found in PHT1-1 transgenic mice. *Science* 241 (4867): 837-839.

Meer, M. van der (2001)

Transgenesis and animal welfare. Implications of transgenic procedures for the well-being of the laboratory mouse. Thesis Universiteit Utrecht, Labor Grafimedia BV, Utrecht.

Meer, M. van der (2004)

Persoonlijke mededeling. Universiteit Utrecht.

Naldini, L. (1998)

Lentiviruses as gene transfer agents for delivery to non-dividing cells. *Current Opinion in Biotechnology* 9: 457-463.

Paula, L. E. (2001)

Biotechnologie bij dieren ethisch getoetst? Rathenau Instituut, Den Haag.

Pinkert, C. A. (2003)

Transgenic animal technology: alternatives in genotyping and phenotyping. *Comparative Medicine* 53 (2): 126-139.

Reenen, C. G. van en H. J. Blokhuis (1997)

Evaluation of welfare of transgenic farm animals: lessons from a case study in cattle. *Transgenic Animals and Food Production; Proceedings from an International Workshop in Stockholm, May 1997.*

Reenen, C. G. van, T. H. E. Meuwissen, H. Hopster, K. Oldenbroek, Th. A. M. Kruip en H. J. Blokhuis (2001)

Transgenesis may affect farm animal welfare: A case for systematic risk assessment. *Journal of Animal Science* 79: 1763-1779.

Reenen, C. G. van (2004)

Persoonlijke mededeling. Animal Sciences Group, Wageningen.

Robinson, V., D. B. Morton, D. Anderson, J. F. A. Carver, R. J. Francis, R. Hubrecht, E. Jenkins, K. E. Mathers, R. Raymond, I. Rosewell, J. Wallace en D. J. Wells (2003)

Refinement and reduction in production of genetically modified mice. *Laboratory Animals*: 37, suppl. 1, July 2003.

Roemer, I. W. Reik, W. Dean en J. Klose (1997)

Epigenetic inheritance in the mouse. *Current biology* 7: 277-280.

Rozemond, H. (1990)

Genetische modificatie en welzijn van proefdieren. Ministerie van WVC, Den Haag.

Veterinaire Hoofdinspectie van de Volksgezondheid (1989)

Registratie dierproeven en proefdieren, Ministerie van VWS, Den Haag.

Vliet, J. van en F. Tillie (2000)

Evaluatie Besluit Biotechnologie bij Dieren. Informatie- en KennisCentrum Landbouw, Ede.

Voedsel en Waren Autoriteit (2003)

Zo Doende 2003. Jaaroverzicht van de Voedsel en Waren Autoriteit - Keuringsdienst van Waren over dierproeven en proefdieren, Den Haag.

Young, L. E., K. D. Sinclair en I. Wilmut (1998)

Large offspring syndrome in cattle and sheep. Reviews of Reproduction 3: 155-163.

Young, L. E. en H. R. Fairburn (2000)

Improving the safety of embryo technologies: possible role of genome imprinting. Theriogenology 53: 627-648.

Bijlage 1

de welzijnsvragen op het aanvraagformulier (19 en 20), inclusief toelichting

IV. INSCHATTING VAN DE EFFECTEN OP GEZONDHEID EN WELZIJN VAN DE DIEREN

19) Geef een inschatting van de mogelijke positieve en negatieve effecten van de te verrichten biotechnologische handelingen op de gezondheid, het welzijn, het gedrag, het uiterlijk en de zelfredzaamheid van de bij het onderzoek betrokken dieren? Wat zijn de eigenschappen van het beoogde fenotype? Geef het effect van de handelingen aan per lijn of groep van lijnen en/of kruising en/of conditionele modificatie en/of per beoogd fenotype.

20) Op welke wijze wordt de gezondheid, het welzijn en het functioneren van de bij het onderzoek, in het kader waarvan de biotechnologische handelingen worden verricht, betrokken dieren bewaakt en gecontroleerd? Op welk moment en aan de hand van welke criteria wordt beslist dat de dieren die ten gevolge van de biotechnologische handelingen schade aan gezondheid en welzijn ondervinden gedood worden?

TOELICHTING BIJ VRAAG 19 & 20

19) Artikel 67, lid 1 onderdeel b van de Gezondheids- en welzijnswet voor dieren stelt dat bij een aanvraag een "rapportage ter zake van de effecten van de handelingen op de dieren, waaronder begrepen

de gezondheid en welzijn van dieren” in ieder geval moet worden overlegd. Om hieraan te voldoen dient u zo concreet mogelijk aan te geven wat de gevolgen kunnen zijn van de biotechnologische handelingen en het te verrichten onderzoek op de gezondheid en het welzijn van de betrokken dieren en op de mogelijkheid van die dieren om “normaal” te kunnen functioneren. Vermeld zo mogelijk ook de te verwachten effecten op het gedrag, het uiterlijk, en de zelfredzaamheid van de te vervaardigen dieren. Indien mogelijke (bij)effecten van de handelingen niet ingeschat kunnen worden, dient hierbij - onder vermelding van de reden en voldoende onderbouwd - aangegeven te worden waarom deze vraag niet beantwoord kan worden. U wordt verzocht om voor de beantwoording van deze vraag gebruik te maken van de terminologie en indeling voor ongerief van proefdieren die in het kader van de Wet op de Dierproeven ontwikkeld zijn.

20) Geef aan met welke regelmaat en op welke wijze de gezondheid, het welzijn en het functioneren van de bij het onderzoek betrokken dieren gecontroleerd en beoordeeld wordt. Denk hierbij ook aan de faciliteiten zoals genoemd bij vraag 15. Geef ook aan of, en zo ja op basis van welke criteria en onder welke omstandigheden de dieren gedood worden.

*Uit: Aanvraagformulier voor een vergunning Biotechnologie bij dieren, versie juni 2004
Het volledige formulier is te downloaden op: www.minInv.nl → Biotechnologie*

Bijlage 2

lijst van geïnterviewden(8)

- Prof. dr. Tjard De Cock Buning. Hoogleraar Proefdiervraagstukken aan de Vrije Universiteit, Amsterdam, tevens CBD-lid.
- Dr. Martje Fentener van Vlissingen. Proefdierdeskundige, directeur van de Centrale Proefdierfaciliteit van het Erasmus MC Rotterdam, tevens CBD-lid.
- Dr. Marco Hoekman. Wetenschappelijk coördinator van de transgenese faciliteit van de Universiteit Utrecht.
- Drs. Janne Kuil. Beleidsmedewerker bij de Dierenbescherming, Den Haag, onder andere op het gebied van transgenen.
- Dr. Mirjam van der Meer. Hoofd van de Barrière-afdeling bij het GDL, waaronder het transgene lab van de Universiteit Utrecht valt.
- Ir. Kees van Reenen. Onderzoeker, Animal Sciences Group, WUR, Wageningen.
- Drs. Frank Wassenberg. Beleidsmedewerker bij Vereniging Proefdiervrij, Den Haag, onder andere op het gebied van transgenen.
- Prof. dr. Bert van Zutphen. Emeritus hoogleraar proefdierkunde.

Alle interviews zijn afgenomen in september en oktober 2004.

Interview

toelichting

Alle onderstaande vragen hebben, tenzij expliciet anders vermeld, betrekking op deel 4; vraag 19 en 20, op het 'Aanvraagformulier voor een vergunning Biotechnologie bij dieren', versie juni 2004. (Dit zal voor de geïnterviewden bijgevoegd worden.) Alleen de deelvragen hoeven beantwoord te worden door de respondenten.

hoofdvragen

- 1] Hoe vindt de schade-effectrapportage op dit moment plaats? (hoe ziet deze er uit en welke informatiebronnen worden gebruikt)
- 2] Wat zou er redelijkerwijze meer gerapporteerd kunnen worden dan nu het geval is?
- 3] Welke aanvullende vragen zouden daarvoor gesteld moeten worden?

deelvragen

Ad 1

Aan de onderzoekers:

- 1] Welke technieken worden er in uw laboratorium gebruikt om transgene muizen te creëren?
- 2] In het welzijns- en gezondheids gedeelte wordt niet of nauwelijks gerapporteerd over de mogelijke schadelijke effecten voor de dieren van de gebruikte technieken (bijvoorbeeld embryodonoren). Er staan standaard 150 dieren voor het creëren van een nieuwe lijn, ondergaan deze dieren een vaststaande behandeling? Zo ja, is hierdoor het ongerief volledig voorspelbaar?
Heeft u redenen om dit wel/niet te willen vermelden?
- 3] Hoe wordt de informatie over de te verwachten effecten van het genconstruct voor dit gedeelte verkregen? (bijv. uit wetenschappelijke artikelen, databases, pers. ervaring) Wat doet u of wordt er gedaan als het om een nieuw construct gaat, waar nog niets in de literatuur over bekend is?
- 4] Worden er door het ministerie van LNV of door de CBD nog andere criteria gehanteerd waaraan de door de onderzoekers verstrekte informatie moet voldoen, buiten wat er expliciet in het aanvraagformulier vermeld wordt? Zo ja, welke zijn dit? (bijv. over lengte of bronvermeldingen)

Ad 2

Aan allen:

- 1] Vindt u de vraagstelling van vraag 19 en 20 en de toelichting daarop op het formulier helder en eenduidig? Zo nee, wat zou hier volgens u beter aan kunnen?
- 2] Geeft deze schade-effectrapportage zoals deze op dit moment plaats vindt volgens u over het algemeen een helder en volledig beeld van de gezondheids- en welzijnsschade die de genetische verandering mogelijk zou kunnen veroorzaken voor de dieren? Zo nee, wat mist er dan nog aan?

3] Zijn er vaak aanvullende vragen van de CBD over dit gedeelte van het formulier? En van de maatschappelijke organisaties? Zo ja, waarop hebben deze dan over het algemeen betrekking? Zouden deze standaard geïntegreerd kunnen worden in de aanvraag? Welke vragen wel/niet?

Ad 3

Aan de maatschappelijke organisaties en de CBD-leden:

1] Is er informatie die u systematisch mist in de beantwoording van vraag 19 en 20 van het CBD-formulier om tot een goede afweging van belangen te komen? Zo ja, resulteert dat telkens in aanvullende vragen? Krijgt u daarop wel een bevredigend antwoord?

2] Als u inderdaad systematisch informatie mist: waar wordt dit volgens u door veroorzaakt? (bijv. onzekerheden die inherent zijn aan het vakgebied)

Aan de onderzoekers:

3] Is er meer kennis beschikbaar dan nu op het formulier gevraagd wordt? (bijv. over effecten van gebruikte technieken) Hoeveel extra tijd zou het u kosten om deze op te zoeken? (bijv. allerlei mogelijke processen waarop het genconstruct invloed zou kunnen hebben) Zou u het verstrekken van die extra informatie zinvol vinden? Zo nee, waarom niet? Zo ja, welke informatie is zinvol?

4] Mist u (openbare) informatie die u van dienst zou kunnen zijn voor het invullen van het formulier? (bijv. databases, wetenschappelijke publicaties)

5] Ik neem aan dat elke nieuwe lijn gefenotypeerd wordt. Wat voor tests worden hiervoor uitgevoerd en wat gebeurt er met de verkregen informatie? Is deze openbaar toegankelijk en zo ja, hoe?

6] Wat gebeurt er nu met informatie die gedurende een onderzoek verzameld wordt over de effecten van een bepaalde genetische verandering op de gezondheid en het welzijn van de proefdieren?

Aan allen:

7] Heeft u ideeën voor een betere bundeling/beschikbaarheid van de gegevens die gedurende een onderzoek verzameld worden met betrekking tot gezondheid en welzijn? Wiens taak zou dit volgens u kunnen/moeten zijn?

Wetenschapswinkel Biologie, Padualaan 8 / Z 402, 3584 CH Utrecht, (030) 253 73 63

