



## Bio-Wetenschappen en Maatschappij

- Hoe kunnen dieren transgeen worden gemaakt?
- Genetisch-gemodificeerde muizen. Wat hebben we eraan?
- Goed geregeld (?)
- Biotechnologie bij dieren ethisch getoetst

# Transgene dieren

2/2005

Onder redactie van:  
P.R. Wiepkema, E. Schroten,  
A.J. van der Eb

*Foto omslag:*  
*Dr. J.S. Verbeek*

### **Informatie, abonnementen en bestellingen:**

Stichting Bio-Wetenschappen en Maatschappij  
Postbus 93402  
2509 AK Den Haag  
telefoon: 070-34 40 781  
e-mail: [bwm@nwo.nl](mailto:bwm@nwo.nl)  
[www.biomaatschappij.nl](http://www.biomaatschappij.nl)

De cahiers verschijnen viermaal per jaar.  
Van de reeds verschenen cahiers zijn de meeste  
uitgaven nog verkrijgbaar.  
Zie hiervoor de kaart in dit cahier, neem contact  
op met BWM of bezoek onze website:  
[www.biomaatschappij.nl](http://www.biomaatschappij.nl)

## **Cahiers Bio-Wetenschappen en Maatschappij**

Transgene dieren  
24e jaargang, nr 2, september 2005

### **Redactie:**

prof.dr. P.R. Wiepkema  
prof.dr. E. Schroten  
prof.dr. A.J. van der Eb  
mw. W. Bosma-Visser (redactie-secretaris)  
mw. H. Terlouw-van Tuinen (redactie-secretaris)  
dhr. F.J.W. de Greef (tekstcorrectie)

### **Lay-out binnenwerk en druk:**

Drukkerij Groen BV, Leiden

© Stichting Bio-Wetenschappen en Maatschappij

### **Het bestuur:**

prof.dr. D.W. van Bakkum (voorzitter)  
dr. J.J.E. van Everdingen (penningmeester)  
prof.dr. P.R. Bär  
prof.dr. J.P.M. Geraedts  
prof.dr. J.A. Knottnerus  
prof.dr. W.J. Rietveld  
prof.dr. P.R. Wiepkema

### **ISBN 90-73196-39-6**

Voor de illustraties in dit cahier is toestemming gekregen  
van de desbetreffende rechtspersonen.

# Transgene dieren

## INHOUD

<b>VOORWOORD</b>	<b>2</b>
Redactie	
<b>1. HOE KUNNEN DIEREN TRANSGEEN WORDEN GEMAAKT?</b>	<b>5</b>
Dr. J.S. Verbeek	
<b>2. GENETISCH-GEMODIFICEERDE MUIZEN. WAT HEBBEN WE ERAAN?</b>	<b>23</b>
Prof.dr. A.J.M. Berns	
Kader: Transgene dieren en het patiëntenbelang <i>Dr. C. Smit</i>	
Kader: Transgenese bij vee en vis <i>Prof.dr. P.R. Wiepkema</i>	
Kader: Welzijn van genetisch-gemodificeerde dieren <i>Prof.dr. B.M. Spruijt en Dr. H.A. van Lith</i>	
<b>3. GOED GEREGELD (?)</b>	<b>45</b>
Prof.dr. E. Schroten	
Kader: Maatschappelijke acceptatie – een omstrede zaak <i>Prof.dr. L. Laeyendecker</i>	
Kader: Genetisch-gemodificeerde dieren onmisbaar voor waardevolle producten <i>Dr. P.J.A. Bertens en drs. R T.A. Janssen</i>	
<b>4. BIOTECHNOLOGIE BIJ DIEREN ETHISCH GETOETST</b>	<b>61</b>
Drs. R. Tramper	
Kader F: Regelgeving buiten Nederland <i>Drs. W.A. de Leeuw en Ir. J.B.F.C. van den Assum</i>	
<b>BEGRIPPENLIJST</b>	<b>73</b>

Naar het zich laat aanzien heeft Nederland de strengste regels ter wereld, wanneer het gaat om het wijzigen van de erfelijke aanleg van dieren buiten de natuurlijke voortplanting om. Transgenese bij dieren is hier niet zomaar toegestaan.

Wil je toch zoiets doen, dan is voor de uitvoering van elk “transgenetisch” plan een vergunning nodig van de Minister van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit. Deze Minister verleent of weigert zo’n vergunning na het advies van een commissie van onafhankelijke deskundigen gehoord te hebben. Dit overigens ook pas nadat ieder die daartoe de behoefte voelt in de gelegenheid is gesteld bezwaar of bijval in het openbaar te uiten. Omdat het in al deze gevallen om dierproeven gaat, moet bovendien de instemming van een lokale dierexperimentencommissie worden verkregen. Deze loodzware procedure komt tegemoet aan hen die zich ernstig zorgen maken over en bezwaren hebben tegen ingrepen in de erfelijke aanleg van dieren. Aan de andere kant wordt deze procedure als een blok aan het been gevoeld door hen die van dezelfde ingrepen grote doorbraken op bijvoorbeeld medisch gebied verwachten.

De uitkomst van alle hierbij gevoerde discussies is, dat in Nederland transgenese bij dieren feitelijk alleen wordt toegestaan als het beoogde doel zwaarwegend is (zoals medische kennis en toepassing) en als datzelfde doel niet langs een andere weg kan worden bereikt.

Het is dan ook niet verbazingwekkend dat er rondom deze transgenese kampen zijn ontstaan met ieder een eigen jargon. In het ene spreekt men van genetische manipulatie, in het andere van genetische modificatie. Naast het diepe wantrouwen bij de ene partij, constateren we een groot vertrouwen bij de anderen. Voor dit cahier, waarin al dit “genetisch gedoe” wordt beschreven en belicht hebben we als opschrift “Transgene dieren” gekozen. Daarmee wordt ook aansluiting gezocht bij een eerder cahier getiteld “Transgene planten”. Beide cahiers gaan over soortgelijke methodieken en een meer of minder verwante problematiek.

Het transgenetische onderzoek bij planten en dieren heeft buitengewoon veel informatie en verrassingen opgeleverd. Niet alleen over hoe hun genoom is georganiseerd, maar ook hoe in detail genen hun taken regelen en verrichten. Tegelijkertijd kwamen met deze nieuwe inzichten onverwachte problemen op tafel te liggen. Riep de transgenese bij planten vooral vragen op omtrent milieubescherming en voedselkwaliteit, bij dieren verschoof de problematiek bovendien nog naar een heel ander gebied. Zo werd een centrale vraag of we niet ons boekje te buiten gaan als we dieren (bedoeld zijn daarbij vooral hogere dieren als vogels en zoogdieren) met kunstmatige ingrepen in hun genoom naar onze hand willen zetten. Meer dan bij planten wordt bij deze dieren gevoeld dat ze een eigen waarde hebben, dat ze kunnen lijden en dat ze ons respect verdienen. Tasten we met transgenese niet de eigenheid van deze dieren aan? Is na het dier de mens aan de beurt?

Bij dit alles is het natuurlijk goed voor ogen te houden dat de mens voor zijn bestaan ongelooflijk veel aan het dier, aan het gebruik van dieren, te danken heeft. Neem als voorbeeld de domesticatie. In deze eeuwenoude traditie heeft de mens vele diersoorten genetisch veranderd ten behoeve van de mens. Daarbij werd echter wel geluisterd naar de beperkingen die de natuurlijke voortplanting stelt. Over al dit soort vragen gaat dit cahier.

Allereerst wordt beschreven hoe het genetisch modificeren van dieren in zijn werk gaat en wat daarmee bereikt kan worden. Niet alleen kan de lezer ontdekken hoe scherpzinnig gebruik wordt gemaakt van processen die van nature de deling, de herschikking en de expressie van genetisch materiaal in cellen bepalen, maar ook welke successen voor de medische wetenschap worden geboekt of verwacht. Transgenetische ingrepen ten behoeve van vee- en visteelt zijn elders ter wereld niet ongewoon. Enkele voorbeelden daarvan worden beschreven. Zo wordt ook beknopt ingegaan op gezondheids- en welzijnsproblemen die zich als gevolg van transgenetische ingrepen bij dieren kunnen voordoen. Hier blijkt nog veel onbekend. Een heel aparte vraag is hoe nieuwe wetenschappelijke ontwikkelingen in een samenleving als de onze door mensen worden ervaren. Transgenese is zo’n nieuw perspectief. Wordt wetenschap vertrouwd of gewantrouwd? Een socioloog laat hierover zijn licht schijnen.

Uitvoerig wordt vervolgens aandacht gegeven aan de bovengenoemde toelatingsprocedures. Hoe steken ze in elkaar en hoe wordt getoetst of iets toelaatbaar kan worden geacht of niet. Hoe weeg je voorgestelde doelen af tegen wat dieren wordt aangedaan? Daarbij spelen niet alleen vragen omtrent ongerief van proefdieren – het domein van de dierexperimentencommissies – maar ook ethische vragen betreffende de integriteit van dieren: een karakteristiek onderwerp van de commissie biotechnologie bij dieren. Al deze ontwikkelingen gaan niet voorbij aan het bedrijfsleven. Integendeel. Biotechnologische en farmaceutische bedrijven hebben een groot aandeel in het ontwikkelen en maken van nieuwe medische producten met behulp van de zogenaamde recombinant-DNA-technologie. Welke belangen hier liggen, wordt in kort bestek aangegeven. Tenslotte wordt nog een blik geworpen op de regelgeving zoals die buiten Nederland wordt

aangehouden. Deze is voor een niet-onbelangrijk deel – denk aan EU-regels – bepalend voor wat in Nederland tenminste moet gebeuren.

Transgenese bij dieren is veelbelovend, maar in ons land ook omstreden. Om deze tegenstelling voor de lezer goed in beeld te krijgen, heeft de redactie gemeend partijen voluit aan het woord te laten. Deze openheid is te meer van belang, omdat binnenkort de Nederlandse overheid haar beleid op dit terrein zal evalueren. Moeten we de strengste blijven of zijn er deelgebieden van transgenese bij dieren waar eenvoudiger regelgeving kan volstaan? De inhoud van dit cahier biedt voor deze discussie heel nuttige informatie.

*Redactie*



# 1 Hoe kunnen dieren transgeen worden gemaakt?

SJEF VERBEEK

*Dr. J.S. Verbeek studeerde biologie aan de Universiteit van Utrecht. Hij promoveerde aan de Universiteit Nijmegen bij de afdeling Biochemie op het proefschrift "Fes and Fms, tyrosine specific protein kinase encoding proto-oncogenes". Na als postdoc betrokken te zijn geweest bij het implementeren van de technologie van transgenese in het onderzoek van het Nederlands Kanker Instituut te Amsterdam, zette hij in 1990 als universitair docent bij de Universiteit Utrecht een faciliteit op voor het maken van transgene muizen voor immunologisch onderzoek. Sjef Verbeek is sinds 1999 als Universitair hoofddocent verbonden aan de afdeling Humane Genetica van het Leids Universitair Medisch Centrum, waar hij met behulp van transgene muizen onder andere onderzoek doet naar de rol van receptoren voor IgG, FcγR, in de afweer en in ziekten waarbij chronische ontstekingen een belangrijke rol spelen.*

De constatering dat het humane genoom niet meer dan 25.000 genen bevat, is zowel in wetenschappelijke kringen als door het publiek met ongeloof ontvangen. Het besef dat het genoom van de mens slechts 5% verschilt van dat van de chimpansee en minder dan tweemaal zoveel genen bevat dan het genoom van de nietige fruitvlieg heeft onze visie op de wijze waarop erfelijke eigenschappen in het DNA zijn vastgelegd drastisch gewijzigd. Het genoom is niet simpelweg een optelsom van genen, waarbij elk gen wordt opgevat als de kleinste coderende eenheid die de informatie voor een enkel eiwit bevat. Om inzicht te verwerven in de erfelijke eigenschappen van een complex organisme als een zoogdier is een op zichzelf staande analyse van de code van de afzonderlijke genen en de functie van de eiwitten waarvoor zij coderen niet voldoende, maar zal de rol van gen en bijbehorend eiwit in de context van het gehele organisme moeten worden begrepen. De technologie van transgenese is bij uitstek geschikt gebleken om hieraan een grote bijdrage te leveren. Met name in het model-laboratoriumdier, de muis, zijn de technische mogelijkheden voor genetische analyses de afgelopen 25 jaar spectaculair toegenomen. Dit hoofdstuk beoogt inzicht te geven in de huidige stand van de techniek voor het maken van transgene dieren, die in het moderne biomedische onderzoek niet meer zijn weg te denken.

In de genetica wordt de functie van een gen en zijn producten (eiwitten) meestal bepaald door na te gaan wat er gebeurt wanneer het gen wordt gemuteerd, dat wil zeggen de genetische code enigszins wordt veranderd. In het verleden waren genetici daarbij afhankelijk van spontane of willekeurig geïnduceerde mutaties en genetische polymorfismen, dat wil zeggen natuurlijke variaties in de verschijningsvorm van een gen in de populatie. Maar die benadering is te beperkt om de functie van de ongeveer 25.000 genen die het complexe genoom van een zoog-

dier zoals de mens waarschijnlijk telt, te analyseren. Slechts die mutaties (veranderingen in het genotype) kunnen worden bestudeerd die resulteren in een waarneembare verandering in het gedrag en/of de uiterlijke verschijningsvorm (het fenotype) van het organisme. Het aantal mutaties dat daaraan voldoet, is beperkt omdat eukaryoten, waartoe ook de zoogdieren behoren, diploïd zijn. Dat wil zeggen dat in hun genoom van ieder gen twee kopieën aanwezig zijn. We spreken van homozygoot wanneer de twee kopieën identiek zijn en heterozygoot wanneer ze enigszins van elkaar verschillen. In diploïde organismen kunnen mutaties vaak slechts worden waargenomen in nakomelingen die homozygoot zijn voor de mutatie. Maar mutaties zijn in homozygote vorm vaak niet levensvatbaar, hetgeen analyse onmogelijk maakt. De grote aandacht voor het "Humane genoom project", een wereldwijd samenwerkingsverband van moleculair biologische laboratoria om zo snel mogelijk de complete genetische code van het genoom van de mens af te lezen, heeft mogelijk bij het publiek de indruk gewekt dat daarmee het DNA van de mens al zijn 'geheimen' zou hebben prijsgegeven. Hoe belangrijk ook als bron van een overweldigende hoeveelheid informatie, het is niet voldoende om de functie van de 25.000 genen van de mens vast te stellen.

Met de komst van recombinant-DNA-technieken werd het mogelijk om de genen van ieder willekeurig organisme te isoleren en te vermenigvuldigen (kloneren). Daarmee was de weg bereid voor een sleuteltechniek in de hedendaagse gen analyse, de '**gen overdracht**', een verzameling methoden om gekloonde genen terug te brengen in levende cellen. Dit heeft het concept van "omgekeerde genetica" ("reverse genetics") mogelijk gemaakt, waarbij al dan niet gemodificeerde klonen van genen in levende cellen worden ingebracht waarna de functie van hun genproduct(en) wordt geanalyseerd.

Echter, celcultures hebben hun beperkingen. Een complex meercellig organisme is samengesteld uit vele celtypen die van elkaar verschillen in hun chemische samenstelling, functie en fysiologie. De identiteit van een cel wordt bepaald door de som van de genen die gedurende zijn leven actief zijn. De activiteit van een gen, "gen expressie" genoemd, is vaak celtype-gebonden. Sommige genen zoals de '*huishoudgenen*', die betrokken zijn bij basale functies als de energiehuishouding van de cel, zijn actief in de meeste zo niet alle celtypen. Andere genen komen alleen tot expressie in gespecialiseerde celtypen. Zo komt het gen dat codeert voor insuline uit-

sluitend tot expressie in de bèta-cellen van de Eilandjes van Langerhans in de pancreas. Het is tot op heden niet mogelijk gebleken alle verschillende celtypen uit het zoogdierlichaam in celculture te houden. Bovendien bleek dat cellen die wel in staat zijn in celweek te groeien vaak nieuwe eigenschappen hebben verworven, die overeenkomen met eigenschappen van kankercellen zoals ongecontroleerde groei. Daarnaast functioneren cellen in het intacte lichaam in de context van het interactieve systeem van een ruimtelijk cellulair netwerk, dat niet of onvoldoende kan worden nagebootst in de kweekvles. Tenslotte is het onmogelijk om de rol van genen die betrokken zijn bij processen zoals embryonale ontwikkeling, complexe afweerreacties etcetera te analyseren in een eenvoudige artificiële celculture. Daarom was het noodzakelijk om de technologie van gen-overdracht uit te breiden naar het intacte dier, als een logisch vervolg op de al eerder ingeslagen weg.

In de afgelopen vijftig jaar hebben de snelle ontwikkelingen in de moleculaire genetica naast de indrukwekkende vooruitgang in het beheersen van de kweek en manipulatie van (zoogdier)embryo's, de gereedschappen verschaft voor de huidige technologie van gen overdracht in intacte organismen. Daarbij wordt zonder uitzondering gebruikgemaakt van zeer vroeg embryonale stadia, omdat het organisme dan slechts uit één (eicel) tot enkele cellen (pre-embryo) bestaat. Wanneer het ingebrachte genconstruct stabiel integreert in het genoom van het ontvangende vroege embryo, is er een grote kans dat het gedurende het proces van celdeling zal worden overgeërfd door de meeste zo niet alle cellen van het zich ontwikkelende dier, inclusief de geslachts-cellen. Men spreekt dan van 'kiembaan integratie'. Het in de kiembaan brengen van nieuwe genetische informatie wordt transgenese genoemd. De dieren die na deze manipulatie uit de embryo's worden geboren, heten *transgene dieren*. Zij kunnen hun nieuw verworven eigenschap aan hun nakomelingen doorgeven op dezelfde manier als al hun andere eigenschappen zoals bv. oogkleur, volgens de klassieke wetten van Mendel. Transgenese is tot nu toe mogelijk gebleken in de rondworm (*C.elegans*), fruitvlieg (*Drosophila*), muis, rat, vis en landbouwhuisdieren zoals runderen, schapen, varkens, geiten, konijnen en kippen.

Een groot deel van het onderzoek dat is gericht op het ophelderen van de biologische functie van de 25.000 genen van het humane genoom ('*functional Genomics*') is gebaseerd op de analyse van de expressie en functie van



overeenkomstige genen in model organismen zoals de rondworm, de fruitvlieg, de zebrafish en de muis. Transgenese is daarbij een niet meer weg te denken krachtig hulpmiddel. De muis is het meest geschikte model organisme voor het bestuderen van de rol van genen in ziekten bij de mens, omdat de meeste stofwisselingsroutes en fysiologische processen van dit gemakkelijk te hantieren laboratorium-zoogdier sterk overeenkomen met die van de mens. Daarnaast zijn er een groot aantal genetisch goed-gedefinieerde inteeltstammen van de muis beschikbaar, waarvan alle nakomelingen genetisch identiek zijn. Dit schept de unieke mogelijkheid om individuen die slechts in een enkel gen van elkaar verschillen met elkaar te vergelijken. Bovendien zijn er in de afgelopen 25 jaar steeds betere methoden ontwikkeld om het genoom van de muis op de voor de onderzoeker gewenste wijze te modificeren.

Daarom zal dit hoofdstuk zich voornamelijk richten op de technische mogelijkheden van transgenese in de muis, zonder de suggestie te willen wekken dat andere veelgebruikte model organismen voor het biologische en biomedische onderzoek niet relevant zijn. De vraag is niet wat het beste diersmodel is, maar met welk diersmodel een bepaalde biologische/ biomedische vraag het best beantwoord kan worden. Daarbij spelen naast de beschikbaarheid van genetische technieken, ook generatietijd, productie van aantallen nakomelingen, mogelijkheden om het fenotype te analyseren, huisvestingskosten, risico's voor (infectie)ziekten, regelgeving en ethische aspecten een belangrijke rol.

## De technologie van transgenese

Transgenese in hogere eukaryoten zoals zoogdieren is het resultaat van een vruchtbare synthese van moleculaire genetica en experimentele embryologie. Succesvolle transgenese vereist enerzijds technieken voor het construeren van het transgen (het vakgebied van de moleculaire genetica) en anderzijds technieken voor het isoleren, kweken en manipuleren van vroege stadia van embryo's (het vakgebied van de embryologie). Voor een juist begrip van de verschillende methoden van transgenese die worden toegepast, is enige basiskennis van de (vroege) ontwikkeling van het muizenembryo en van de moleculaire genetica onontbeerlijk.

## Het muizenembryo

Zoogdieren zijn **diploïd**, dat wil zeggen dat de genetische informatie in hun genoom tweevoudig aanwezig is in de

vorm van een aantal paren overeenkomstige DNA-moleculen, de chromosomen. Van ieder chromosomenpaar is één chromosoom afkomstig van de moeder en het andere van de vader. Tijdens de vorming van de geslachtscellen wordt de genetische informatie gehalveerd (reductiedeling) zodat iedere eicel of zaadcel van ieder chromosoompaar (20 bij de muis) er één chromosoom meekrijgt. Daarom worden de geslachtscellen **haploïd** genoemd. Tijdens de bevruchting, die plaatsvindt in de eileider, dringt de kern van de zaadcel in de eicel binnen (zie figuur 1). Vervolgens fuseren binnen 24 uur de mannelijke en vrouwelijke haploïde kernen (voorkernen genoemd) waardoor de diploïde eencellige **zygote** wordt gevormd. Vierentwintig uur daarna deelt deze zygote zich in twee gelijke cellen: blastomeren. Met intervallen van 12 uur delen deze blastomeren zich op overeenkomstige wijze verder tot een 16-32 cellig stadium, de morula. Voorafgaande aan iedere celdeling vindt een verdubbeling van het DNA plaats, waarna beide dochtercellen ieder een gelijke complete set van tweemaal 20 chromosomen erft. Op dag drie na de bevruchting vormt zich een holte (blastocoel) in het embryo, dat nu blastocyst wordt genoemd. De blastocyst (zie ook figuur 5) bestaat uit een buitenste cellaag, het trophoctoderm en een klompje cellen, de "inner cell mass" (ICM), die zich in de blastocoel bevindt, aan één zijde vastgehecht aan de trophoctoderm. In dit ontwikkelingsstadium verlaat het pre-embryo de eileider om op dag vier na de bevruchting uit de 'zona pellucida', die tot dan het embryo als een beschermende laag heeft omgeven, te treden en zich vast te hechten aan de baarmoederwand. Vanaf dat moment kan het embryo, dan postimplantatie-embryo genoemd, niet meer vrij worden geïsoleerd en gemanipuleerd en is daarmee niet langer bruikbaar voor transgenese. Een deel van de ICM ontwikkelt zich tot het eigenlijke embryo, een ander deel vormt de vruchtvliezen, terwijl het trophoctoderm zich ontwikkelt tot extra-embryonaal weefsel zoals dooierzak en placenta.

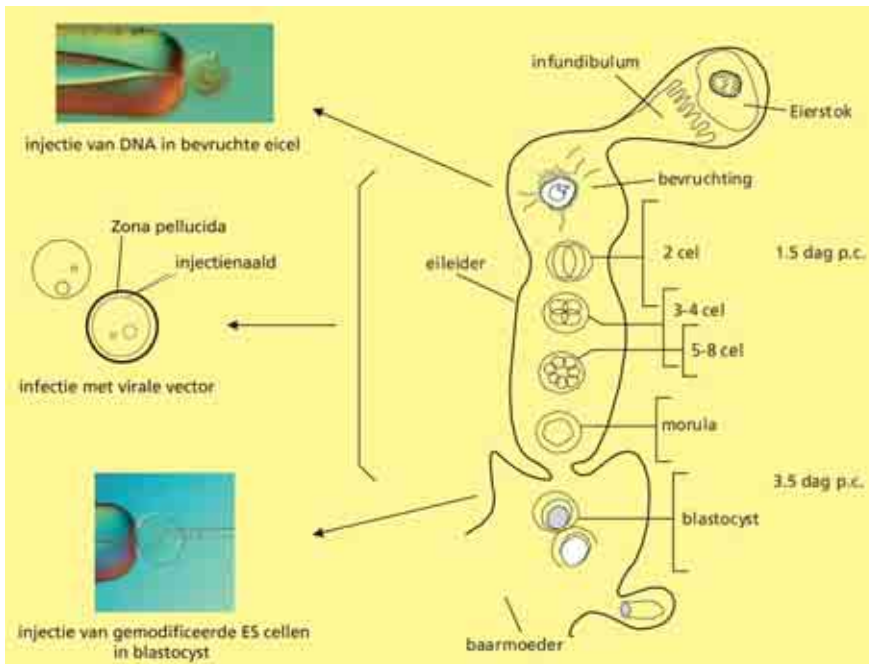
De verschillende stadia van het pre-embryo kunnen op eenvoudige wijze worden geïsoleerd uit zwangere vrouwtjesmuisen. Bovendien kan bevruchting en ontwikkeling tot het blastocyst stadium geheel *in vitro* plaatsvinden. Stimulering van de eisprong (superovulatie) door behandeling met follikel stimulerend en follikel rijpingshormoon, resulteert bij de muis in 15-25 rijpe eicellen per behandeld vrouwtje. Deze eicellen vertonen bovendien de, voor de uitvoering van de techniek, gunstige eigenschap dat ze allemaal in dezelfde fase van ontwikkeling

verkeren. De stadia die bij voorkeur worden gebruikt voor embryo-manipulatie ten behoeve van transgenese zijn de eencellige bevruchte eicel, de blastocyst en pluripotente embryonale stamcellen (ES-cellen) die als stabiele cellijnen zijn gekweekt uit de ICM (figuur 1).

Na manipulatie worden de embryo's operatief teruggeplaatst in de eileider (alle stadia tot aan het blastocyst stadium) of de uterus (blastocyst stadium) van schijnzwangere draagmoeders die op de volgende wijze worden verkregen. Een groep vrouwtjes van geslachtsrijpe leeftijd wordt bij mannen geplaatst waarvan de zaadleider operatief deels is verwijderd. Mannetjes paren uitsluitend met vrouwtjes in oestrus. Omdat het mannetje na een volledige paring een goed zichtbare prop in de vagina achter laat kunnen de "schijnzwangere" vrouwtjes vervolgens eenvoudig worden geselecteerd. 19 (blastocyst) tot 21 (tweecellig embryo) dagen nadat de embryo's zijn teruggeplaatst worden de volgroeide jongen geboren.

## Het transgen

Een gen bestaat enerzijds uit een stuk DNA (het structurele gen) dat de code bevat voor een bepaald eiwit en anderzijds uit een aantal DNA-elementen die een regelfunctie hebben en bepalen wanneer, waar en in welke hoeveelheid het genproduct wordt gemaakt. De werking van deze 'regelementen' is gebaseerd op de specifieke binding van een scala van speciale eiwitten, zogenaamde transcriptie-factoren, waarvan de samenstelling per celtype kan verschillen. De meest eenvoudige manier om een werkzaam transgen te verkrijgen, is een zodanig stuk DNA uit het genoom te isoleren dat naast het structurele gen ook alle benodigde regelementen van het gen intact aanwezig zijn. Het is gebleken dat ook werkzame transgen-constructen kunnen worden verkregen als DNA-elementen van verschillende genen worden gecombineerd. Een van de belangrijkste regelementen in het DNA is de promotor waaraan eiwitten kunnen binden die het proces van transcriptie, het maken van een kopie van de code in het DNA in de vorm van een *boodschapper*



Figuur 1: Transgenese bij de muis. Rechts is schematisch de eileider weergegeven met daarin de verschillende vroeg-embryonale stadia vanaf de bevruchting tot dag 4.5 post conceptie (p.c.), waarin de aanhechting van het embryo aan de baarmoederwand plaatsvindt. Links zijn de verschillende routes van transgenese weergegeven. Alle stadia van het pre-embryo kunnen in principe met virale vectoren worden geïnfecteerd, maar de voorkeur gaat uit naar het eencellig stadium. De infectie van bevruchte eicellen vindt plaats door middel van injectie van een virus suspensie onder de zona pellucida (2) of door infectie van bevruchte eicellen waarvan de zona pellucida is verwijderd (1).

RNA, afgekort mRNA, katalyseren. Promotors zijn vaak uitsluitend actief in bepaalde celtypen. Bij het construeren van een transgen zal dus een keuze gemaakt moeten worden uit de beschikbare promotors, afhankelijk van de wens waar het transgen actief moet zijn. Naast de promotor zijn er nog andere DNA-elementen die mede bepalen waar en in welke mate het transgen tot expressie komt. Zij kunnen afhankelijk van het celtype de expressie van een gen verder verhogen of juist verlagen. Transgene muizen zijn bij uitstek geschikt gebleken om DNA-elementen die de expressie van genen reguleren te identificeren en te analyseren.

Een van de meest opvallende verschillen tussen de genen van bacteriën en eukaryoten is nu dat het structurele gen bij bacteriën uit een ononderbroken eiwitcode bestaat, terwijl bij eukaryoten delen die coderen voor eiwit (= *exonen*) worden afgewisseld met (vaak een groot aantal) niet-coderende delen (= *intronen*). Het eukaryotisch mRNA bevat aanvankelijk een kopie van zowel de intronen als de exonen. In een speciaal proces dat *splicing* wordt genoemd worden de intronen verwijderd. Dan pas is het mRNA geschikt om door de cel naar het cytoplasma te worden getransporteerd waar het kan worden vertaald in eiwit. Voor het maken van transgene dieren gebruikt men vaak genconstructen waaruit de intronen zijn verwijderd, om te voorkomen dat de constructen onhanteerbaar lang worden. Gebleken is echter dat transgen-constructen die geen intronen bevatten over het algemeen geen of slechts een heel lage expressie vertonen. Door toevoeging van een enkel intron, ook al is dat van een ander gen afkomstig, kan echter toch een goede expressie worden verkregen.

Naast de elementen die deel uitmaken van het transgen zelf, bepalen ook DNA-elementen in het omliggende DNA van het genoom waarin het transgen wordt ingebouwd, de expressie van het transgen. Omdat de meest gebruikte technologie voor het maken van transgene dieren resulteert in de integratie van het transgen op een min of meer willekeurige plaats in het genoom, is die invloed onvoorspelbaar. Dit is een van de redenen waarom voor een bepaald genconstruct vaak meerdere primaire transgene dieren worden gemaakt om vervolgens die dieren te selecteren, waarin het transgen de door de onderzoeker gewenste expressie vertoont. Een andere oplossing is het transgen-construct aan beide zijden te voorzien van zogenaamde *isolator* elementen. In sommige genen en gen-clusters zoals die welke coderen voor verschillende vormen van globine, een belangrijk bestanddeel van rode

bloedcellen, zijn DNA-elementen geïdentificeerd die het gen of gen-cluster min of meer afsluiten voor de invloeden van DNA-elementen uit de rest van het genoom. Deze elementen worden op bescheiden schaal en met wisselend succes in transgene muizen toegepast.

Omdat veel aspecten van genexpressie nog niet worden begrepen, is het construeren van een transgen dat met grote waarschijnlijkheid de gewenste expressie vertoont nog steeds een hele uitdaging. De mogelijkheden van de beschikbare recombinant-DNA-technieken bepalen in sterke mate de grenzen die aan de grootte van het transgen worden gesteld. In vergelijking met de DNA-constructen uit de eerste 10 tot 15 jaar dat transgenese werd toegepast, kunnen nu, anno 2005, 5 tot 10 maal grotere aaneensluitende DNA-fragmenten uit een genoom worden geïsoleerd en vermeerderd, en vervolgens gemanipuleerd in bacteriën of gist om voor transgenese te worden gebruikt. Toepassing van grote DNA-fragmenten die niet alleen het beoogde gen zelf bevatten, maar ook omvangrijke aansluitende delen van het genoom, hebben over het algemeen een gunstig effect op de expressie van het transgen. DNA-elementen die de expressie van een gen regelen, bevinden zich namelijk in het genoom vaak niet in de directe nabijheid van het structurele gen zelf.

De genetische code is universeel. Er is dan ook geen soortbarrière met betrekking tot de code van structurele genen, dat wil zeggen dat met even groot gemak de structurele genen van bacteriën, gistcellen of insecten als van zoogdieren, waaronder de mens, in een transgene muis kunnen worden gebruikt. Dit maakt het bv. mogelijk om met behulp van een groen fluorescerend eiwit (GFP = Green Fluorescent Protein) afkomstig van een kwal of het enzym luciferase uit het vuurvliegje bepaalde cellen van een transgeen dier te markeren. Met speciale apparatuur kan vervolgens de handel en wandel van deze cellen in het intacte levende dier in de tijd worden gevolgd.

DNA-elementen die de expressie van een gen regelen, zoals promotors zijn daarentegen minder universeel. Terwijl regelementen van menselijke oorsprong meestal hun normale activiteit in de transgene muis behouden, geldt dat niet voor bacteriële regelementen, omdat de bijbehorende bacteriële transcriptiefactoren in de muis ontbreken. Echter wanneer zowel de DNA-elementen als de bijbehorende transcriptie-factoren worden samengebracht in de transgene muis, kan een bacterieel regelsysteem van gen expressie wel functioneel zijn. Met als groot voordeel dat het niet interfereert met genregulatie-mechanismen van de muis zelf.

## Methoden van Transgenese

Een gen-overdrachtsmethode moet aan de volgende voorwaarden voldoen: een relatief groot DNA-molecuul zoals een genconstruct moet de twee fysieke barrières gevormd door respectievelijk de celmembranen en de kernmembranen kunnen passeren zonder dat daarbij de cel of het construct zelf wordt beschadigd. In de loop der jaren is in celcultures daarvoor een scala van gen-overdrachtstechnieken ontwikkeld. Bij transgenese worden, afhankelijk van de diersoort en het embryonale stadium waarin de genoverdracht plaatsvindt, verschillende methoden gebruikt.

Bij de muis zijn er drie hoofdmethoden van transgenese te onderscheiden: (zie fig.1.)

- Micro-injectie** van DNA in één van de twee voorkernen van een bevruchte eicel.
- Infectie** van pre-implantatie embryo's met (retro)virale vectoren.
- Transfectie van embryonale stamcellen** (ES-cellen), die vervolgens in een pre-implantatie stadium van het embryo worden geïnjecteerd.

## Micro-injectie

Eind jaren 70 van de vorige eeuw werd de techniek geïntroduceerd van injectie van een oplossing van DNA, direct in de nog niet gefuseerde haploïde voorkern van een bevruchte eicel (figuur 2). Aan deze succesvolle en meest toegepaste methode is sinds die tijd fundamenteel niets veranderd. Omdat een zoogdier eicel is omgeven door een sterke, nauwelijks doordringbare eiwitmantel, de zona pellucida, is deze mechanische methode van micro-injectie de meest effectieve manier van gen-overdracht gebleken voor transgenese bij zoogdieren (zie voor details kadertekst en ook fig.9).

Na injectie worden de eicellen meestal gedurende een nacht gekweekt in speciaal medium, in een incubator, onder condities zoals die gebruikelijk zijn voor standaard cel-cultures. De volgende ochtend worden in een schijnzwangere draagmoeder per eileider ongeveer 15 eicellen, die een deling hebben ondergaan (meer dan 90%), operatief teruggeplaatst met behulp van een glascapillair. Maximaal 25% van de muizen die 21 dagen later worden geboren, hebben het geïnjecteerde DNA-construct stabiel geïntegreerd in hun genoom, in de meeste zo niet alle cellen van hun lichaam. Omdat 80% van deze dieren het nieuw verworven DNA aan hun nakomelingen doorgeeft volgens de wetten van Mendel (50% van de nakomelingen transgeen) kan worden geconcludeerd dat integratie

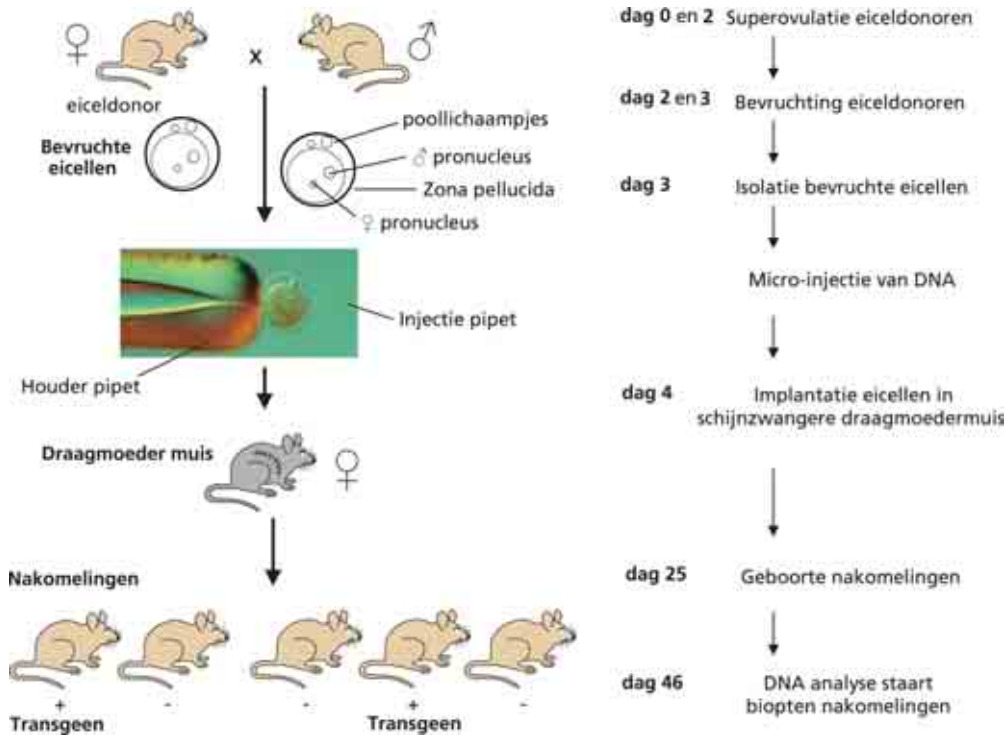
van het geïnjecteerde DNA in het genoom efficiënt verloopt in een vroege fase van het pre-embryo (figuur 2).

## Micro-injectie

Een zeer dunne glascapillair (injectie pipet,  $\varnothing$  uiteinde =  $0,5\mu\text{m}$ ) gevuld met een waterige oplossing van DNA ( $2-4\mu\text{g/ml}$ ) wordt door de zona pellucida van de doorzichtige eicel ( $\varnothing = 85\mu\text{m}$ ) geprikt tot in een van de twee voorkernen ( $\varnothing = 20\mu\text{m}$ ). Vervolgens wordt met de injector, een elektrisch apparaat dat door middel van een slangetje aan de injectiepipet is bevestigd, een kleine, nauwkeurig te regelen hoeveelheid ( $2-4$  picoliter) van de DNA-oplossing geïnjecteerd, door een met de injector verbonden voetpedaal in te drukken waardoor een korte regelbare luchtdrukpuls wordt gegeven. De eicel wordt voor de handelingen in de juiste positie gehouden met behulp van een tweede met olie gevulde dikkere capillair (de houder pipet) die met een slangetje is gekoppeld aan een microschoef, waaraan de eicel wordt vastgezogen. Beide capillairs zijn vastgeklemd in micromanipulators die zijn bevestigd op de objecttafel van een (omkeer)microscoop en die worden bediend met behulp van 'joysticks'. Om alle handelingen adequaat te kunnen uitvoeren, is een  $200-400\times$  vergroting vereist. Met behulp van speciale zgn. interferentiecontrast objectieven (Nomarski) kunnen de voorkernen goed zichtbaar worden gemaakt.

De geïnjecteerde moleculen integreren meestal in de vorm van een reeks in 'kop-staart' volgorde aan elkaar gekoppelde kopieën, op een willekeurige plaats in het genoom. Zowel de plaats van integratie als het aantal kopieën kan de expressie van het transgen sterk beïnvloeden. De eerder genoemde isolatorelementen verminderen het effect van integratieplaatsen.

Daarnaast kan integratie plaatsvinden in of nabij een functioneel gen dat daarmee kan worden uitgeschakeld. Betreft het een essentieel gen dan zullen transgene muizen met het transgen op die plaats in het genoom in homozygote vorm niet levensvatbaar zijn. Schattingen geven aan dat dit zich in ruim 10% van de integraties voordoet.



Figuur 2: Schematische weergave van de opeenvolgende stappen in transgenese door middel van micro-injectie van DNA in bevruchte eicellen van de muis (+ = transgeen; - = niet transgeen).

Bovendien zijn ook veranderingen in het genoom gerapporteerd zoals kleine deleties, die het gevolg zijn van het complexe integratieproces van het transgen. In de dagelijkse laboratoriumpraktijk worden daarom altijd een aantal (3-5) primaire transgene muizen gemaakt door middel van eicelinjectie, waarna in de nakomelingen de expressie van het transgen wordt geanalyseerd. De muizen met het gewenste expressieprofiel van het transgen worden geselecteerd voor verder onderzoek.

Ondanks genoemde beperkingen en onzekerheden zijn met behulp van micro-injectie in de afgelopen 25 jaar met succes honderden verschillende transgen-constructen, coderend voor eiwitten met zeer uiteenlopende functies en afkomstig van allerlei diersoorten, tot expressie gebracht gedurende bepaalde ontwikkelingsstadia van de muis en in bepaalde celtypen en organen.

### Infectie van pre-implantatie embryo's met retrovirale vectoren

Retrovirussen behoren tot een klasse virussen waarvan het genoom uit RNA bestaat. Bij het infectieproces wordt dit RNA in de levende cel gebracht, samen met een viraal eiwit dat het RNA omzet in DNA, dat vervolgens integreert in het genoom van de gastheer cel. Met behulp van recombinant-DNA-technologie zijn dergelijke virussen omgebouwd tot transporteurs (virale vectoren) van genetische informatie. Een voordeel van dit systeem is dat de virale vector als een enkele kopie in het gastheer genoom integreert, maar de plaats van integratie is even onbepaald als bij micro-injectie. Een nadeel is dat slechts een transgen van relatief geringe lengte kan worden overgebracht door de vector. De toepassing van deze technologie bleef tot voor kort beperkt, omdat een op dergelijke



wijze ingebracht transgen meestal niet goed tot expressie bleek te komen. Met vectoren afgeleid van lenti-virussen, een klasse retrovirussen waartoe ook het AIDS virus behoort, is dat probleem onlangs overwonnen. Daarmee is de belangstelling voor het gebruik van virale vectoren voor transgenese weer sterk toegenomen. Vooral omdat dergelijke vectoren zeer geschikt zijn gebleken om speciale korte RNA moleculen (siRNA) tot expressie te brengen, die zo zijn gemaakt dat ze complementair zijn aan een deel van een bekend boodschapper RNA (mRNA). Na te zijn gebonden aan het complementaire deel van dit mRNA bewerkstelligen deze siRNA moleculen de afbraak van het volledige mRNA, zodat dit niet meer in eiwit kan worden vertaald. Deze nieuwe vorm van interventie, ditmaal op RNA niveau, aangeduid met RNAi ("RNA interference"), heeft zijn bruikbaarheid in celkweek al nadrukkelijk bewezen. Hoewel het aantal succesvolle voorbeelden nog beperkt is, lijkt RNAi ook in levende dieren een nieuw krachtig en vooral ook snel hulpmiddel te worden om de functie van genen te analyseren.

De infectie van bevruchte eicellen vindt plaats door middel van injectie van een virus suspensie onder de zona

pellucida of door infectie van bevruchte eicellen waarvan de zona pellucida is verwijderd. In vergelijking met microinjectie is de kans op schade aan het embryo bij infectie verwaarloosbaar. Er is een efficiëntie gerapporteerd in de orde van 98% transgene nakomelingen. De directe infectie van embryo's, waarvan de zona pellucida is verwijderd, stelt minder hoge technische eisen dan microinjectie en is daarom goedkoper en vooral geschikt voor laboratoria die niet vertrouwd zijn met microinjectie. Bovendien lijkt deze route geschikt voor andere diersoorten, waarin tot nu toe geen transgenese mogelijk is gebleken. Bij vogels is het zelfs de enige succesvolle methode van transgenese. Tegenover deze vele voordelen staan onduidelijkheden met betrekking tot de biologische veiligheid. In verband met mogelijke risico's moet het maken van transgene muizen met virale vectoren daarom achter veiligheidsbarrières plaats vinden. Wanneer echter de nakomelingen van met retrovirale vectoren gemaakte transgene muizen ook worden beschouwd als potentieel geïnfecteerde dieren, die achter kostbare veiligheidsbarrières gehouden moeten worden, ontstaan er aanzienlijke praktische problemen.

## Het maken van chimere muizen

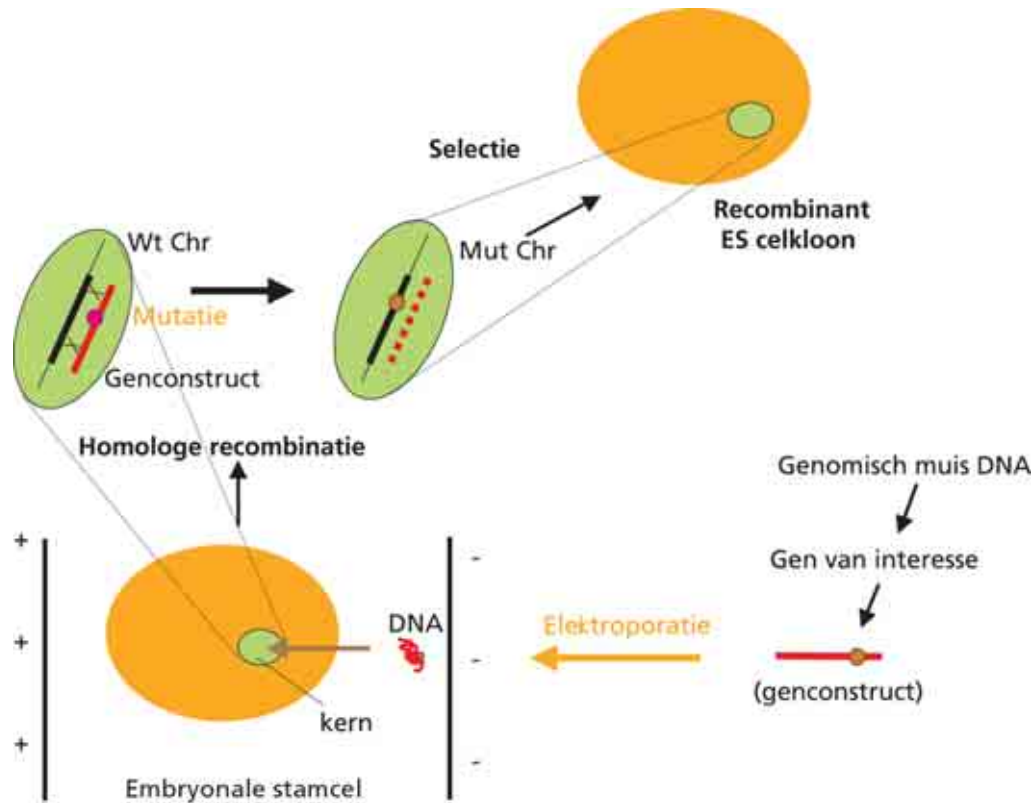
Een dunne glascapillair (injectiepipet waarvan de binnendiameter iets groter is dan de diameter van een ES-cel), verbonden met een microschoef en waarin 8 tot 12 ES-cellen zijn opgezogen, wordt door de zona pellucida tussen twee cellen van het trophectoderm door tot in de blastocoel geprikt. Vervolgens worden met behulp van de microschoef de ES-cellen in de blastocoel geïnjecteerd. Of de muizen die 19 dagen na de manipulaties worden geboren daadwerkelijk mozaïek zijn, kan eenvoudig worden bepaald door gebruik te maken van ontvanger-blastocysten afkomstig van een muizenstam met een andere vachtkleur (bijvoorbeeld zwart) dan die waarvan de ES-cellen afkomstig zijn (bijvoorbeeld wit). Een chimaera verdraagt zich onmiddellijk door het (zwart/wit) vlekkenpatroon van zijn vacht. De mate waarin de vachtkleur aanwezig is van de stam waarvan de ES-cellen afkomstig zijn, is een directe indicatie voor de bijdrage van de ES-cellen aan de chimaera (figuur 5).

Men maakt voornamelijk gebruik van ES-cellen van mannelijke oorsprong omdat een bijdrage van 'mannelijke' ES-cellen aan de ontwikkeling van het geslachtsorgaan (kiembaan) van een chimeer resulteert in de ontwikkeling van een mannetje, ongeacht het geslacht van de ontvanger-blastocyst waarin deze cellen zijn geïnjecteerd. Wanneer de altijd variabele bijdrage van de ES-cellen aan het geslachtsorgaan van de chimeer erg laag is, zal de hoeveelheid geslachtscellen afkomstig van de ES-cellen gering zijn. Daardoor zal de frequentie waarmee de in deze ES-cellen aangebrachte genetische verandering op de nakomelingen van de chimeer wordt overgedragen eveneens erg laag zijn. Dit betekent over het algemeen, dat er veel nakomelingen zullen moeten worden gefokt om een nakomeling te verkrijgen met die genetische verandering. Dat kan heel gemakkelijk met een mannetje maar niet met een vrouwtje.

### Transfectie van embryonale stamcellen

De derde methode, gebaseerd op gen overdracht in embryonale stamcellen (ES-cellen) en ontwikkeld eind jaren 80 van de vorige eeuw, betekende een nieuwe doorbraak in de mogelijkheden van genetische modificatie bij zoogdieren. De eerste stap was het ontwikkelen van kweekmethoden om uit de eerder genoemde ICM van het laatste pre-implantatie stadium van het embryo, de blastocyst, stabiele ES-cellijnen te kweken, zodanig dat de unieke zgn. **pluripotente** eigenschappen van deze

cellen (het vermogen om aan de ontwikkeling van alle mogelijke weefsels van het embryo bij te dragen) behouden bleven. Dit is tot nu toe uitsluitend gelukt bij de muis. Wanneer gekweekte ES-cellen in de holte, blastocoel, van een blastocyst worden geïnjecteerd, aggregeren ze met de aanwezige ICM-cellen. Nadat de blastocyst is teruggeplaatst in de baarmoeder van een schijnzwangere draagmoedermuis, kan zich uit het mengsel van embryonale cellen van verschillende herkomst een zogenaamd **mozaïek embryo** ontwikkelen. De muis die daar-



Figuur 3: Schematische weergave van de genetische modificatie van embryonale stamcellen. Uit het genoom van muizencellen wordt DNA geïsoleerd. Daaruit wordt een gedeelte van een gen van interesse gekloneerd en vervolgens gemodificeerd, dat wil zeggen in geval van een KO wordt een deel van de genetische code verwijderd (mutatie) en vervangen door een zg. selectiegeen (⊕). Vervolgens wordt het gemodificeerde DNA (genconstruct) d.m.v. elektroporatie in ES-cellen gebracht, waarna met een bepaalde kans homologe recombinatie optreedt tussen het ingebrachte DNA en het overeenkomstige (homologe) deel van het ontvangende ES-cel chromosoom (wt chr). Hierbij zal de in het genconstruct aangebrachte mutatie overgaan naar het wildtype (wt) chromosoom samen met het selectiegeen. In selectie medium kunnen de ES-cellen met de aangebrachte mutatie/selectiegeen (Mut Chr) worden vermeerderd terwijl cellen die geen selectiegeen hebben opgenomen zullen dood gaan.

uit wordt geboren wordt in vakjargon aangeduid met het uit de Griekse mythologie afkomstige begrip **chimaera**. Dit is een enigszins misleidende naam omdat de embryonale cellen niet van verschillende diersoorten afkomstig zijn.

Wanneer aan het genoom van de ingebrachte ES-cellen door middel van gen-overdracht een DNA-construct is toegevoegd en deze cellen bijdragen aan de kiembaan (dat wil zeggen de geslachtscellen) van de chimaera is deze volgens de definitie transgeen en zal transgene nakomelingen kunnen voortbrengen. Het voordeel van deze procedure is dat de genoverdracht niet in het embryo maar in ES-cellen plaatsvindt die gemakkelijk in grote hoeveelheden kunnen worden gekweekt. Zodoende werd het mogelijk in celcultures met eenvoudige procedures genetische veranderingen te selecteren die slechts met lage frequentie optreden, zoals nauwkeurig gedefinieerde mutaties.

De meest toegepaste methode van genoverdracht in celcultures is **elektroporatie**. Hierbij wordt een suspensie van losse cellen samen met het opgeloste DNA in een speciale elektrodekamer gebracht waarna een korte elektrische spanningspuls (+240–800V gedurende 1-7 mS) wordt gegeven. Hierdoor ontstaan tijdelijk openingen in de membranen die de cel en zijn kern omgeven, waar de relatief grote DNA-moleculen door naar binnen kunnen komen, zodat ze in het genoom kunnen integreren (figuur 3).

### Het maken van KO-muizen door middel van genetische modificatie van ES-cellen

Een tweede cruciale stap in de embryonale stamceltechnologie was het ontwikkelen van methoden om naast de 'gewone' genoverdracht ook veranderingen aan te kunnen brengen in de genen die aanwezig zijn in het genoom van deze cellen (figuur 3). De meest gangbare methode is gebaseerd op het natuurlijke proces van *homologe recombinitie*, dat optreedt bij de vorming van de geslachtscellen. Hierbij paren voorafgaande aan de reductiedeling de overeenkomstige chromosomen (een afkomstig van de vader, de andere van de moeder), die vervolgens delen met elkaar uitwisselen. Dit proces van herschikking van het erfelijke materiaal, wordt *homologe recombinitie* genoemd. (Het heeft tot doel de diversiteit van de nakomelingen zo groot mogelijk te maken om de kans om als soort te overleven, te optimaliseren.)

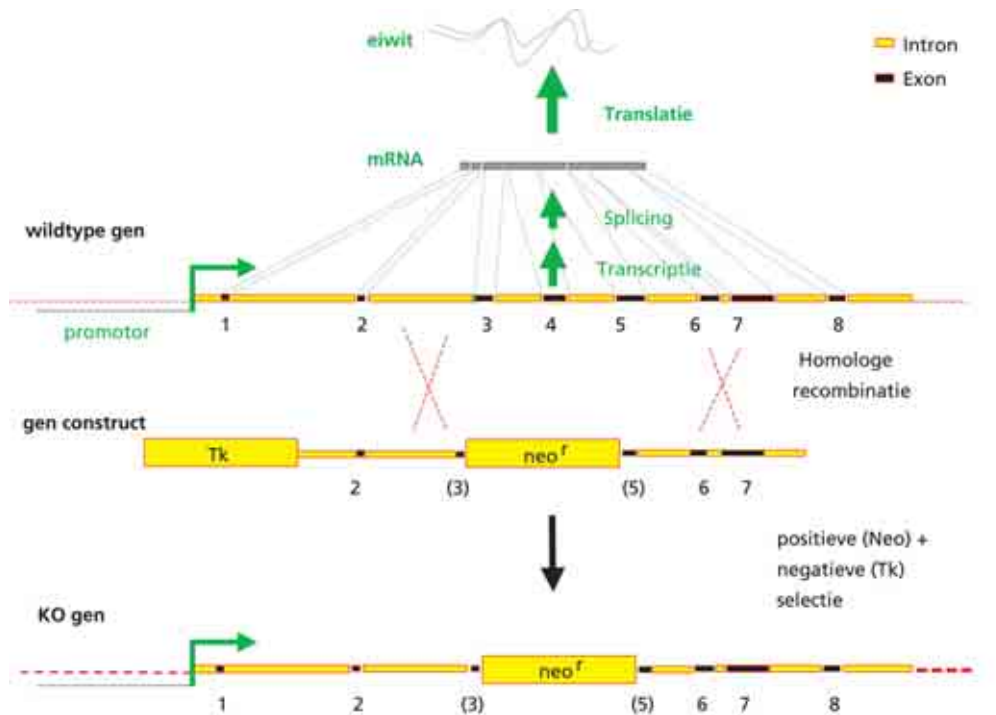
Deze homologe recombinitie wordt gekatalyseerd door speciale enzymen die ook aanwezig bleken te zijn in ES-

cellen. Wanneer in ES-cellen een DNA-fragment wordt gebracht dat identiek is aan een muizen-gen en waarin een deel van de eiwitcode is vervangen door een klein zogenaamd selectie-gen, zal door middel van homologe recombinitie met het overeenkomstige gen in het genoom van de ES-cel, het selectie-gen in het genoom kunnen worden opgenomen. Dit heeft tot resultaat dat het cellulaire gen niet langer functioneel is (figuur 4).

Een groot probleem was aanvankelijk dat homologe recombinitie tussen het ingebrachte genconstruct en het overeenkomstige DNA in het genoom met veel lagere frequentie bleek op te treden dan willekeurige integratie van het genconstruct. Het in het transgeen aanwezige selectie-gen (in dit voorbeeld het neo-gen) zorgt voor resistentie tegen een aan het kweekmedium toegevoegde toxische stof. Alle ES-cellen die het transgeen stabiel in hun genoom hebben opgenomen, zijn resistent geworden tegen deze toxische stof en kunnen doorgroeien (positieve selectie), de rest gaat dood. Deze selectie-methode maakt dus geen onderscheid mogelijk tussen homologe recombinitie en willekeurige integratie.

Dit werd op twee verschillende manieren opgelost. Enerzijds is gebleken dat bij gebruik van genconstructen afkomstig van *dezelfde muizenstam* als waarvan de ES-cellen zijn afgeleid de frequentie van homologe recombinitie sterk toeneemt. De efficiëntie van homologe recombinitie neemt kennelijk toe naarmate de betrokken DNA-moleculen meer met elkaar overeenkomen. Anderzijds biedt toevoeging van een tweede selectie-gen (in het voorbeeld in fig.4. Thymidine kinase =Tk) aan één uiteinde van het DNA-construct de mogelijkheid om door middel van dubbele (positieve- en negatieve) selectie direct onderscheid te maken tussen willekeurige integratie en homologe recombinitie. Het tweede selectie-gen wordt bij willekeurige integratie (een recombinitieproces dat via de uiteinden van het construct verloopt) wel maar bij homologe recombinitie (die via een interactie tussen overeenkomstige delen van de betrokken moleculen verloopt) niet in het genoom van de ES-cel opgenomen. Door het tweede selectie-gen zodanig te kiezen dat negatieve selectie mogelijk is, dat wil zeggen dat de cellen waarin het tweede selectie-gen aanwezig is dood gaan wanneer aan het kweekmedium een bepaalde stof is toegevoegd, zullen bij combinatie van positieve en negatieve selectie uitsluitend de cellen waarin homologe recombinitie heeft plaatsgevonden overleven (figuur 4).





Figuur 4: Het verkrijgen van een KO (knock-out) gen door middel van homologe recombinatie. In dit voorbeeld treedt homologe recombinatie op tussen een wildtype gen (aanwezig in ES-cellen) en een genconstruct dat deels identiek is aan het **wildtype-gen**. In het genconstruct is het middensegment (in dit voorbeeld van exon 3 tot 5) vervangen door het neo-selectiegen voor *positieve selectie*. Aan een van de uiteinden van het **genconstruct** is een Tk-gen geplaatst om *negatieve selectie* mogelijk te maken. De exonen (eiwit-coderende DNA-segmenten) van het cellulaire gen zijn genummerd van 1 tot 8. Na homologe recombinatie is in dit voorbeeld een deletie in het gen ontstaan waarbij exon 4 geheel en exonen 3 en 5 gedeeltelijk zijn verwijderd, waardoor het gen niet meer tot expressie kan komen (**KO-gen**). Bovendien is het neomycine selectie-gen in het cellulaire gen opgenomen. Door toevoeging van Neomycine aan het kweekmedium (*positieve selectie*) kunnen uitsluitend cellen die het gen-construct stabiel in hun genoom hebben opgenomen, overleven. Cellen waarin het gehele genconstruct inclusief het Tk-gen via niet-homologe recombinatie op een willekeurige plaats in het genoom is geïntegreerd (niet weergegeven), kunnen vervolgens door middel van *negatieve selectie* worden verwijderd. Negatieve selectie vindt plaats door toevoeging van de stof gancyclovir aan het groeimedium. Het Tk-gen zet gancyclovir om in een toxische stof waardoor de cellen die het Tk-gen bevatten, dood gaan. In het bovenste deel van de figuur zijn schematisch de belangrijkste stappen in de expressie van een eukaryotisch gen weergegeven.

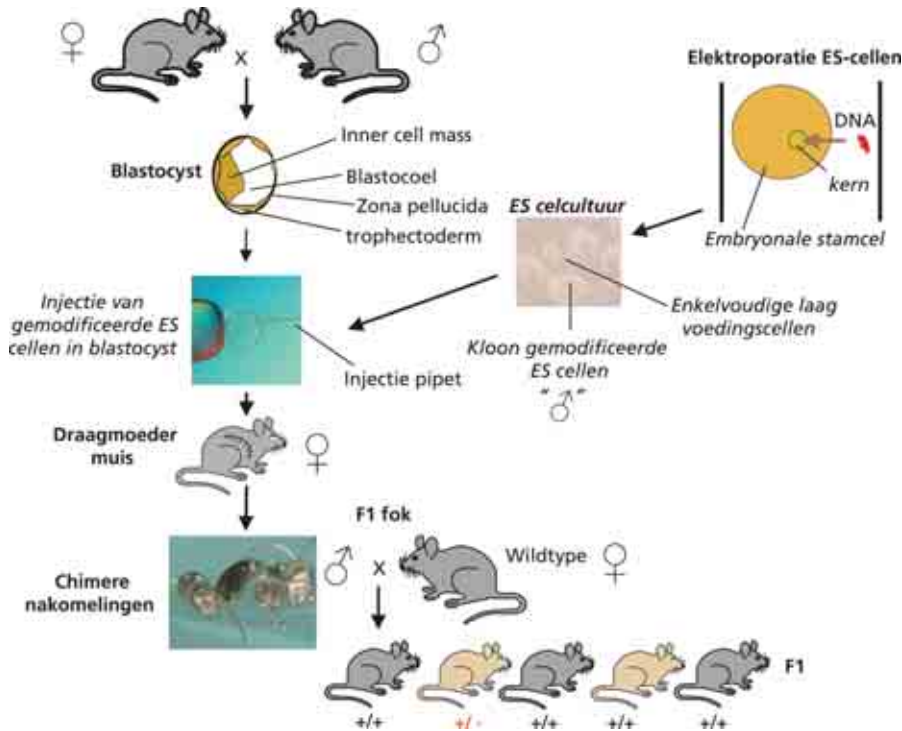
Met de aldus verkregen gemuteerde ES-cellijnen kunnen op de hiervoor beschreven wijze chimaere muizen worden gemaakt, waarmee nakomelingen kunnen worden gefokt, die heterozygoot zijn voor de aangebrachte mutatie. Onderling kruisen van deze heterozygote nakomelingen resulteert in nakomelingen waarvan (volgens Mendel) 25% homozygoot is voor de mutatie, waarin dus de functie van een bepaald gen volledig ontbreekt, de zgn. knock

out of **KO-muizen**. Met gebruikmaking van deze methode zijn in de afgelopen 15 jaar honderden KO-muizenstammen gemaakt die ieder afzonderlijk een ander defect gen bevatten. Analyse van het fenotype van deze KO-muizenstammen heeft een overweldigende hoeveelheid nieuwe informatie opgeleverd over de biologische functie van deze genen en hun eventuele rol in ziekten (figuur 5).

## Conditionele KO-muizen

Hoe elegant en krachtig de tot dusver beschreven methoden ook zijn, toch kleven er nog bezwaren aan. De door homologe recombinatie in ES-cellen aangebrachte mutaties zijn namelijk vanaf het allervroegste stadium van de embryonale ontwikkeling aanwezig in alle cellen. Wanneer het door mutatie onklaar gemaakte gen essentieel is voor de ontwikkeling van het embryo, zullen nakomelingen die homozygoot zijn voor de mutatie niet levensvatbaar zijn. Bovendien kan een en hetzelfde gen tot expressie komen in verschillende celtypen, die op hun beurt weer aanwezig zijn in verschillende organen waar ze soms verschillende functies vervullen.

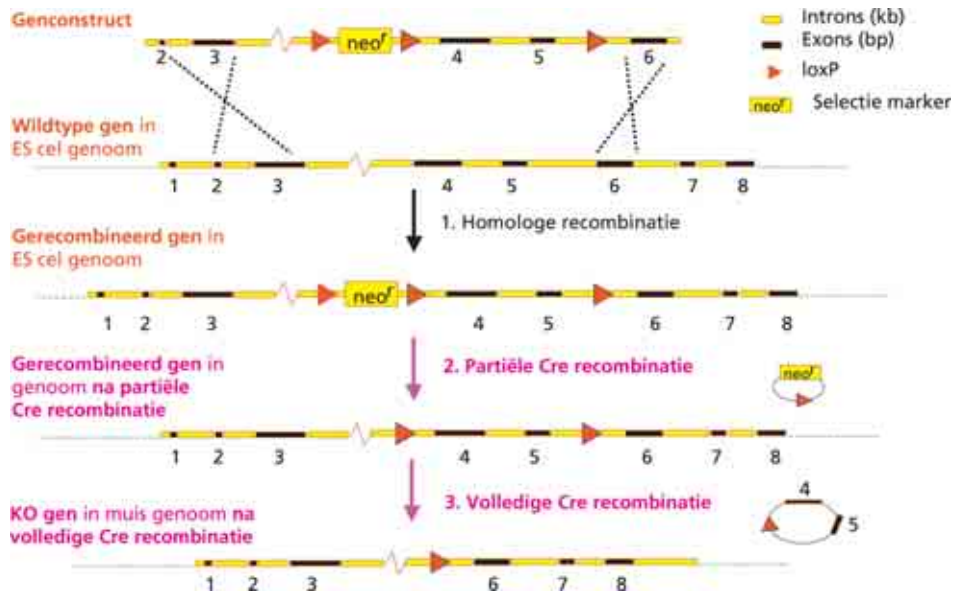
Wanneer een specifieke functie van een gen in een bepaald celtype essentieel is voor de embryonale ontwikkeling, zal het ontbreken van levensvatbare nakomelingen de analyse van de andere functies van het gen in andere weefsels onmogelijk maken. Het fenotype van een KO kan ook het gevolg zijn van z.g. systemische effecten van de mutatie, dat wil zeggen dat het ontbreken van een bepaald gen consequenties heeft voor het functioneren van het gehele dier. Bovendien blijken biologische systemen soms in staat om de gevolgen van het ontbreken van bepaalde genen sterk te verminderen door middel van *adaptatie* tijdens de embryonale ontwikkeling. Dit alles beperkt de mogelijkheden om de functie van een gen af



Figuur 5: Schematische weergave van de opbouw van transgene muizen via ES-cellen. Chimaere nakomelingen ontwikkelen zich uit een mengsel van embryonale stamcellen afkomstig van twee genetisch (enigszins) verschillende muizenstammen, bijvoorbeeld met verschillende vachtkleur en zijn daarom gevlekt. De chimere muizen die de in de ES-cellen aangebrachte mutatie kunnen overdragen op hun F1 nakomelingen worden aangeduid met kiembaan chimaera. In het weergegeven voorbeeld hebben alle F1 nakomelingen, die zich hebben ontwikkeld uit eicellen, bevrucht door zaadcellen gevormd uit de ingebrachte ES-cellen van de chimere muis, een bruine vacht. De helft van de bruine muizen bevat de genetische modificatie (+/-). Daarmee kan door onderling kruisen een muizenstam worden gefokt die homozygoot is voor de aangebrachte mutatie (-/-, niet afgebeeld) en die KO wordt genoemd wanneer de mutatie resulteert in een volledig defect gen.

te leiden uit de analyse van het fenotype van de KO muis, waarin dat gen vanaf het allereerste begin en in alle weefsels ontbreekt. Deze beperkingen kunnen worden omzeild wanneer de gewenste mutatie later wordt aangebracht, na de geboorte en uitsluitend in een vooraf geselecteerd celttype of weefsel. De ontdekking van enzymen uit lagere organismen, die de recombinatie katalyseren tussen relatief korte specifieke DNA-elementen legde de basis voor de ontwikkeling van regelbare recombinatiesystemen voor het aanbrengen van mutaties op een nauwkeurig vastgelegde plaats en tijd in het genoom, en in uitsluitend bepaalde celttypen. Het meest gebruikte enzym, *Cre-recombinase* (kortweg Cre genaamd), afkomstig van een bacteriofaag (virus dat uitsluitend bacteriën infecteert), katalyseert de recombinatie tussen specifieke DNA-elementen die loxP sites worden genoemd. *LoxP sites* komen van nature niet

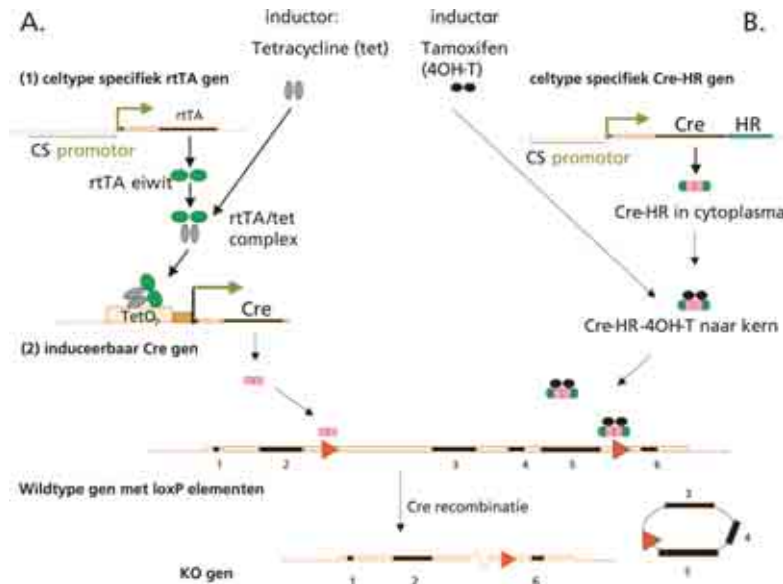
voor in het genoom van zoogdieren, terwijl Cre zijn specifieke activiteit in ES-cellen wel behoudt. Door middel van homologe recombinatie in ES-cellen kunnen loxP sites DNA-elementen worden aangebracht in de niet-coderende intronen van bijvoorbeeld het nephrine gen (vergelijk fig. 6.) zonder daarbij de functie van dat gen te verstoren. Wanneer de met deze ES-cellen gemaakte muizen worden gekruist met transgene muizen die Cre tot expressie brengen in bijvoorbeeld podocyten, een bepaald celttype in de nier, dan zal in de dubbel-transgene nakomelingen uitsluitend in de podocyten recombinatie optreden tussen de loxP sites elementen. Dat betekent dat het deel van het gen dat tussen twee loxP sites elementen ligt, wordt verwijderd (waarbij één loxP site achterblijft). Mede afhankelijk van de plaats van de loxP sites elementen zal dat er toe leiden dat het gen niet langer functioneel is, in dit voorbeeld uitsluitend in de podocyten in de nier.



Figuur 6: Specifieke geregleerde recombinatie. Het recombinase Cre herkent specifieke DNA-elementen, loxP sites genaamd. Door middel van homologe recombinatie in ES-cellen worden eerst 3 loxP sites elementen in de niet-coderende delen (intronen) van het te muteren gen gebracht (stap 1). In de aldus verkregen ES-cellen wordt actief 'Cre' enzym ingebracht en vervolgens worden ES-cellen geselecteerd, waarin een zodanige onvolledige Cre-recombinatie is opgetreden dat uitsluitend de selectie marker is verdwenen, er nog twee loxP sites elementen over zijn maar het gen intact is gebleven (stap 2). Met deze ES-cellen worden chimaere muizen gemaakt, waaruit een muizenstam wordt gefokt. Wanneer deze muizen vervolgens worden gekruist met muizen die het Cre-celttype specifiek tot expressie brengen, zal in de nakomelingen het gen met de loxP sites-elementen een verdere recombinatie ondergaan in uitsluitend die cellen waarin Cre tot expressie komt (stap 3). Dit resulteert in de verwijdering van het deel van het gen dat tussen twee loxP sites elementen is gelegen (exon 4 en 5) waarbij één loxP sites element achterblijft. De door Cre-recombinatie verwijderde delen zijn als circulaire moleculen weergegeven met één enkel loxP sites element.

Met een dergelijk model is aan één voorwaarde nog niet voldaan en dat is het kunnen bepalen op welk tijdstip tijdens het leven van de muis de mutatie in het gekozen gen wordt aangebracht. Hiervoor is nodig de expressie van Cre in de tijd zo te reguleren, dat deze onder niet geactiveerde omstandigheden afwezig is of zeer laag en na inductie heel hoog. Het inductie mechanisme mag niet interfereren met cellulaire processen. Met behulp van twee geheel verschillende benaderingen is dit mogelijk geworden. De eerste stap van gen-expressie, de transcriptie, wordt gereguleerd door de eerder genoemde speciale DNA-elementen in het gen, promotors, en door eiwitten, transcriptie factoren, die specifiek aan deze promotors binden. Bacteriën bezitten hun eigen unieke componenten om de transcriptie van hun genen te regelen en die niet

interfereren met de overeenkomstige componenten in cellen van eukaryoten. Transcriptiefactoren, zijn net als alle grote eiwitten, vaak opgebouwd uit verschillende domeinen die verschillende functies vervullen. Ze bestaan enerzijds uit een domein dat aan een promotor bindt en anderzijds uit een domein dat de transcriptie stimuleert. Door het domein van een bacterie eiwit dat aan een specifiek bacterieel DNA-element bindt te koppelen aan het activerend domein van een transcriptie factor die in muizencellen actief is, werd een volledig artificiële, unieke transcriptie factor gecreëerd. Daarbij werden het bacteriële eiwitdeel en het bijbehorend DNA-element (promotor) zodanig gekozen, dat binding van het eiwitdeel aan het DNA-element alleen kan plaatsvinden in aanwezigheid van het antibioticum tetracycline (Tet).



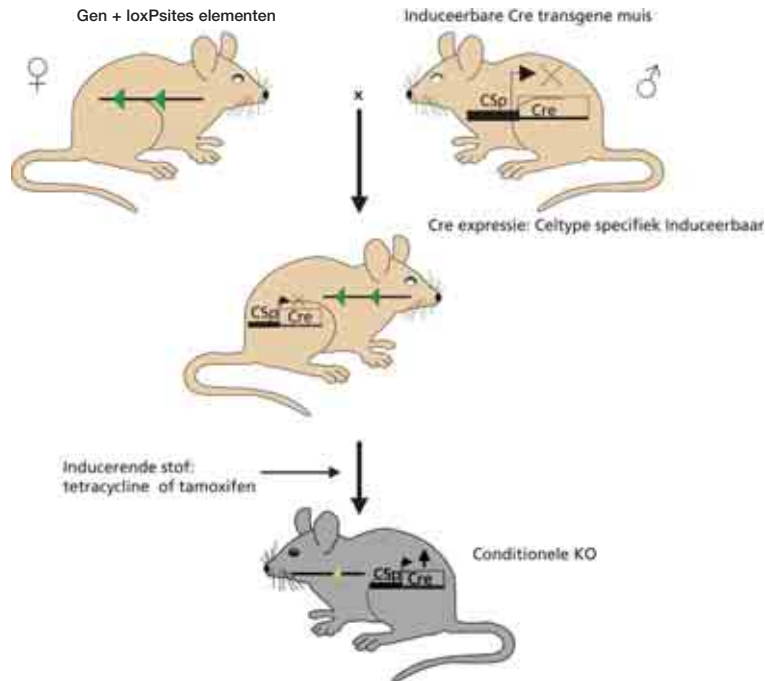
Figuur 7: Induceerbare expressie van het recombinase Cre. Het linkerdeel (A) toont een variant van het tetracycline (Tet) induceerbare systeem, waarmee de expressie van een gen op transcriptie-niveau kan worden gereguleerd. Gen (1) codeert voor een artificiële transcriptie-factor, rtTA, die uitsluitend aan een artificiële promotor (TetO7) van gen (2) kan binden in de aanwezigheid van Tet. Toediening van Tet (bijvoorbeeld in het drinkwater) leidt tot de vorming van het rtTA/Tet complex. Binding van het rtTA/Tet complex aan de TetO7 promotor resulteert in activatie van gen (2) dat codeert voor Cre. Omdat het rtTA-coderend gen (1) onder controle staat van een celtype specifieke (CS) promotor is de Cre-expressie tevens celtype-specifiek. De werking van Cre is dus regelbaar en afhankelijk van de toediening van het antibioticum Tet.

Het rechterdeel (B) toont een alternatieve methode gebaseerd op regulatie op eiwitniveau. Muizen worden transgeen gemaakt voor een kunstmatig gen dat codeert voor een hybride eiwit bestaande uit het Cre-enzym en een hormoonreceptor (HR). Het Cre-HR fusie eiwit waarvoor het transgen codeert, bevindt zich in het cytoplasma en is dus inactief. Dient men echter een hormoon toe (bijvoorbeeld via injectie), in dit geval een analoog voor een geslachtshormoon, tamoxifen, dan bindt het hormoon aan de hormoonreceptor HR waardoor het gehele Cre-HR-tamoxifen complex van het cytoplasma naar de kern verhuist. In de kern veroorzaakt het Cre-gedeelte van het complex vervolgens recombinatie tussen de aanwezige loxP sites elementen waardoor een mutatie ontstaat. Het ontstaan van de mutatie is dus regelbaar, omdat deze pas optreedt nadat het hormoon aan het dier is toegediend.

Door nu enerzijds het gen dat codeert voor de artificiële transcriptiefactor aan een celtype-specifieke promotor te koppelen (transgen 1), en anderzijds het Cre-gen te koppelen aan de artificiële promotor waaraan de artificiële transcriptiefactor bindt (transgen 2), kan in een transgene muis die beide transgen-constructen bevat het Cre-gen celtype specifiek door Tet worden gereguleerd (figuur 7A). In principe is dit (Tet) systeem geschikt om elk willekeurig transgen induceerbaar te maken.

Behalve op transcriptie niveau kan de functie van een gen soms ook op eiwit niveau worden gereguleerd. Voor de functie van Cre-recombinase is dit mogelijk gebleken door fusie van het Cre-eiwit met het hormoon-bindend domein van een hormoon receptor, in dit geval een geslachtshormoon receptor. Een eigenschap van dit type hormoon bindende domeinen is dat ze in het cytoplasma gelokaliseerd zijn. (Dit geldt ook als het domein gefuseerd is met het Cre-eiwit). Aangezien Cre een DNA-recombinase is, dat zijn activiteit uitsluitend in de kern van de cel waar het DNA zich bevindt, kan uitoefenen, is

het Cre-hormoon receptor complex inactief. Pas in aanwezigheid van het betreffende hormoon, dat aan het receptordeel bindt, verhuist het fusie-eiwit van het cytoplasma naar de celkern. Het Cre-gedeelte kan dan zijn werk doen, dat wil zeggen loxPsites elementen onderling laten recombineren, zodat het gen waarin de loxPsites elementen zijn aangebracht wordt gemuteerd (figuur 7B). Door gebruik te maken van gemodificeerde hormoon receptoren die artificiële hormonen herkennen, kon een systeem worden gecreëerd dat niet interfereert met de binding van de normale geslachtshormonen aan hun receptoren. Door de expressie van het gen dat codeert voor dit Cre-hormoon receptor fusie-eiwit te laten regelen door een celtype-specifieke promotor kan een muis-model worden gecreëerd, waarin op ieder gewenst tijdstip in een specifiek celtype de recombinatie van een bepaald gen, mits voorzien van loxPsites elementen, kan worden geïnduceerd (figuur 8). De toepasbaarheid van dit type regulatie op eiwit niveau beperkt zich tot eiwitten die uitsluitend actief zijn in de kern zoals Cre.



Figuur 8: Fokschema voor het verkrijgen van een conditionele KO muis waarin de mutatie van een gen naar keuze op ieder gewenst tijdstip kan worden geïnduceerd in een vooraf gekozen celtype. CSp= cel (weefsel) specifieke promotor.

## Conclusie

Het transgene muis model heeft zich in de afgelopen 25 jaar ontwikkeld tot een systeem waarin alle genetische manipulaties toepasbaar zijn die uit andere genetische systemen in lagere organismen, zoals bacteriën, gist, en de fruitvlieg, bekend zijn. Transgenese door middel van micro-injectie van bevruchte eicellen is een betrouwbare efficiënte methode gebleken voor het maken van genetisch-gemodificeerde muizen, waarmee een extra gen aan het bestaande genoom kan worden toegevoegd. Het aantal kopieën van het transgen dat integreert en de plaats van integratie zijn niet voorspelbaar, maar aan de grootte van het construct worden weinig eisen gesteld. Transgen-constructen van aanzienlijke lengtes kunnen worden geïnjecteerd. De methode wordt al 25 jaar toegepast.

Het uitschakelen van genen door middel van homologe recombinatie in embryonale stamcellen, waarmee KO-muizen kunnen worden gemaakt, is een volledig gestandaardiseerde technologie geworden. Ook hier lijkt het gebruik van grote constructen een positieve bijdrage te leveren aan de effectiviteit van de techniek.

De toepassing van celtyp-specifieke promotors om de expressie van specifieke recombinases zoals Cre te reguleren die de door middel van homologe recombinatie in het genoom aangebrachte loxP sites elementen herkennen (figuur 6), maakt het mogelijk om een gen uit te schakelen uitsluitend in celtypen waarin de gekozen promotor actief is (figuur 7 en 8). Induceerbare genexpressiesystemen maken het bovendien mogelijk om het tijdstip waarop een gen door recombinatie wordt afgeschakeld te kiezen. Het is niet duidelijk welke van de beschikbare systemen de voorkeur verdient, de transcriptie regulatie met behulp van bacteriële transcriptie-regulatie componenten, of regulatie op eiwit niveau door het recombinase hormoonreceptor fusie-eiwit (figuur 7). De keuze zal mogelijk in belangrijke mate worden bepaald door het weefsel waarin inductie moet plaatsvinden. Tot op heden is de praktijk echter nogal weerbarstig gebleken als het gaat om het combineren van weefsel-specificiteit met induceerbaarheid van genexpressie. Hoewel een aantal veelbelovende voorbeelden is gepubliceerd lijkt de kans op succes vooralsnog vrij gering. De algemene verwachting is dat door voortschrijdend inzicht in de regulatie van gen expressie veel van deze problemen in de nabije toekomst zullen worden opgelost.

## Literatuur

Manipulating the Mouse Embryo  
Andras Nagy (Editor), Marina Gertsenstein (Editor),  
Kristina Vintersten (Editor), Richard Behringer (Editor)  
Publisher: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 3rd  
edition (2002)  
ISBN: 0879695919

Mouse Development: Patterning, Morphogenesis, and  
Organogenesis  
by Janet Rossant, Patrick P. Tam (Editor)  
Publisher: Academic Press; 1st edition (March 1, 2002)  
ISBN: 0125979517

Strategies in Transgenic Animal Science  
by Glenn M. Monastersky (Editor), James M. Robi  
(Editor)  
Publisher: American Society Microbiology; (1995)  
ISBN: 1555810969



Kamer met muizenrek.





Impressie van de laboratoriumpraktijk van het maken van transgene muizen.





# 2 Genetisch-gemodificeerde muizen

## Wat hebben we eraan?

ANTON BERNS

*Prof. dr. A.J.M. Berns is moleculair geneticus en sinds 1999 wetenschappelijk directeur van het Nederlands Kanker Instituut / Antoni van Leeuwenhoek Ziekenhuis. Zijn onderzoek richt zich op de ontwikkeling van muismodellen voor kanker. Hij studeerde chemie aan de Universiteit van Nijmegen waar hij in 1972 promoveerde op een proefschrift over messenger RNA isolatie en in vitro eiwitsynthese. Hij was vervolgens postdoc op het Salk instituut in La Jolla (Californië). Van 1975 –1985 was hij staflid van de afdeling Biochemie Universiteit Nijmegen. Daar initieerde hij het onderzoek naar methoden om muizen genetisch te modificeren met het doel om het ontstaan van kanker beter te begrijpen. In 1985 zette hij zijn onderzoek voort in het zoiest genoemde Antoni van Leeuwenhoek Ziekenhuis.*

Met genetische modificatie bij dieren bedoelen we een aantal technieken waarmee het mogelijk is het erfelijk materiaal (genoom) van dieren te veranderen. Hoewel genetische modificatie voor een reeks verschillende organismen is beschreven, zal ik me hier beperken tot zoogdieren, met het accent op de muis, het belangrijkste zoogdiermodel voor biomedisch onderzoek.

Ruim 20 jaar geleden werden de eerste transgene muizen geproduceerd door een DNA-fragment te micro-injecteren in bevruchte oöcyten (eicellen) en deze terug te plaatsen in draagmoeder muizen. Sommige muizen die uit deze oöcyten werden geboren, bevatten het gekloneerde gen in al hun lichaamscellen en gaven het door aan hun nakomelingen. Dit markeerde het begin van een nieuw tijdperk in de muizengenetica. In de loop van die 20 jaar is de technologie om dieren genetisch te modificeren enorm verfijnd. Werd aanvankelijk voornamelijk genetische informatie toegevoegd (transgenese), in de laatste 10 jaar heeft de modificatie van reeds aanwezige genetische informatie (verwijderen of heel specifiek veranderen van de eigen genen van de muis) de nadruk gehad. Juist deze laatste benadering heeft ons inzicht in biologische processen enorm verdiept.

### Toepassingsgebieden

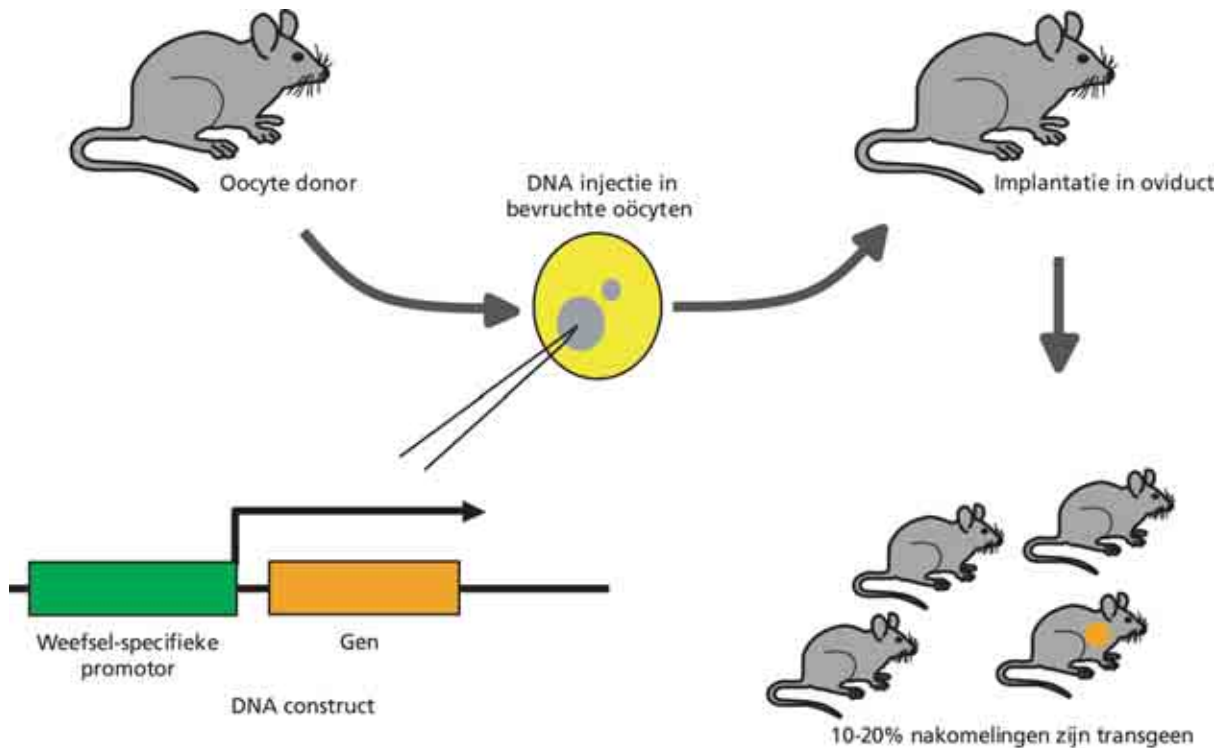
Genetische modificatie kan heel verschillende doeleinden dienen. In de meeste gevallen wordt het gebruikt om een wetenschappelijke vraag te beantwoorden. Zo'n vraag kan zijn hoe het veranderde genotype (resultierend in de aanmaak van een nieuw eiwit, dan wel de in de verhoogde of verlaagde productie van een reeds bestaand eiwit) bekende eigenschappen van het dier beïnvloedt (bijvoorbeeld een grotere gevoeligheid voor kanker of resistentie tegen ziekten).

Een meer toegepast doel kan zijn de eigenschappen van dierlijke weefsels zodanig te veranderen, dat ze geschikt worden voor xenotransplantatie (een mogelijke oplossing voor het nijpend tekort aan donororganen). Een tweede toegepast doel is het produceren van biomedische eiwitten die moeilijk langs een andere weg kunnen worden verkregen. In deze twee laatste gebieden zijn de onderzoeksinspanningen, althans in ons land, bescheiden.

Voor wat betreft de xenotransplantatie zou dit kunnen veranderen als de problemen die momenteel het gebruik van dierlijke organen voor transplantatiedoeleinden tegenhouden (afstotingsreacties, ongewenste virus overdracht: zie cahier Xenotransplantatie), worden overwonnen. Eenzelfde doorbraak zou ook ten aanzien van de

eiwitproductie kunnen plaatsvinden, al zal dit naar verwachting een beperkt toepassingsgebied blijven. Genetische modificatie om eigenschappen van voeding als melk of vlees te verbeteren of om veehouderijsystemen efficiënter of veiliger (resistentie tegen infecties) te maken, ondervindt een geduchte concurrentie van fokprogramma's, waarin al jaren genetische selectie met succes wordt toegepast.

Vooralsnog is het belangrijkste toepassingsgebied van genetisch-gemodificeerde zoogdieren het biomedisch onderzoek, waarin gepoogd wordt inzicht te verkrijgen in de functie van genen bij ziekteprocessen en bij de ontwikkeling, instandhouding en veroudering van een organisme. Daarnaast worden deze dieren meer en meer



Figuur 1: Transgenese door middel van micro-injectie van DNA. Muizen worden gesuperovuleerd door hormooninjectionen en vervolgens op natuurlijke wijze bevrucht. Bevruchte eicellen worden geïsoleerd en in een speciaal kweekmedium geplaatst. Na een aantal uren worden de voorkernen zichtbaar met behulp van een microscoop voorzien van zogenaamde Nomarski optiek. Vervolgens wordt een kleine hoeveelheid DNA in de grootste voorkern (afkomstig van de zaadcel) geïnjecteerd. Nadat de cellen gedeeld zijn, worden ze geïmplaneerd in het oviduct van een draagmoeder.

gebruikt als preklinische modelsystemen om de bruikbaarheid van mogelijke interventies te testen.

De bijdragen van genetisch-gemodificeerde organismen aan ons 'begrijpen' van "hoe de natuur werkt" zijn indrukwekkend. Het is om die reden dat genetisch-gemodificeerde organismen bijna een onmisbaar onderdeel zijn geworden van het biomedisch onderzoek wereldwijd. Hand in hand met het onderzoek zijn de technieken voor genetische modificatie verder ontwikkeld en verfijnd, in het bijzonder voor het meest bestudeerde, genetisch best gedefinieerde en bovendien goed hanteerbare zoogdier, de muis. Gedurende meer dan een eeuw zijn muizenstammen door middel van fokprogramma's geselecteerd op specifieke eigenschappen (gevoeligheid voor bepaalde kankers, obesitas, of speciale afwijkingen), zoals dat ook is gebeurd voor gezelschapdieren waar voornamelijk is geselecteerd op uiterlijke kenmerken en gedragseigenschappen.

### Hoe?

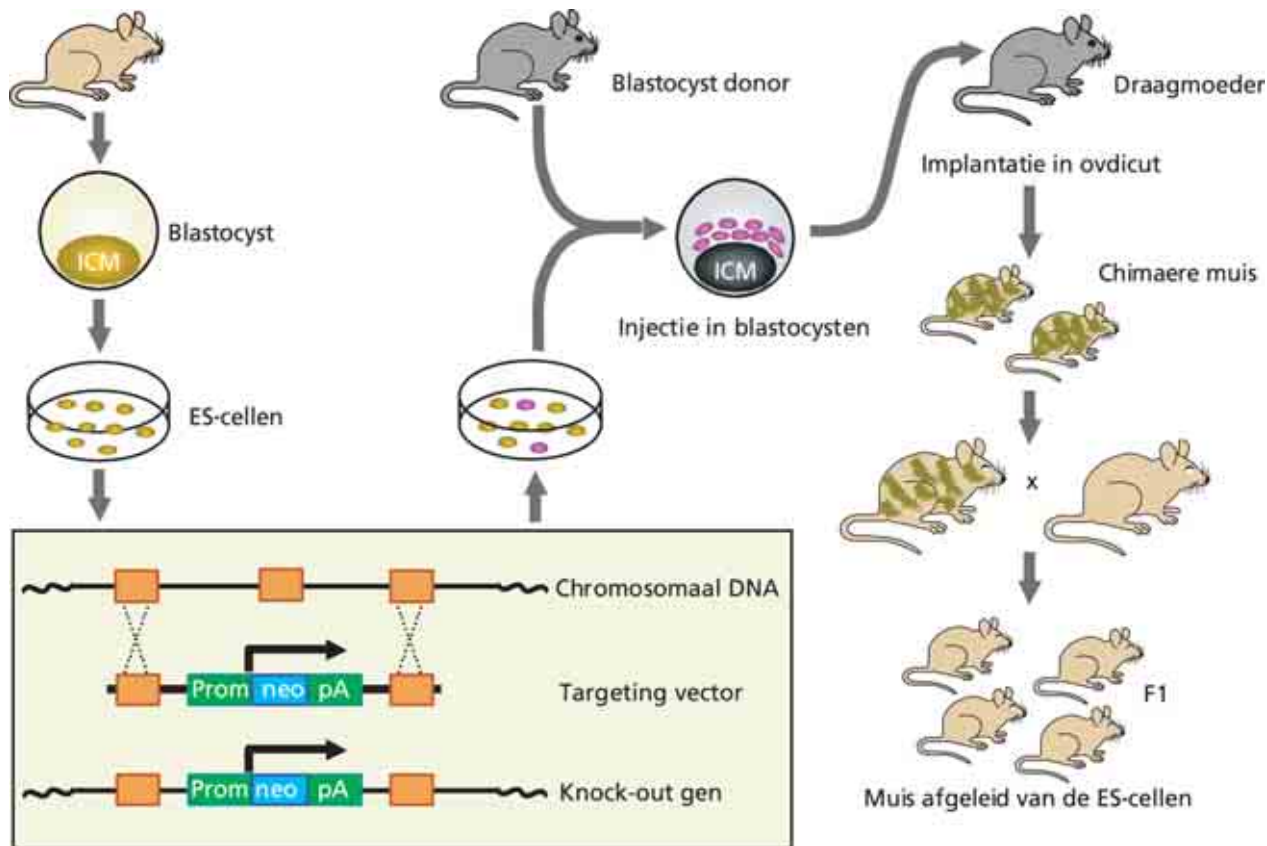
Genetische modificatie van zoogdieren kan op verschillende manieren worden bewerkstelligd (zie hoofdstuk 1). De intussen klassieke maar nog veel toegepaste benadering is het toevoegen van genetische informatie aan bevruchte eicellen via micro-injectie van DNA. Na injectie van het DNA wordt de eicel geïmplant in een draagmoeder waaruit na 20 dagen muizen worden geboren (figuur 1). Een deel daarvan draagt één of meer kopieën van het geïnjecteerde DNA in alle lichaamscellen. Immers, wanneer het DNA eenmaal is ingebouwd in een van de chromosomen van de bevruchte eicel, dan komt het transgen ook terecht in alle dochtercellen en dus ook in de geslachtscellen van de muis die uit deze eicel wordt geboren. Zo kan vervolgens door standaard fokmethoden het transgen worden doorgegeven aan de nakomelingen. Men spreekt dan van een transgene muizenlijn.

Een andere methode om transgene dieren te maken, maakt gebruik van retrovirussen. De "machinerie" van deze retrovirussen wordt dan gebruikt om een gen toe te voegen aan het DNA van pre-implantatie-embryo's. Het voordeel van deze methode is dat de efficiency hoog is en de uit te voeren handelingen relatief eenvoudig. Met name lentivirussen (HIV behoort tot die groep) zijn hiervoor geschikt.

Bovengenoemde technieken zijn erop gericht om genen toe te voegen aan een organisme en deze vervolgens op een gecontroleerde wijze tot expressie te brengen. Dat

geeft inzicht in effecten van die genen op het organisme. Echter, de expressie die op deze wijze wordt gerealiseerd, is "extra" en zegt mogelijk weinig over de "normale" functie van het gen. Om daarover een uitspraak te doen, is het beter eigen genen te inactiveren. Genen zijn te beschouwen als specialisten in een complexe maatschappij. Ze voeren taken uit die soms wel, maar vaak ook niet door andere genen kunnen worden overgenomen. Zo'n taak kan meer of minder cruciaal zijn voor de ontwikkeling en instandhouding van het organisme. Indien men nog niet weet wat de bijdrage van een bepaald gen is aan het functioneren van het organisme kan het gen worden geïnactiveerd. Vervolgens kan worden nagegaan hoe deze ingreep de eigenschappen van het organisme beïnvloedt.

De genetica gebruikt deze methode al vele decennia. Met de huidige modificatie technieken kan dit echter op een heel gerichte wijze gebeuren. In het jargon wordt gesproken van een "knock-out", wanneer een gen volledig wordt geïnactiveerd en van een "knock-down", wanneer de expressie van een gen wordt gereduceerd. Bij een "knock-in" wordt genetische informatie op een vooraf gekozen plaats in het genoom ingevoegd. Subtiële modificaties van een gen worden hierbij mogelijk (bijvoorbeeld verandering van één enkel aminozuur). Om een knock-out te maken, wordt meestal een deel van een gen uit het chromosoom verwijderd. Vijftien jaar geleden leek dit onhaalbaar. Hoe zou men ooit in staat zijn om zo specifiek een enkel gen te "raken"? Het beschikbaar komen van embryonale stamcellen en de verrassende waarneming dat na introductie van een DNA-fragment in een cel, de cel checkt of een soortgelijke sequentie ook voorkomt in zijn eigen DNA, bracht deze mogelijkheid binnen handbereik (figuur 2). Bevat de cel in een van zijn chromosomen een DNA-sequentie die overeenkomst vertoont met de sequentie van het ingebrachte DNA, dan kan het ingebrachte DNA in het chromosomale DNA worden opgenomen via een proces dat homologe recombinatie wordt genoemd. Verschilt een klein deel van het ingebrachte DNA van het aanwezige corresponderende deel van het chromosomale DNA, dan kan dat verschil naar het chromosoom worden overgebracht. Men spreekt hier van "gen targeting", doelgericht het gen veranderen. Het ingebrachte DNA wordt daarbij op een door de onderzoeker bepaalde plaats ingevoegd (zie hoofdstuk 1).



Figuur 2. Genetische modificatie van muizen via gen-targeting in embryonale stamcellen (ES-cellen). ES-cellen kunnen worden afgeleid uit de binnenste cellen van blastocysten, de zogenoemde Inner Cell Mass of ICM (embryo op dag 4 na bevruchting). Deze kunnen onbeperkt worden vermeerderd in celcultuur. Veel laboratoria maken gebruik van ES-cellijnen die meer dan 15 jaar geleden zijn geïsoleerd. Enkele tientallen miljoenen ES-cellen worden in een groeimedium geplaatst, waarin ook het targeting DNA-construct aanwezig is. Het bevat een promotor (Prom) en een stopsignaal voor transcriptie. Dit construct is vervaardigd door middel van "genetic engineering" met behulp van bacteriën. Door een aantal elektrische stroomstoten worden de ES-cellen korte tijd doorlaatbaar gemaakt voor de DNA-moleculen. Als gevolg daarvan neemt een deel van de ES-cellen het DNA op. De ES-cellen worden vervolgens geselecteerd door ze aan een antibioticum bloot te stellen. De cellen die het DNA-construct in hun chromosoom hebben opgenomen, zijn resistent geworden tegen dat antibioticum, omdat het DNA-construct een antibioticum-resistentie-gen bevat (geeft in dit voorbeeld resistentie tegen neomycine [Neo]). Deze cellen vormen dan een kolonie (groep cellen, celklonen, die vanuit één cel uitgroeit) in de petrischaal (paarse groepen van cellen). Vervolgens wordt met behulp van een DNA-analyse vastgesteld welke ES-celklonen het construct op de juiste plaats in het genoom hebben opgenomen. In die celklonen is het gen met de eiwitcoderende segmenten 1, 2 en 3 vervangen door het targeting construct. Daardoor is het eiwitcoderende segment 2 verwijderd. Dat resulteert in een niet-functioneel eiwit. Deze klonen worden verder gekweekt. Na controle of de cellen nog een normale chromosoomsamenstelling hebben, worden de ES-cellen geïnjecteerd in blastocysten afkomstig van een andere muizenstam (met andere vachtkleur). De ES-cellen vermengen zich met de cellen aanwezig in de blastocyst en dit leidt tot de geboorte van chimaere dieren die deels afkomstig zijn van de ES-cellen. Aangezien de ES-cellen ook kunnen bijdragen aan de geslachtscellen in de chimaere muis worden in de daarop volgende generatie ook muizen geboren met zaad dat zelf van de ES-cellen afkomstig is. De genetisch-gemodificeerde chromosomale "locus" gedraagt zich dan als een normaal genetisch element dat overgedragen wordt aan de nakomelingen. Tegenwoordig zijn er ook technieken waarbij al in de eerste generatie de nakomelingen volledig afkomstig zijn van de ES-cellen. Dit versnelt de hele procedure.

Dankzij het vermogen van cellen om overeenkomstige gensegmenten uit te wisselen, beschikken we over een zeer krachtige techniek om gericht kleine veranderingen aan te brengen in bestaande genen.

Tegelijkertijd met de ontwikkeling van deze “gen targeting” techniek werd het ook mogelijk embryonale stamcellen van de muis te isoleren. Dit zijn cellen die onbeperkt in cultuur kunnen worden vermeerderd en daarbij hun potentie behouden om weer een compleet dier te vormen. De combinatie van beide bevindingen heeft tot een revolutie in de muizengenetica geleid. Het werd nu mogelijk om heel specifiek mutaties aan te brengen in individuele genen en de vraag te stellen wat het effect van “verlies van functie” van dat gen was op processen als embryonale ontwikkeling, ziekteverloop, werking van het immuunsysteem e.a. Deze “targeting” technieken zijn in de loop van de laatste 10 jaar gecombineerd met een reeks andere genetische snufjes zoals het “conditioneel” maken van “knock-outs” en “knock-ins”, waarmee de uiteindelijke modificatie van het betreffende gen op een gekozen tijdstip en plaats (celtype) kan worden gerealiseerd.

Voor dit alles is het natuurlijk nodig goede controle te hebben over de expressie van de genen die worden geïntroduceerd. Dit kan bijvoorbeeld worden gerealiseerd door aan het gen zogenaamde regulatie-elementen toe te voegen, die reageren op hormonen of antibiotica die aan het drinkwater kunnen worden toegevoegd. Daarmee kan het betreffende gen dan in principe naar believen worden aan- of uitgeschakeld. Ook wordt veel gebruikgemaakt van DNA-recombinatie, waarbij een gen kan worden aan- of uitgeschakeld door een deel ervan met behulp van een recombinase enzym uit het chromosoom te verwijderen of om te draaien. Het gen dat voor het recombinase enzym codeert, kan vooraf in de muis worden gebracht als een apart transgen, of het kan in de te modifieren cellen worden ingebracht via een zogenaamde virus vector.

Deze methoden bieden de onderzoeker grote mogelijkheden om de expressie van transgenen te controleren. Ze verschaffen de onderzoeker een zeer krachtig middel om ziekteprocessen te begrijpen en zijn buitengewoon geschikt om interventiemethoden uit te testen. De inzichten die met deze benadering zijn verkregen, kunnen nauwelijks worden overschat. Het nu volgende geeft daar enkele voorbeelden van.

### **Wat leren we er van?**

Wat hebben we zoal geleerd uit experimenten met genetisch-gemodificeerde muizen? Ik geef een aantal voor-

beelden. Een van de belangrijke lessen van de analyse van met name de knock-out muizen is dat we beseffen de functie van genen nog maar zeer ten dele te begrijpen. Genfuncties die werden voorspeld uit waarnemingen in celcultures bleken aanzienlijk complexer of geheel anders dan verwacht na analyse in knock-out muizen. Een van de grootste verrassingen was wel dat het verlies van genen waarvan de functie als onontbeerlijk werd aangenomen, soms slechts een beperkt effect had op de ontwikkeling van een complex organisme zoals de muis. In een niet te verwaarlozen aantal knock-outs hebben onderzoekers zelfs de grootste moeite om afwijkingen in groei en ontwikkeling te ontdekken of afwijkingen in het functioneren van het organisme. In andere gevallen traden meer of minder ernstige ontwikkelingsdefecten op of ziektebeelden die belangrijk inzicht gaven in de betekenis van het betrokken gen voor het organisme. Zo werd het ook mogelijk om ziektebeelden van de mens te imiteren in de muis en vervolgens in detail te bestuderen. Enkele voorbeelden ter illustratie:

### **Functie van het immuunsysteem**

Genetisch-gemodificeerde muizen zijn cruciaal geweest voor de ontrafeling van de werking van het immuunsysteem. Dit systeem is daarom lastig te bestuderen omdat het organisme DNA-recombinatie (herschikking van DNA-elementen) gebruikt om de enorme diversiteit aan immuuncellen te genereren die nodig is voor de afweer tegen allerlei infecties. Met behulp van genetische modificatie kon de functie van een groot aantal genen die hierbij een rol spelen worden opgehelderd. We begrijpen dit systeem nu in aanmerkelijk meer detail. Hoewel we pas aan het begin staan van de toepassingen, is het zonneklaar dat zonder de beschikbaarheid van genetisch-gemodificeerde muizen we deze kennis onmogelijk hadden kunnen vergaren.

In een van de eerste opzienbarende experimenten met transgene muizen werden alle T-lymfocyten aan hun buitenkant voorzien van een receptor die één enkel specifiek eiwitfragment op andere cellen herkent. Het betrof hier een receptor die het zogenoemde Y-antigeen (een eiwit) herkent. Dit eiwit wordt gecodeerd door een gen op het (mannelijke) Y-chromosoom en komt dus van nature alleen tot expressie op cellen in mannelijke dieren. Door in de transgene lijn zowel bij de mannetjes als de vrouwtjes (alle dus met de genoemde receptor op hun T-lymfocyten) de reactie op het Y-antigeen te bestuderen, kon inzicht worden verkregen in de manier waarop zoogdieren hun

T-cel repertoire zodanig “opvoeden”, dat geen reactiviteit tegen “eigen cellen” ontstaat. Deze zogenoemde tolerantie ontstond inderdaad in de mannetjes: er bleken geen T-lymphocyten te zijn die op cellen met het Y-antigeen reageerden. Deze tolerantie was zowel het gevolg van het elimineren van de bewuste T-cellen, alsook van het minder actief maken van deze cellen. In vrouwtjes, waar het Y-antigeen niet voorkomt, vond deze selectie tegen dit type T-cellen niet plaats. Vrouwtjes bleven grote reactiviteit vertonen tegen ingebrachte cellen met het Y-antigeen. Dit verhelderde het inzicht in de wijze waarop T-cellen worden geselecteerd. Zoiets is van groot belang, omdat vrijwel alle ontsporingen in ons immuunsysteem (tolerantie tegen infecties, reactiviteit met eigen antigenen bij reuma, MS en vormen van diabetes) rechtstreeks met deze “opvoeding” van T-lymphocyten te maken hebben. Hierin schuilt ook de achtergrond van de oorzaak waarom ons immuunsysteem niet afrekent met kankercellen

In de loop der jaren is met behulp van genetische modificatie van muizen ook inzicht verkregen in de rol van de talloze eiwitten die dit proces van “opvoeding” en reactiviteit van immuuncellen tegen de cellen van het eigen organisme moduleren. Hierbij zijn eiwitten ontdekt die de activiteit van het immuunsysteem kunnen “dempen” of juist versterken. Dankzij deze kennis kan nu de activiteit van ons immuunsysteem gemoduleerd worden en zodoende kunnen aandoeningen gerelateerd aan dit immuunsysteem ook behandeld worden. Zo is inzicht verkregen in de manier waarop cellen “onzichtbaar” kunnen worden voor het immuunsysteem. Dit is van belang voor het verbeteren van orgaantransplantatie en het in de toekomst mogelijk maken van xenotransplantatie. Anderzijds kan door het toedienen van antilichamen tegen het eiwit CTLA4 (dat als normale functie heeft T-cel activiteit te remmen) het immuunsysteem zo krachtig worden geactiveerd dat het ook reactiviteit gaat vertonen tegen lichaamseigen cellen. Wanneer zorgvuldig gedomineerd, kan dit worden toegepast bij de behandeling van kanker. Een reeks klinische trials wordt momenteel wereldwijd uitgevoerd om dit verder uit te zoeken.

Muizen zijn ook onontbeerlijk bij de productie van antilichamen voor toepassing in de diagnostiek en therapie. Vrijwel alle klinisch toegepaste antilichamen worden bereid via immunisatie van muizen met het eiwit dat men wil detecteren of de activiteit ervan wil moduleren (meestal inactiveren). Door de via immunisatie gestimu-

leerde immuuncellen van de muis te isoleren en deze vervolgens te fuseren met een tumorcellijn afkomstig van witte bloedcellen (myeloma) kunnen permanente cellijnen worden verkregen die slechts één type antilichaam produceren. Na selectie van de cellijn die het meest geschikte antilichaam produceert, kan vervolgens dit antilichaam grootschalig in celcultuur worden geproduceerd. Deze geheel van de muis afkomstige antilichamen zijn uitstekend bruikbaar bij diagnostiek. Ze zijn niet geschikt voor therapeutische toepassing bij de mens, omdat ons immuunsysteem tegen deze “soortvreemde” eiwitten gaat reageren en daarmee hun effectiviteit ondermijnt. Dat heeft geleid tot de verdere modificatie van de muizengenen die voor deze antilichamen coderen. Door een deel van het muizengenen uit te wisselen met het overeenkomstige humane gen wordt bij wijze van spreken het geproduceerde eiwit “vermenselijkt”. Men spreekt dan van “gehumaniseerde” antilichamen. Dit is echter een omslachtige methode. Door nu muizen uit te rusten met de humane genen voor antilichamen kan rechtstreeks een groot assortiment aan humane antilichamen in de muis worden gemaakt. Aangezien het transgen deel uitmaakt van het functionele immuunsysteem van de muis, kan deze muis eenvoudig worden geïmmuniseerd met het eiwit waartegen men een humaan antilichaam wil produceren. Fuseren van de immuuncellen met myeloma cellen levert dan cellijnen op die zonder verdere genetische modificatie humane antilichamen produceren. Deze benadering wordt intussen op industriële schaal toegepast en zal naar verwachting de huidige generatie antilichamen die klinisch worden gebruikt (de chimere muismens moleculen), gaan vervangen. Een voorbeeld is het reeds genoemde antilichaam gericht tegen CTLA4, waarmee een krachtige immuunrespons tegen (kanker) cellen kan worden opgewekt.

### **Muismodellen voor kanker**

Genetisch-gemodificeerde muizen zijn ook van groot belang voor ons inzicht in het ontstaan van kanker. Kanker is een ziekte van onze genen met name van die, welke betrokken zijn bij celdeling, celdifferentiatie en celoverleving. Als deze genen mutaties ondergaan en daardoor overactief worden (oncogenen) of juist hun functie verliezen (tumor suppressor genen), gaan ze bijdragen aan een ongecontroleerde groei van cellen: het kenmerk van kanker.

Tegen de tijd dat kanker wordt ontdekt, zijn er meestal een groot aantal mutaties in een reeks genen opgetre-



# Transgene dieren en het patiëntenbelang

CEES SMIT

---

---

*Dr. C. Smit is voorzitter van de VSOP, de Vereniging van Samenwerkende Ouder- en Patiëntenorganisaties op het terrein van erfelijke en aangeboren aandoeningen.*

---

## Dubbele helix

Toen Watson en Crick in april 1953 hun bijdrage over de structuur van het DNA naar het tijdschrift *Nature* stuurden, was de gemiddelde leeftijd van een Europeaan bijna 30 jaar. Bij de 50<sup>e</sup> verjaardag van de ontdekking van de dubbele helix was die leeftijd gestegen naar 38 jaar en bij de 100<sup>e</sup> verjaardag zou de Europese burger gemiddeld 50 jaar oud kunnen zijn. Behalve verbeteringen op het terrein van het wonen, de sociale voorzieningen en de hygiëne, heeft ook de vooruitgang van de medische kennis en technologie een grote bijdrage geleverd aan de behandelingsmogelijkheden van ziekten. Met als gevolg een sterke stijging van de levensverwachting en dus ook van de gemiddelde leeftijd. In het bijzonder Europeanen met een ziekte – of het nu om een erfelijke of een chronische ziekte, een zeldzame of een veelvoorkomende

ziekte gaat – hebben het meest van deze vooruitgang geprofiteerd. Watson en Crick hebben in 1953 waarschijnlijk nimmer vermoed welke ingrijpende gevolgen de ontrafeling van de DNA-structuur zou krijgen voor mensen met een erfelijke component in hun ziektebeeld.

## Een wereld van verschil

Niet alleen voor mensen met een erfelijke ziekte voor wie in de afgelopen 50 jaar een behandeling beschikbaar is gekomen, maar ook voor kinderen met een hart- en vaatziekte of kanker, vormt deze vooruitgang een wereld van verschil. Vroeger overleden zij vaak op jonge leeftijd. Nu worden ze volwassen, vormen gezinnen en starten carrières.

Zo lag de levensverwachting van mensen met hemofilie (een erfelijke afwijking in de bloedstolling) omstreeks 1965 beneden de 30 jaar. In diezelfde tijd werd het echter mogelijk de bij hemofilie ontbrekende stollingsfactoren te isoleren uit menselijk bloedplasma en in geconcentreerde vorm toe te dienen. Inmiddels is een tweede generatie producten beschikbaar die langs biotechnologische weg vervaardigd worden, de zogenoemde recombinant-DNA-stollingsproducten. Nu, veertig jaar later is hun levensverwachting door deze behandeling vrijwel normaal geworden. Ook de 'kwaliteit van leven' is voor deze mensen aanzienlijk verbeterd. Vroeger brachten zij hun leven vooral 'horizontaal' door met lange perioden van bedrust (thuis of in het ziekenhuis). Nu bevindt hun leven zich veelal in een 'verticale' fase met een actieve participatie aan het beroepsproces, deelname aan sport en slechts voor een enkeling een korte opname in het ziekenhuis. Naast hemofilie zijn er vele andere ziektebeelden, zoals *cystic fibrosis* (taaislijmziekte), bepaalde spierziekten (zoals myasthenia gravis) en de ziekte van Gaucher (enzymziekte), waarvoor hetzelfde geldt. Mensen met deze ziekten zijn meestal ook zeer goed geïnformeerd over de laatste ontwikkelingen op het terrein van het wetenschappelijk onderzoek dat voor hen van belang is. Bovendien is er vrijwel altijd een actieve patiëntenvereniging die intensief contact onderhoudt met artsen, onderzoekers, het bedrijfsleven en zusterorganisaties in het buitenland.

## De onzichtbare vooruitgang

Veel van deze met behulp van DNA-technologie verkregen vooruitgang is vaak onzichtbaar voor patiënten, zeker wanneer iemand nog weinig ervaring als patiënt heeft opgedaan en (nog) geen lid is van een patiëntenvereniging. Iemand bij wie nu suikerziekte wordt vastgesteld en zich daarvoor moet laten behandelen met insuline, zal zich amper realiseren dat dit vroeger gebeurde met insuline afkomstig van varkens. Deze varkensinsuline is inmiddels volledig vervangen door humaan insuline die via recombinant-DNA-technieken (de biotechnologische weg) is vervaardigd. Meer dan zeventig ziektebeelden worden vandaag de dag succesvol behandeld met zulke recombinant-DNA-eiwitten, afkomstig uit kweekvaten waarin bacteriën op grote schaal deze medicijnen produceren.

Ook voor mensen bij wie nu de diagnose kanker wordt gesteld, geldt dat zij vaak niet op de hoogte zijn van het feit dat DNA-technologie een grote rol heeft gespeeld (en nog steeds speelt) in het onderzoek naar een betere diagnose en behandeling van de vele vormen van kanker.

Naast het gebruik van recombinant-DNA-medicijnen, zijn er nog andere vormen van DNA-technologie die nu of in de toekomst een bijdrage kunnen leveren aan de diagnostiek, preventie en behandeling van allerlei ziektebeelden. Daarbij is het vaak van groot belang om meerdere onderzoekslijnen naast elkaar te ontwikkelen, om eventuele tegenvallers in de ene lijn op te vangen met meevallers langs de andere onderzoekslijn.

Zo is er een voortdurend gebrek aan donororganen. Je kunt zo'n tekort proberen op te vangen door een maatschappelijke discussie te voeren over een verandering van het huidige 'geen bezwaar' systeem. Je kunt dit probleem daarnaast ook proberen op te lossen door verder te werken aan de ontwikkeling van dierlijke organen die door toepassing van DNA-technologie voor transplantatie bij mensen gebruikt kunnen worden (zogenaamde *xenotransplantatie*, zie ook hoofdstuk 2).

Iets soortgelijks geldt voor een goede aanpak van de verspreiding van HIV, het virus dat aids veroorzaakt. Praktische oplossingen, zoals veilig vrijen en veilig spuiten blijken niet of onvoldoende aan te slaan. Vandaar dat gezocht wordt naar een meer effectieve behandeling met medicijnen, terwijl tegelijkertijd

onderzoek gedaan wordt naar een goed werkend en goedkoop vaccin. Dit zou met name voor landen die zich die medicijnen niet kunnen veroorloven een uitkomst kunnen bieden.

## Transgene dieren

Bij transgene dieren is een voor deze dieren vreemd gen ingebouwd, dat onderzoekers in staat stelt ziekten bij de mens beter en met gebruik van veel minder proefdieren te bestuderen (zie hoofdstuk 1 en 2). Ook kunnen zulke dieren bepaalde medicijnen produceren die anders niet of onvoldoende kunnen worden verkregen. Voor bepaalde groepen patiënten is dat laatste aspect van groot belang.

Zo heeft het Schotse bedrijf *PPL* in het begin van de jaren negentig van de vorige eeuw een technologie ontwikkeld waardoor schapen in staat zijn in hun melk bepaalde medicijnen voor hemofilie en taaislijmziekte te produceren. In diezelfde periode heeft het Nederlandse bedrijf *Pharming* weten te bereiken, dat transgene konijnen in hun melk een medicijn produceren voor kinderen met de ziekte van Pompe, een tot dan onbehandelbare spierziekte.

Een meer recent voorbeeld is het Amerikaanse bedrijf *GTC Therapeutics*, dat een Europese markttoelating voor het middel *Atryn* heeft gevraagd (zie ook het kader bij hoofdstuk 3 'Genetisch-gemodificeerde dieren onmisbaar voor waardevolle producten'). *Atryn* is een merknaam voor het eiwit anti-thrombine, dat gebruikt kan worden voor de behandeling van bepaalde aangeboren stollingsstoornissen en mogelijk ook om sommige ontstekingen tegen te gaan. *Atryn* is afkomstig uit de melk van genetisch-gemodificeerde geiten. Als de Europese registratieautoriteiten voor *Atryn* een handelsvergunning afgeven, dan zou dit het eerste product zijn afkomstig van transgene dieren dat voor een reguliere medische behandeling kan worden ingezet. Of het zover komt, is de vraag: overheden zijn op dit moment erg beducht voor de mogelijke overdracht van virussen van dier naar de mens en dit kan deze vorm van gebruik van genetisch-gemodificeerde dieren de komende jaren ernstig in de weg staan. Dit laatste ondanks de dringende behoefte van patiëntenzijde aan dit soort medicijnen voor ziekten waarvoor tot nu geen of onvoldoende behandeling voorhanden is. En ook ondanks het grote tekort aan zulke medicij-



nen in bijvoorbeeld derdewereldlanden, die niet de beschikking hebben over de technologie en middelen die bij ons wel voorhanden zijn.

Transgene technologie heeft zonder twijfel de mogelijkheid in zich om op veel grotere schaal medicijnen te produceren dan nu mogelijk is en/of tegen een in principe veel lagere prijs. Het is daarom van belang met dit type onderzoek door te gaan, ondanks de vrees voor mogelijke virusoverdracht van dier op mens.

### De ziekte van Pompe



A: Vóór start enzymtherapie



B: Na 100 weken behandeling)

De transgene konijnen van het biotechnologiebedrijf *Pharming* hebben in Nederland voor een heftige maatschappelijke discussie gezorgd. De Nederlandse overheid staat door haar 'nee, tenzij' beleid de ontwikkeling van genetisch-gemodificeerde dieren in principe niet toe. Als er echter geen alternatieven ter beschikking staan, kan een vergunning verleend worden. Dit nu was het geval bij de ziekte van Pompe, een aangeboren spierziekte, waaraan kinderen met een ernstige vorm ervan vaak al op jonge leeftijd door ademhalingsproblemen komen te overlijden.

Onderzoekers van het *Sophia Kinderziekenhuis* in Rotterdam hebben in een publicatie (2004) laten zien, dat het zeer wel mogelijk is met behulp van de melk van transgene konijnen een medicijn (een biomedisch eiwit) te produceren, dat de achteruitgang bij kinderen met de ziekte van Pompe zelfs weet om te keren. Op bijgaande foto's is te zien dat een jongen die eerst volledig rolstoelafhankelijk was, na een behandeling van 2 jaar met dit medicijn en enkele gewrichtscorrigeren-

de operaties weer in staat was te lopen en, zij het bescheiden, met een bal te kunnen oefenen. Echter iets dat niet in dit artikel staat, maar wel getoond in een televisiedocumentaire van het programma 'Vinger aan de pols' is het verhaal van de broer van deze jongen. Deze broer heeft ook de ziekte van Pompe, maar was toen de studie begon in een lichamelijk betere conditie dan zijn rolstoelafhankelijke broer. Terwijl zijn broer er door het gebruik van dit recombinant-DNA-medicijn sterk op vooruit ging, verslechterde zijn conditie zodanig, dat hij volledig rolstoelafhankelijk werd. Vanwege het stringente onderzoeksprotocol kon hij geen beroep doen op deze medicijnen. Dit protocol beschreef de regels voor het onderzoek van deze experimentele therapie, waarin slechts een beperkt aantal patiënten mee kon doen en halverwege geen nieuwe patiënten konden worden toegelaten. Door het tijdig beschikbaar zijn van het desbetreffende medicijn had deze situatie wellicht bij hem voorkomen kunnen

den. De vraag is dan: welke genen zijn belangrijk en op welke wijze kunnen we van deze kennis gebruikmaken bij het ontwerpen van therapieën? Zijn bijvoorbeeld oncogenen belangrijk in zowel de beginfase als later wanneer de tumorcellen uitzaaien? Leidt een bepaalde combinatie van gemuteerde oncogenen en tumor suppressor genen tot bijzondere eigenschappen van de tumor? Kunnen andere genen die niet zijn gemuteerd ook invloed uitoefenen op deze eigenschappen en de reactie op therapie?

Voor de vraag of een bepaald gen belangrijk is voor het ontstaan van kanker bieden transgene muizen uitkomst. Door introductie van zo'n verdacht gen in de kiembaan van muizen kan worden vastgesteld of dit gen het ontstaan van kanker bevordert. Vele tientallen genen zijn op deze wijze op hun kankerverwekkende vermogen getest. Voor een aantal genen werd vastgesteld, dat ze inderdaad kanker kunnen veroorzaken. Enkele van deze genen, zoals het *Bmi1* gen, blijken van belang bij de instandhouding van kankerstamcellen. Dit zijn de cellen die deel uitmaken van tumoren en waarvoor men aanwijzingen heeft dat ze resistent zijn tegen therapie, omdat ze minder vaak delen en daardoor minder effectief door cytostatica worden gedood. Dit effect kan nog worden versterkt doordat stamcellen beter in staat zijn om geneesmiddelen de cel uit te pompen. Na het afdoden

worden. (Inmiddels wordt deze broer behandeld met een vergelijkbaar medicijn verkregen uit een kweek van transgene hamstercellen).

De maatschappelijke discussie rond de transgene konijnen van het bedrijf *Pharming* is sterk gekleurd door de politieke debatten die al eerder plaatsvonden rond de stier *Herman* van hetzelfde bedrijf. Het is goed zich te realiseren dat er families zijn die zeer veel belang hebben bij de verdere ontwikkeling van deze technologie. Families die aan den lijve hebben ondervonden wel of geen toegang te hebben tot deze medicijnen.

## Literatuur

Léon P.F. Winkel et al., *Annals of Neurology*, vol. 55, no. 4, april 2004. Copyright© 2005, dr. A.T. van der Ploeg. Reprinted with permission of John Wiley & Sons, Inc.

van de gevoelige kankercellen kunnen deze resistente stamcellen de kanker opnieuw laten terugkomen. Het is van groot belang meer te weten te komen van de eigenschappen van kankerstamcellen, teneinde ook tegen deze beter overlevende cellen therapieën te kunnen ontwikkelen.

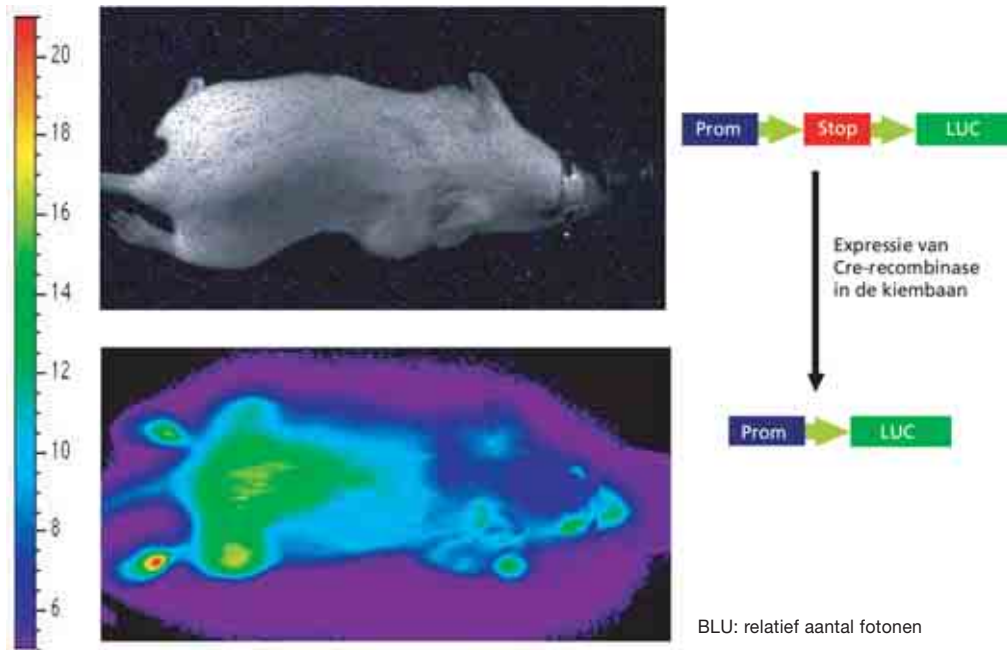
Met behulp van genetische modificatie kunnen in muizen de combinaties van genetische defecten die we in tumoren bij de mens aantreffen, worden nagebootst. Daarmee kan een aantal van de bovengestelde vragen worden beantwoord. Bovendien kunnen in deze modellen de effecten van de genetische achtergrond worden bestudeerd, bijvoorbeeld hoe "gewone" genen die niet gemuteerd zijn het tumorproces beïnvloeden. Zo iets is in de menselijke populatie uiterst lastig uit te zoeken, vanwege de grote genetische variatie die bij ons wordt aangetroffen. Ook kan met behulp van deze muismodellen worden gezocht naar genen of factoren die een effect hebben op de gevoeligheid voor kanker als gevolg van blootstelling aan kankerverwekkende stoffen of straling (lifestyle- en omgevingsfactoren). Bovendien bieden de muismodelsystemen de mogelijkheid om interventies te testen. Daarmee wordt de ontwikkeling van nieuwe therapieën bevorderd. Geavanceerde "imaging technieken" maken het mogelijk om tumorgroei op niet-invasieve wijze te

volgen en zo de effecten van interventiemethoden te testen (zie figuur 3A en 3B).

Door in muizen met een tumor genen op gewenste momenten aan of uit te schakelen, kan het genezende effect van een medicijn dat specifiek op die genen inwerkt, worden ingeschat. Juist omdat we ons realiseren dat de succesvolle behandeling van kanker toediening van meerdere medicijnen zal vereisen, zullen muismodellen van grote waarde zijn om zicht te krijgen op wat de meest kansrijke combinaties zijn. Deze kunnen vervolgens bij patiënten in klinische trials getest worden. Ook voor ons inzicht in het ontstaan van resistentie tegen chemotherapie zijn studies in genetisch-gemodificeerde muizen zeer waardevol. Door specifiek de “pompen” die giftige stoffen uit cellen kunnen verwijderen door middel

van genetische modificatie onklaar te maken, kon worden vastgesteld hoe deze pompen de opname en uitscheiding van toegepaste geneesmiddelen beïnvloeden. Daarna is gekeken of het remmen van de pompen met behulp van geneesmiddelen eenzelfde effect had als wat was waargenomen in muizen waarin de genen coderend voor deze pompen waren “uitgeknoekt”. Dit bleek het geval en heeft ertoe geleid dat bijvoorbeeld sommige antikankermiddelen die eerst intraveneus in het ziekenhuis werden toegediend (hetgeen vaak extra bijwerkingen veroorzaakte ten gevolge van de gebruikte oplosmiddelen) in het vervolg als pil thuis kunnen worden ingenomen.

Genetisch-gemodificeerde muizen kunnen ook aanwijzingen geven over te verwachten bijwerkingen van medicijn-



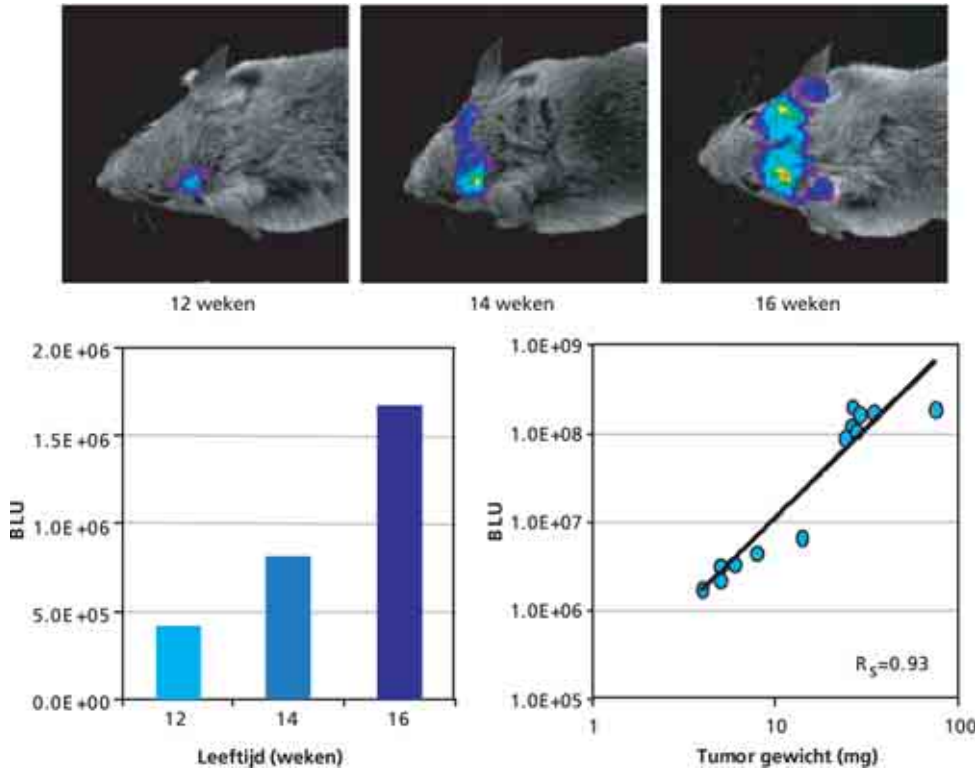
Figuur 3A: De lichtgevende muis. Via micro-injectie is deze muis transgeen gemaakt voor een luciferase (**LUC**) construct, dat inactief is tenzij de cel wordt blootgesteld aan het Cre-recombinase dat aangrijpt op de met groene pijlen aangegeven recombinatiesignalen. Hierdoor wordt een transcriptie-stoppelement (**Stop**) verwijderd, waardoor het Luciferase gen tot expressie komt (Prom = promotor). Wanneer het Cre-recombinase vroeg in embryogenese tot expressie kan komen, (in dit voorbeeld is de Luciferase muis gekruist met een Cre-transgene muis die Cre vroeg in de embryogenese tot expressie brengt waardoor het in alle cellen van het organisme wordt gevormd) zullen alle lichaamscellen het Luciferase tot expressie brengen. Wanneer een dergelijke muis wordt ingespoten met luciferine en kort wordt verdoofd, kan met een gevoelige camera het licht worden gemeten dat de muis uitstraalt. De bovenste muis laat de lichtemissie zien wanneer het stoppelement aanwezig is, de onderste wanneer het stoppelement is verwijderd.

nen. Vooral de soms langetermijnneveneffecten van nieuwe, meer specifiek werkende medicijnen kunnen zo worden opgespoord. Een goed voorbeeld vormen de muizen waarin het gen dat voor een groeifactorreceptor codeert, is uitgeschakeld (groeifactor receptoren spelen vaak een rol bij kanker). Sommige van deze “knock-outs” bleken nu embryonaal lethaal als gevolg van afwijkingen van het hart. Remmers van deze groeifactorreceptoren, die wel als medicijnen tegen kanker worden toegepast, bleken bij de mens eveneens een effect te hebben op de hartfunctie. Dit soort parallellen laat zien hoe genetisch-gemodi-

ficeerde muizen kunnen aangeven, welke bijwerkingen mogelijk kunnen optreden, zodat daaraan extra aandacht kan worden besteed. Dit is met name van belang wanneer medicijnen langdurig moeten worden toegepast. Uiteraard zijn de bovengenoemde toepassingen niet beperkt tot kanker. Ook voor vele andere aandoeningen bieden modelsystemen van muizen vergelijkbare mogelijkheden.

*Creutzfeldt Jacob*

De “gekkekoeienziekte” is een verontrustend voorbeeld



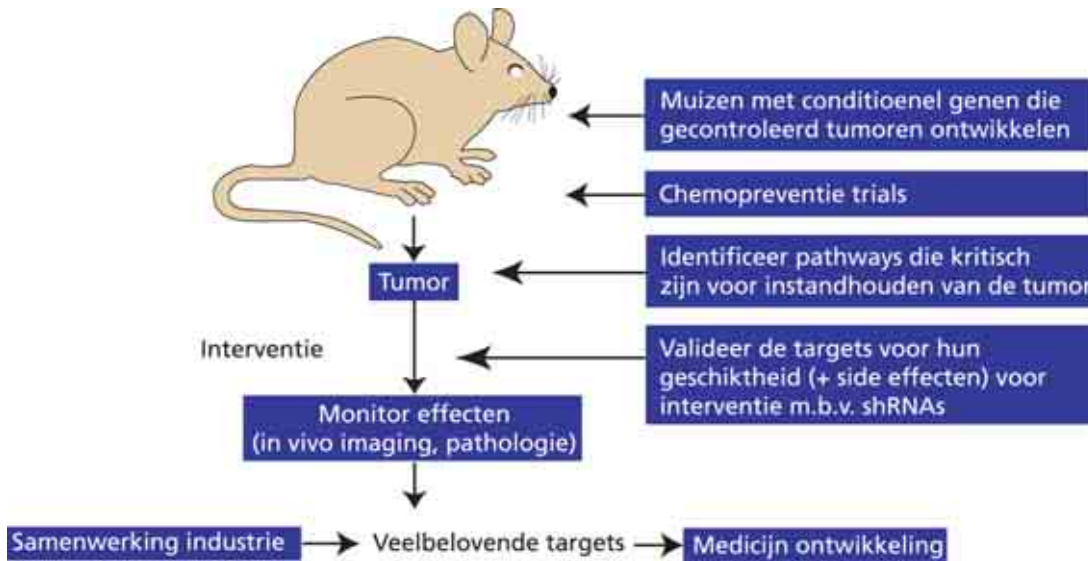
Figuur 3B: Wanneer het Cre-recombinase tot expressie wordt gebracht in de hypofyse, dan is alleen een signaal in de kop van het dier te zien. In het getoonde dier is het luciferase gen gecombineerd met een conditioneel tumorsuppressorgen, dat werd geïnactiveerd tegelijk met het aanschakelen van het Luciferase. Verlies van het tumorsuppressorgen leidt bij al deze muizen tot het ontstaan van een hypofyse tumor. Aangezien in de tumorcellen ook het Luciferase gen is aangeschakeld, kan de tumorgroei op een niet-invasieve wijze in de tijd worden gevolgd in één en dezelfde muis. De lichthoeveelheid die door de tumor wordt geproduceerd (BLU), is een maat voor de grootte van de tumor. Op deze wijze kunnen de effecten van medicijnen op tumorgroei op eenvoudige wijze worden gemeten. Aangezien de methode heel gevoelig is, kunnen tumoren en uitzaaiingen van minder dan een millimeter worden gedetecteerd. Luciferase detectie kan dus goed worden gebruikt als een “surrogaat” marker. Het gebruik van niet-invasieve meetmethoden reduceert niet alleen het proefdiergebruik, de methode is ook nauwkeuriger, omdat longitudinale metingen kunnen worden verricht (d.w.z. metingen tijdens het leven van het dier).

van hoe bepaalde praktijken in de huidige intensieve veehouderij tot ernstige problemen bij de mens kunnen leiden (zie ook het cahier Prionen). Wellicht realiseren weinigen zich welke kritische rol genetisch-gemodificeerde muizen hebben gespeeld bij het vergaren van inzicht met betrekking tot overdracht van deze ziekte van de ene soort naar de andere. De gekkekoeienziekte wordt veroorzaakt door een vormverandering van een eiwit (PrP<sup>C</sup>) dat normaal in zoogdieren voorkomt. Deze verandering wordt gekatalyseerd door een ziekmakend PrP<sup>Sc</sup> eiwit (prion genaamd en zelf een variant van het PrP<sup>C</sup>). De ziekmakende PrP<sup>Sc</sup> variant ontstaat uit het normale PrP<sup>C</sup> eiwit, doordat het variant eiwit als het ware zijn PrP<sup>Sc</sup> structuur “opdringt” aan het normale eiwit. Het ziekmakende PrP<sup>Sc</sup> eiwit ontstaat dus steeds opnieuw uit het normale PrP<sup>C</sup> eiwit door een vormverandering. Door het PrP<sup>C</sup> gen in muizen te inactiveren, bleken deze resistent te zijn geworden tegen de ziekte. Dit leverde het bewijs dat een PrP<sup>C</sup> eiwit in de gastheer noodzakelijk is voor het ontstaan van de ziekte. Door muizen transgeen te maken voor de PrP<sup>C</sup>'s van verschillende diersoorten was het mogelijk vast te stellen hoe effectief de prions (PrP<sup>Sc</sup> 's) van deze soorten (die al beschikbaar zijn of in lage frequentie ontstaan na blootstelling aan het PrP<sup>Sc</sup> van run-

deren) in staat zijn de ziektemakerende vormverandering in andere PrP<sup>C</sup> 's te bewerkstelligen. Daarmee kon een duidelijke rangorde (kans dat een prion van species A het PrP<sup>C</sup> van species B kan omvormen) worden vastgesteld. Dit is van groot belang om in te kunnen schatten welke prions potentieel gevaarlijk zijn voor de mens. Daarnaast zijn de PrP<sup>C</sup> knock-outs en transgene muizen uitermate geschikt om interventiemethoden te testen.

### Toekomstige ontwikkelingen

Genetisch-gemodificeerde dieren zijn niet meer weg te denken bij het biomedische onderzoek. De informatie die hiermee wordt verkregen, levert belangrijke nieuwe inzichten op en naar verwachting zal dit onderzoek ook steeds geavanceerder en preciezer worden. Door de introductie van nieuwe niet-invasieve imaging technieken kunnen longitudinale studies aan (of op) één en dezelfde muis worden uitgevoerd, studies die vroeger onmogelijk waren of grote aantallen muizen vergden. Nieuwe technieken waarbij induceerbare small interfering RNA's (siRNA's) worden gebruikt, zullen het mogelijk maken om sneller genproducten te valideren als doelwitten voor interventie bij een groot aantal ziekten (figuur 4). Bovendien zal de genetica ons in staat stellen genen te



Figuur 4. Gebruik van genetisch-gemodificeerde muizen bij de ontwikkeling van nieuwe medicijnen voor kanker. In het schema zijn de verschillende stappen bij het onderzoek weergegeven.

# Transgenese bij vee en vis

PIET WIEPKEMA

*Prof.dr. P.R.Wiepkema is emeritus hoogleraar ethologie aan de Wageningen Universiteit. Hij is oud-lid van de Commissie Biotechnologie bij Dieren.*

Zo'n 20 jaar geleden waren de verwachtingen hooggespannen. Transgenese technieken toegepast in de vee- en visteelt zouden de klassieke, trage selectiemethodes niet alleen met sprongen versnellen, maar ook de productie van langs deze weg onbereikbare, maar wel interessante stoffen mogelijk maken. Kunstmatig ingebrachte genen blijken inderdaad in vissen groeiprocessen opvallend te kunnen versterken, schapen aan te kunnen zetten in hun melk biomedische eiwitten te produceren en zelfs varkens ertoe over te halen in hun vlees plantaardige vetten aan te maken. Zijn de verwachtingen na twintig jaar nog steeds zo hooggespannen? Voor zover het de typische productie (vlees aanzet, wolvorming e.a.) in de vee- en visteelt betreft, wordt er steeds meer getwijfeld. Naast enig "transgenetisch" succes stapelen de tegenslagen zich op. Wat is er aan de hand? Het volgende biedt een beknopt overzicht van het wel en wee van transgenese in vee- en visteelt.

## **Gezondheids- en Welzijnswet (1992)**

In ons land markeerde het jaar 1992 een eerste afsluiting van de soms heftige debatten over nut en noodzaak van transgenese bij dieren. De toen alom bekende stier Herman was niet alleen een veelbesproken figuur

in onze dagbladen, maar ook onderwerp van uitgebreide discussies in de Tweede Kamer. In dit jaar werd de Gezondheids- en Welzijnswet voor dieren vastgesteld. Daarmee was het voortaan "verboden zonder vergunning genetisch materiaal van dieren te wijzigen op een wijze die voorbijgaat aan de natuurlijke barrières van geslachtelijke voortplanting en van recombinatie". Met andere woorden, vanaf 24 september 1992 was transgenese bij dieren vergunningplichtig. Voor de daarbij te volgen procedures zie hoofdstuk 3.

Voor ons doen nu is van belang te weten wat het bedrijf Gene Pharming (maker van de stier Herman) met deze stier voor ogen stond. In het genoom van Herman was een gen voor de productie van humaan lactoferrine aangebracht. De hoop was dat dit biomedisch eiwit (antiseptische eigenschappen) in de melk van vrouwelijke nakomelingen zou worden aangetroffen. En dit wel in zulke hoeveelheden dat ten eerste de kans op mastitis (een gevreesde uierontsteking bij koeien) danig zou verminderen, ten tweede deze lactoferrine gemakkelijk uit de melk gewonnen en in de humane praktijk gebruikt zou kunnen worden en ten derde ervaring opgedaan zou worden met een techniek die de productie van andere en misschien meer interessante biomedische eiwitten in de melk van koeien mogelijk zou maken. De methode zou relatief goedkoop en direct zijn en, last but not least, de koe zelf in geen enkel opzicht schaden.

De slotsom van alle debatten was vervolgens, dat transgenese bij dieren pas te rechtvaardigen viel als een duidelijk medische betekenis kon worden getoond of als een belangrijk wetenschappelijk nieuw inzicht zou kunnen worden verkregen. Dit tweede motief stuitte op beduidend meer weerstand dan het eerste. In alle volgende beoordelingen telde bovendien buitengewoon zwaar de vraag of geen bruikbare alternatieve wegen konden worden ingeslagen om hetzelfde doel te bereiken. In ieder geval werd een motief als "verbetering van de dierlijke productie" als te licht beschouwd om transgenese bij dieren te rechtvaardigen. De zojuist genoemde mastitisbestrijding werd als zo'n productiemotief gezien en dus te licht bevonden. Mastitis moet voorkómen worden met behulp van verbeterde hygiëne en huisvesting, maar niet met trans-



genetische ingrepen. Ook de productie van biomedische eiwitten in de melk van bijvoorbeeld koeien stuit in ons land op veel weerstand, waarbij gewezen wordt op alternatieve methodieken. Zo is het mogelijk gebleken in ieder geval sommige van deze biomedische eiwitten in een kweek van gemodificeerde cellen te produceren. Dat moet dan de voorkeur hebben.

In ons land gebeurt dan ook geen transgenese bij dieren ten behoeve van dierlijke productieverbetering. Elders in de wereld zijn de regels hieromtrent wel wat losser. Enkele voorbeelden hiervan worden hierna genoemd. In Nieuw-Zeeland is men er in geslaagd extra kopieën van het gen, dat de aanmaak van caseïne in de melk regelt, toe te voegen aan het genoom van koeien. Omdat deze kopieën ontleend zijn aan soortgenoten spreekt men hier van cisgenese in plaats van transgenese. Deze extra genen maken dat de betrokken koeien meer caseïne per liter melk produceren en zodoende ook meer kaas opleveren. De Nieuw-Zeelandse regering staat dit toe. Het slagingspercentage is echter laag (enkele procenten).

In Japan zijn varkens voorzien van een spinaziegen, dat de productie van plantenvetten regelt. Het doel is in het vet van varkens zulke plantaardige vetten te doen verschijnen, hetgeen de gezondheid van de consument dient. Biggen met dit gen gedragen zich normaal en zijn gezond. Echter, niet veel meer dan 1% van de embryo's overleeft de techniek van microinjectie en terugplaatsing in het moederdier.

### **“Knock-out” methode**

Een bijzondere manier van genetisch ingrijpen biedt de zogenaamde “knock-out” methode (zie hoofdstuk 1). Een voorbeeld hiervan speelt zich af in Nieuw-Zeeland en betreft de uitschakeling van een myostatine-gen in schapen. De stof myostatine remt de groei van spieren; uitschakeling bevordert spiergroei. Ondanks bezwaren tegen dit wel erg duidelijke productiedoel is voor dit onderzoek toch toestemming verleend. Een honderdtal schapen met deze ingreep loopt rond. Een genetisch tekort aan dit myostatine vormt de achtergrond van de hier te lande ook bekende dikbilrunderen.

Een laatste voorbeeld betreft de Atlantische zalm. Het ingebrachte genconstruct, afkomstig van de Alaska zalm of de Amerikaanse puitaal, versterkt en verlengt de groei van de behandelde zalmen. Zo wordt er nu

ook bij lagere temperaturen goed gegroeid. Plaats van handeling zijn de Verenigde Staten en Canada. Het effect dat verkregen wordt, lijkt sterk op dat wat je kunt bereiken na jaren van strenge en klassieke selectie (verhoogde voeropname en verbeterde voerconversie). Transgene vissen tonen soms misvormingen en zijn vaak verminderd vruchtbaar en/of levensvatbaar. Er zijn een aantal redenen waarom transgenetische technieken in de vee- en visteelt van West-Europa en zeker in ons land (nog) niet veel ingang hebben gevonden. Allereerst is er natuurlijk de toepassing van de huidige wetgeving. Zoals gezegd in ons land wordt transgenese ten behoeve van een verbeterde dierlijke productie niet een voldoende rechtvaardiging van deze techniek gevonden. In de tweede plaats bestaat er bij de consument ook een niet weg te cijferen weerstand tegen het gebruik van genetisch gemanipuleerde producten. Van deze consument moet de dierlijke productie het wel hebben. Een derde remmende factor is dat het ontwikkelen van goede transgenetische dieren en het exploiteren van kuddes/scholen daarvan zeer veel investeringen vergt. Een grote hindernis blijkt telkens weer het lage succespercentage bij de vorming van de gewenste transgene dieren. Bovendien treden bij zulke veranderde dieren nogal eens problemen op (verminderd vruchtbaar, misvormingen, geboorteproblemen e.a.).

Vanwege al deze hobbels houden de fokkerij en visteelt het in ons land liever bij de oude vertrouwde methode van kruisingen en selectie. Deze weg heeft tot nu een gestage vooruitgang (groei, productie per dier e.d.) opgeleverd van 1 tot 3 % per jaar. Bij deze selectie wordt meer dan voorheen ook gelet op kenmerken als gezondheid, robuustheid en dergelijke, waardoor een eenzijdige verandering wordt tegengegaan. Zo wordt geprobeerd fouten uit de klassieke selectie (dikbilrunderen met geboorteproblemen, vleeskippen met een falend hart e.a.) te voorkómen en zo mogelijk terug te draaien.

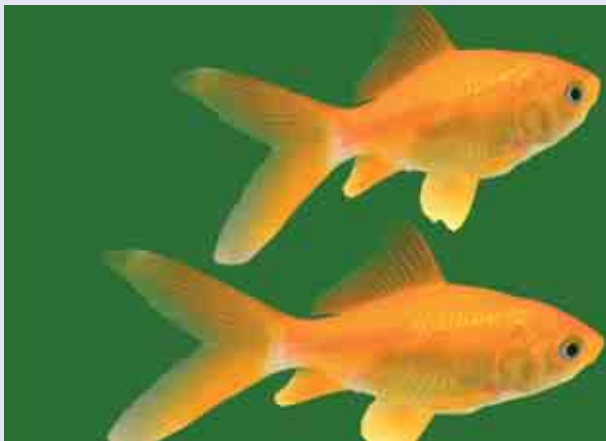
Transgenese heeft in de dierlijke productie tot nu toe niet veel voet aan wal gekregen. Een uitzondering vormt een randgebied, waar bijvoorbeeld konijnen, schapen, geiten of runderen zodanig zijn veranderd, dat nuttige en zeer gewenste biomedische eiwitten in hun melk gevormd en gewonnen kunnen worden. De

kennis die bij al deze genomonderzoeken is verkregen, heeft ondertussen wel een andere belangrijke ontwikkeling in de fokkerij en teelt gestimuleerd; de zogenaemde “marker assisted selection”. Deze methode is gebaseerd op het gegeven dat in het genoom gebieden zijn gelokaliseerd en terug te vinden (met behulp van kenmerkende DNA-segmenten), die nauw betrokken zijn bij belangrijke productie-eigenschappen (groei, melkgift e.a.) van ons vee. Men is daardoor in staat de aanwezigheid van een gewenste genetische productie-eigenschap vroegtijdig in het genoom van een organisme vast te stellen. Er hoeft niet meer gewacht te worden tot deze eigenschap zich fenotypisch in het volwassen dier uit. Voor deze vaststelling zijn niet meer dan wat bloedcellen van het te onderzoeken dier nodig. Fenotypische selectie maakt plaats voor genotypische selectie. Deze mogelijkheid verzekert en versnelt een goede selectie van de gewenste dieren. In ons land is deze werkwijze populair.

Tenslotte nog twee opmerkingen over de (on)natuurlijkheid van al dit transgenetische gedoe. Zoals elders toegelicht, worden genconstructen op een aantal verschillende manieren in de ontvangende kern gebracht. Een methode die steeds meer in zwang raakt, is die met behulp van retrovirussen, welke gemakkelijk een cel binnendringen en een genconstruct in het genoom van de gastheer weten te plaatsen. Virussen zijn uit-

stekende vectoren in dit spel van genoverdracht. Minder bekend is dat een dergelijke overdracht in de vrije natuur niet ongewoon is. Virussen zijn er verantwoordelijk voor dat genetisch materiaal van de ene soort zich in dat van de andere kan nestelen. Zo wordt geschat dat het genoom van de muis wel 25.000 genen bevat die via retrovirussen van elders afkomstig zijn. Deze erfelijkheid van “verkregen” eigenschappen wordt ook wel aangeduid als horizontale erfelijkheid in tegenstelling tot de verticale erfelijkheid, waarmee de klassieke vorm wordt bedoeld. Wordt transgenese hiermee minder tegennatuurlijk?

De tweede opmerking betreft de natuurlijkheid van het gehele domesticatieproces. In de loop van vele eeuwen zijn wilde soorten als de wolf, het wilde zwijn, het schaap, het rund, de kip, de duif, de karper et cetera zodanig door de mens geselecteerd (gedomesticeerd), dat de huidige rassen vaak niet meer herkenbaar met de wilde voorouders te verbinden zijn. Ook hier is sprake van een genetische modificatie welke de betrokken dieren ingrijpend heeft veranderd. Soms zo ingrijpend dat de resulterende eindvorm feitelijk invalide is geworden. Als voorbeelden hiervan kunnen nog eens genoemd worden het dikbilrund en de huidige vleeskip. In het dikbilrund is het vrijwel onmogelijk kalfjes geboren te zien worden zonder een keizersnede. Het kuikentje van de extreem geselecteerde vlees-



Gewone goudvis.



Doorgekweekte siergoudvis.



kip groeit in de loop van 6 weken uit tot een kip van ruim 2 kg. De spiergroei is hier zo snel dat het hart dit niet bijhoudt en de kip zelf aan het einde van de mestperiode ernstig zuurstofgebrek gaat tonen en snel richting slachthuis moet. De vraag is of we, als we het over de toelaatbaarheid van transgenese hebben, ook niet de praktijk van domesticatie op tafel moeten leggen. Weliswaar wordt bij domesticatie niet zomaar voorbijgegaan aan de regels van de natuurlijke voortplanting, maar toch.... Kunstmatige inseminatie en

embryotransplantatie zijn niet meer weg te denken uit de huidige dierhouderij. Wat betekent in deze samenhang de integriteit van een dier?

## Literatuur

J.Clark and B.Whitelaw, A future for transgenic livestock. Nature reviews Genetics,4,825-833,2003. Expertisecentrum LNV, Een schaap met vijf poten? Oktober 2003.

identificeren die een modulerende werking hebben op ziekteprocessen.

Hoewel er grote druk is (zowel om ethische redenen als ook vanwege tijd- en kostenoverwegingen) om experimenten met proefdieren waar mogelijk met celculturen uit te voeren, zal onderzoek met genetisch-gemodificeerde dieren naar verwachting niet afnemen, integendeel. Wel zal veel meer informatie per muis worden verkregen. Bovendien wordt intensief gezocht naar biomarkers, die al vroeg in het ziekteproces inzicht geven over het verdere ziekteverloop. Daardoor kan het ongerief voor de dieren worden beperkt en kunnen experimenten sneller worden uitgevoerd.

Tegenover een toename in het gebruik van genetisch-gemodificeerde dieren staat overigens een vermindering van het gebruik van niet-transgene dieren. Het is hierbij zinvol om de omvang van het “transgene” proefdiegerbruik in perspectief te plaatsen. Zo worden voor het kankeronderzoek in Nederland – waarvoor verreweg de meeste genetisch-gemodificeerde muizen worden gebruikt – per kankerpatiënt maar twee muizen ingezet. Dit komt neer op ongeveer 150.000 muizen per jaar.

Hoe in de komende 10 jaar het gebruik van andere genetisch-gemodificeerde diersoorten zich zal ontwikkelen, is moeilijk te voorspellen. Voor het bestuderen van een aantal aandoeningen (hart- en vaatziekten, gedrag) zijn ratten meer geschikt dan muizen. Maar genetische modificatie van ratten is omslachtiger. Daarom wordt veel energie gestoken in het ontwikkelen van muismodellen die het rattenmodel kunnen vervangen. Overigens zijn er wel technieken ontwikkeld om ratten te genereren die goed gedefinieerde gendefecten hebben. Dit wordt bereikt via blootstelling van mannelijke ratten aan muta-

gene stoffen, waardoor mutaties in de geslachtscellen ontstaan. De nakomelingen kunnen dan worden gekarakteriseerd op het vóórkomen van specifieke gendefecten, die vervolgens via standaardkruisingen kunnen worden geïsoleerd. Zo kunnen rattenlijnen ontstaan die “knock-out” zijn voor een bepaald gen, maar niet op een “transgenetische” manier zijn gemodificeerd. Met name voor sommige aandoeningen waarvoor de rat als model duidelijk meer geschikt is dan de muis, biedt dit perspectieven. Daarbij moet men zich natuurlijk altijd blijven realiseren dat knaagdieren geen mensen zijn en dat grote voorzichtigheid is geboden bij de vertaling van de resultaten naar de mens toe.

Grotere zoogdieren als konijn, geit, varken en koe kunnen een rol vervullen bij de productie van biomedische eiwitten, zeker wanneer deze eiwitten op specifieke wijze moeten worden “geglycosyleerd”, dat wil zeggen voorzien moeten zijn van bepaalde suikergroepen om toegepast te kunnen worden. De vraag is wel of genetisch-gemodificeerde dieren hier uiteindelijk voordelen bieden boven andere productiesystemen, gebaseerd op cellijnen of planten. Zoals het er nu naar uitziet bieden genetisch-gemodificeerde varkens wel de beste perspectieven voor xenotransplantatie doeleinden, al moeten hier nog een aantal belangrijke hindernissen worden genomen. Zo is een betere bescherming tegen afstoting van het varkensweefsel nodig. Dit geldt eveneens ten aanzien van de mogelijke overdracht van infectieuze agentia, zoals endogene virussen van het varken, naar de gastheer (zie ook het cahier Xenotransplantatie).

## Tot slot

Genetisch-gemodificeerde dieren, met name muizen, zijn van onschatbare waarde voor het verkrijgen van inzicht in hoe complexe organismen werken. Deze kennis is op

zichzelf al van veel gewicht, maar ook onontbeerlijk om nieuwe en betere geneesmiddelen voor talloze aandoeningen te kunnen ontwikkelen en te testen. Daarnaast zal dit onderzoek ook duidelijk kunnen maken hoe en welke ziekten kunnen worden voorkómen. Tegen deze achtergrond is het betreuenswaardig dat het werken met genetisch-gemodificeerde dieren aan zoveel bureaucratische regels is onderworpen, dat het onderzoek daardoor ernstig wordt geremd. Overigens zonder dat daarmee het welzijn van de dieren wordt gediend. Een herbezinning op de betreffende regelgeving die naar mijn mening haar doel volledig voorbijschiet, acht ik dan ook dringend gewenst.

Het welzijn van proefdieren, waaronder ook de genetisch-gemodificeerde, kan met aanzienlijk minder regels worden gegarandeerd. Het vele geld dat met eenvoudiger regelgeving wordt uitgespaard, kan dan aan nuttiger zaken worden besteed. Dit is een doelstelling die aansluit bij de plannen van de overheid om zowel het aantal regels te verminderen als ook om de veelbelovende sector van biomedisch onderzoek te stimuleren.

## Literatuur

Prionen, 20<sup>e</sup> jaargang, Cahiers Bio-Wetenschappen en Maatschappij nr. 2, april 1999.

Xenotransplantatie, 20<sup>e</sup> jaargang, Cahiers Bio-Wetenschappen en Maatschappij nr. 4, september 2001.

Jonkers, J. and A. Berns (2002). "Conditional mouse models of sporadic cancer." *Nature Rev Cancer* 2(4): 251-65.

Pharmacological insights from P-glycoprotein knockout mice. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 1998 Jan;36(1):9-13.

Neuroinvasion of prions: insights from mouse models. *Exp. physiol.* 85, 705-12 (2000)

CTLA-4 new insights into its biological function and use in tumor immunotherapy. *Nature Immunol.* 3, 611-18 (2002).

Kellermann, S.A., Green L.L., Antibody discovery: The use of transgenic mice to generate human monoclonal antibodies for therapeutics. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 593-7 (2002).

## Welzijn van genetisch-gemodificeerde dieren

**BERRY SPRUIJT EN HEIN VAN LITH**

*Prof. dr. B.M. Spruijt is hoogleraar Ethologie en Welzijn, Departement Dier, Wetenschap en Maatschappij bij de Faculteit Diergeneeskunde van de Universiteit Utrecht.*

*Dr. H.A. van Lith is universitair hoofdmedewerker (geneticus), afdeling Proefdierkunde, Departement Dier, Wetenschap en Maatschappij bij de Faculteit Diergeneeskunde van de Universiteit Utrecht.*

### Inleiding

Genetische modificatie (GM) van dieren kan op onvoorspelbare wijze tot welzijnsproblemen leiden. Daarbij moet je denken aan vaak (nog) onbekende pleiotrope (meer dan één kenmerk beïnvloedende) effecten van de toegevoegde of veranderde genen op het gedrag, waarmee een dier zich aanpast aan zijn omgeving. Als deze aanpassing niet meer lukt dan is

het welzijn van een dier in het geding. Hoewel de technieken om deze GM dieren te maken zich snel ontwikkelen en de modificatie nauwkeuriger dan voorheen in het beoogde doelgebied van het genoom kan worden aangebracht, en ook al kan de expressie van dit ingevoerde DNA selectief worden geactiveerd (dat wil zeggen op een vooraf gekozen tijdstip, slechts onder specifieke omstandigheden of alleen in een bepaald orgaan) (zie hoofdstuk 1), zelfs dan is het resultaat niet geheel voorspelbaar. Natuurlijk, er zijn veel GM diersmodellen opgezet voor specifieke humaan genetische ziekten, die inderdaad model staan voor humane aandoeningen. Maar daarbij kunnen ook onverwachte en zelfs niet direct zichtbare bijwerkingen optreden.

De wijze waarop deze categorie van dieren gemaakt kan worden, maakt het probleem ten aanzien van welzijn als gevolg van de genetische modificatie principieel niet anders dan bij de gebruikelijke experimenten met niet-gemodificeerde dieren. De aantallen dieren die nodig zijn voor het maken van het eerste genetisch veranderde proefdier zijn echter niet gering. Vervolgens zijn weer veel dieren nodig om de modifi-

catie in stand te houden dan wel om een genetisch veranderd dier terug te kruisen met een soortgenoot die een andere genetische achtergrond bezit. Voor de beoordeling van de gehele proef moeten we ons daarom wel realiseren, dat het om veel meer dieren gaat dan alleen de GM dieren waar tenslotte mee gewerkt wordt.

## Welzijn

Welzijn als term is aan het gewone spraakgebruik ontleend en gaat in dit geval over gevoelens van dieren, gewervelde dieren wel te verstaan. Over de gevoelens van ongewervelden als vliegen, spinnen, wormen en dergelijke valt op dit moment geen verstandig woord te zeggen. Als een dier zijn eigen, subjectieve toestand niet zou kunnen waarnemen dan is er vanuit dit gezichtspunt geen welzijnsprobleem. Echter, gewervelde dieren kunnen hun gevoelens op een of andere manier wel waarnemen. Dit blijkt uit proeven waar hen geleerd wordt op een toets te drukken, als ze onder invloed zijn van een stof waarvan bij mensen bekend is dat het een bepaald gevoel oproept: heroïne bijvoorbeeld. Een dier weet dan of het ingespoten is met een oplosmiddel met of zonder heroïne. Het dier kan uiteraard niet “weten” waarmee het ingespoten is, het kan alleen afgaan op wat het voelt. Met talloze stoffen is aangetoond dat dieren verschillende stoffen uit elkaar kunnen houden op grond van het gevoel dat ze in het dier opwekken.

Dier en mens lijken veel op elkaar voor wat betreft de fysiologie die ten grondslag ligt aan hun biologisch functioneren. Emoties en cognitie zijn essentiële onderdelen van de biologische functies die dieren helpen te overleven. Er wordt dan ook een beroep gedaan op deze overeenkomsten in fysiologie en in biologische functies om aannemelijk te maken dat dieren net als wij hun eigen interne toestand waarnemen. Mensen onderling weten ook niet zeker van elkaar of ze gevoelens en gedachten hebben, maar op grond van overeenkomsten tussen mensen gaan we hier (gelukkig maar) van uit.

Bij vertebraten kan een aantal motivationele systemen onderscheiden worden, zoals honger, dorst, angst of sociaal gedrag. Het dier registreert voortdurend de toestand van deze systemen en bij een te groot verschil tussen de biologisch gewenste en actuele toe-

stand wordt een specifiek gedrag geactiveerd (de adaptieve reactie) om dat verschil op te heffen en in de behoefte te voorzien. In geval van een laag gehalte aan suiker in het bloed (bloedglucosespiegel) ontstaat honger en zal het gedrag gericht worden op voedselopname, waardoor onder andere de bloedglucosespiegel weer wordt verhoogd. In geval van angst worden specifieke gedragingen en bijbehorende fysiologische processen geactiveerd om aan de oorzaak van deze angst een einde te maken. Welzijnsaantastingen vinden plaats wanneer het voor het dier onmogelijk is passend adaptief gedrag te vertonen. Anders gezegd, een welzijnsaantasting treedt op als het dier een verschil tussen de waargenomen en gewenste toestand niet kan verkleinen. Elke diersoort wordt gekenmerkt door soortspecifieke adaptieve strategieën. Wanneer voor een dier niet duidelijk is wat het moet doen om dreigend verlies van controle over die situatie te voorkómen, treden er algemene reacties (stress) op, die de kans om toch adaptief gedrag te kunnen vertonen zo groot mogelijk maken. De reactie op situaties als ‘verlies van controle’ en ‘onvoorspelbaarheid van de omgeving’ bestaat uit de activering van het zogenaamde fight-flight (vluchten of verdedigen) systeem, de onderdrukking van gedrag als voedselopname, rusten, voortplanting, exploratie e.a. en specifieke hormonale reacties, die ervoor zorgen dat gedrag en fysiologie goed gecoördineerd verlopen. Het effect van zulk gedrag wordt ook door het dier geregistreerd om vast te stellen in hoeverre een bepaalde strategie inderdaad adaptief is. Mens en dier zijn daartoe uitgerust met beloningssystemen, die als een tegenwicht zijn op te vatten voor de stresssystemen. Als een gedrag een gunstig effect heeft, geeft het beloningssysteem signalen af die mensen en waarschijnlijk ook dieren als plezierig ervaren.

Het optreden van signalen die wijzen op de bevrediging van een behoefte, wordt als positief voor welzijn gezien, van signalen die wijzen op activering van stresssystemen echter als negatief. Overigens betekent afwezigheid van negatieve signalen nog niet dat alles goed is. Apathie of depressieachtige verschijnselen en negatieve signalen worden ook bij dieren gezien die er na lange tijd alsmaar niet in slagen zich aan te passen.

## Welzijn van genetisch-gemodificeerde dieren

De moeilijkheid bij GM dieren met een welzijnsstoring – bijvoorbeeld een of ander gezondheidsprobleem of een beperkt vermogen adaptief gedrag te tonen – is, dat bij zulke dieren lang niet altijd zomaar duidelijk is wat de oorzaak van deze storing mag zijn. Natuurlijk kan de waargenomen storing een bedoeld effect zijn van de aangebrachte modificatie. Dat hoeft echter niet. Een optredende storing, bijvoorbeeld een moeilijk verloop van het geboorteprocés, kan ook teweeggebracht zijn door één van de bij de genetische modificatie gehanteerde technieken, zoals de micro-injectie techniek, de embryotransplantatie, de injectie van ES-cellen en andere. Deze laatste welzijnsproblemen zijn dan in feite alle onbedoelde neveneffecten van de toegepaste en noodzakelijke technieken. Als de welzijnsaantasting echter een direct gevolg is van de genetische modificatie, dan staat deze modificatie zelf in rechtstreeks verband met de waargenomen gedragsstoring en/of met de al dan niet bedoelde aan-doening.

De soortspecifieke genetische uitrusting van het dier is erop gericht dat cruciale systemen in de hersenen geïjkte (genetisch vastgelegde) signalen (input) vanuit het lichaam en de omgeving opvangen en uitgaan van bepaalde fysiologische en gedragsmatige mogelijkheden om met deze input om te gaan. Als het dier door genetische modificatie van bijvoorbeeld een bepaald neurale systeem geconfronteerd wordt met onoplosbare verschillen tussen datgene wat wordt verwacht en de werkelijkheid, dan is zijn welzijn aangetast. Hier geldt dus niet altijd: ‘wat niet weet dat niet deert’. Daar staat tegenover dat iets slechts betrekking heeft op die neuronale structuren, die zich met zulke afwegingen bezighouden. Een dier weet uiteraard niet welke eiwitten het wel of niet produceert. Maar als zo’n eiwit van belang is voor processen die wel worden “waargenomen” (dit is de activering van het stress- of pleziërsysteem), dan merkt het dier het wel. Als het effect van een genetische verandering beperkt blijft tot een verandering op een ‘laag’ niveau van biologische organisatie (bijvoorbeeld intracellulaire moleculaire processen) en hersenen en hormonen nog steeds hun normale werk kunnen doen, dan geldt wel: ‘wat niet weet dat niet deert’. Genetische veranderingen

aan het zenuwstelsel of het hormoonsysteem zelf vormen natuurlijk een extra welzijnsrisico.

Een door ons waargenomen gedragsverandering is op zichzelf nog niet voldoende voor een duidelijke conclusie. Stel dat je een behoefte wegneemt, bijvoorbeeld zo, dat een dier minder behoefte heeft om te exploreren, dan zal er ook minder activiteit zijn. Het zien van een weinig actief dier hoeft dan nog niet te betekenen, dat er sprake is van welzijnsaantasting. Er kan nog steeds een evenwicht zijn tussen de neiging om te exploreren en de mate van activiteit. Het gaat erom of het dier kan doen wat het volgens zijn aard – al dan niet gemodificeerd – moet doen. Echter door het wegnemen van een behoefte wordt een dier wel de mogelijkheid ontnomen plezier te hebben van het bevredigen van deze behoefte. Dit kan bijvoorbeeld betekenen dat een dier onder bepaalde eenvoudige omstandigheden zich met een verminderde behoefte om te exploreren goed kan redden, maar wel veel kwetsbaarder is in geval van belasting onder meer complexe omstandigheden. Immers de balans van belasting en beloning is van belang voor het welzijn van een dier en deze balans mist nu de bijdrage aan satisfactie die exploreren zou kunnen opleveren. Dit soort subtiele genetische veranderingen, welke niet resulteren in een verstoring van het evenwicht tussen wat het dier nastreeft en wat het kan, zijn natuurlijk denkbaar maar waarschijnlijk zeldzaam. Meer voor de hand liggend is dat een genetische modificatie ingrijpende gevolgen meebrengt. Er moet dus een goede reden zijn dieren genetisch te veranderen. Een direct groot belang voor de menselijke gezondheid is zo’n reden. Een nog hogere productie van onze landbouwhuisdieren, of nog weer andere esthetische eigenschappen of een verhoogde aabaarheid van gezelschapsdieren zijn dat echter niet.

## Welzijnsmonitoring

Bij welzijnsmetingen van GM dieren moet goed gelet worden op signalen die wijzen op chronische stress of op succesvolle adaptatie (satisfactie). Op voorhand is heel moeilijk te zeggen op welk tijdstip en onder welke omstandigheden zich wat voor zal doen, aangezien de relatie tussen genen en gedrag uitermate complex is. Een enkel gen kan met diverse gedragingen te maken hebben (pleiotropie) en omgekeerd komt een gegeven gedrag gewoonlijk ook tot stand door de werking van

vele genen. Daar staat tegenover dat tussenliggende systemen, bijvoorbeeld neuronale netwerken, een ongelooflijk aanpassingsvermogen hebben.

In feite is er maar één manier om het welzijn van deze dieren goed te bewaken en dat is alle dieren op een gestandaardiseerde wijze monitoren, waardoor eventueel maladaptief gedrag (gedrag dat aangeeft dat het dier zich niet aan kan passen), ziektes en dergelijke ontdekt kunnen worden. Deze aanpak moet in een zodanige omgeving plaatsvinden, dat zowel essentiële biologische functies als afwijkingen tot uiting kunnen komen. Een rijkgeschakeerde interactie tussen het GM dier en zijn omgeving is nodig om zijn aanpassingsvermogen tot ontwikkeling te brengen en waarneembaar te maken. De mate waarin genetische modificaties tot zichtbaar functieverlies en/of gedragsveranderingen leiden, is dus sterk afhankelijk van de testconditie, waarin het adaptieve vermogen wordt getoetst. Zo kan de aan- of afwezigheid van soortgenoten heel wat uitmaken. Dit alles betreft natuurlijk alleen die adaptieve vermogens (gedragingen) welke voor een dier relevant zijn, ook in gevangenschap. Deze gedragingen, ook wel essentiële behoeften genoemd, zijn ook heel belonend voor het dier. Denk hierbij aan het wroeten van varkens of het kunnen graven in de bodem en het hebben van een donkere schuilplaats bij knaagdieren.

Wanneer ze in een nieuwe omgeving worden geplaatst, vertonen veel GM dieren veranderingen in hun gedrag, zoals een veranderde snelheid van lopen, van afgelegde afstanden en dergelijke. Of hierbij de voor welzijn belangrijke balans tussen satisfactie en stress verstoord is, kan met de huidige informatie nog moeilijk worden vastgesteld. Vaak zijn er andere criteria op het terrein van gezondheid, die al uitsluitend geven over de welzijnsstatus. Dat neemt niet weg dat voor een aantal gevallen waarin de fysieke verandering of de gezondheidstoestand van de betrokken dieren niet zo duidelijk is, nog geen goede meetinstrumenten voorhanden zijn. Tenslotte, een volledig geautomatiseerd systeem dat gedrag registreert en analyseert, is nodig om de grote aantallen GM dieren te kunnen volgen. Een dergelijk systeem moet geïkht worden met behulp van dieren, waarvan het gedrag bekend is. Alleen dan kun je zeggen of een bepaalde modificatie een serieuze afwijking vertoont. Er zijn gelukkig talrijke soorten muizen (inteelstammen), waarmee een monitoringssysteem

getest kan worden. Pogingen om gedragsonderzoek te objectiveren met behulp van beeldverwerking en computers en om van grote aantallen dieren, vooral GM dieren, min of meer automatisch vast te stellen of hun welzijn aangetast is, worden nu ondernomen (zie bijgaande foto).

## Literatuur

Buehr, M., Hjorth, J.P. Kornerup Hansen, A. & Sandøe, P. (2003) Genetically modified laboratory animals – What welfare problems do they face? *Journal of Applied Animal Welfare Research* 6:319-338

Spink, A.J., Tegelenbosch, R.A.J., Buma, M.O.S. & Noldus, L.P.J.J. (2001) The Etho Vision video tracking system – A tool for behavioural phenotyping of transgenic mice. *Physiology & Behavior* 73:731-744.

Van der Meer, M., Baumans, V., Hofhuis, F.M.A., Olivier, B., van Zutphen, B.F.M. (2001) Consequences of gene targeting procedures for behavioural responses and morphological development of newborn mice. *Transgenic Research* 10: 399-408.



Gedragskooi waarbij, met een volledig geautomatiseerd systeem, gedrag wordt geregistreerd.





# 3 Goed geregeld (?)

EGBERT SCHROTEN

---

*Prof. dr. E. Schroten (1939) studeerde theologie en filosofie in Utrecht en Straatsburg. Promotie (over de betekenis van de lichamelijke) aan de Universiteit van Utrecht (UU) in 1970. Was enige tijd parttime predikant in de Nederlandse Hervormde Kerk. Van 1969 – 1987 was hij wetenschappelijk (hoofd-) medewerker aan de theologische faculteit van de UU. Van 1987 tot aan zijn emeritaat in 2004 was hij hoogleeraar christelijke ethiek vanwege de Nederlandse Hervormde Kerk bij diezelfde faculteit en tevens directeur van het universitaire Centrum voor Bio-ethiek en Gezondheidsrecht, dat nu is omgevormd tot Ethiek Instituut van de UU. Was van 2000 – 2003 rector van het Hervormd Theologisch Wetenschappelijk Instituut. Is sinds haar oprichting voorzitter van de Commissie Biotechnologie bij Dieren (CBD). Maakt(e) deel uit van enkele internationale bio-ethiek commissies. Publiceerde op het gebied van de godsdienstfilosofie en de (christelijke) (bio-) ethiek.*

---

Gebruikmaken van biotechnologische processen, bijvoorbeeld bij het bereiden van bier, is al heel oud, maar het gericht kunnen veranderen van de genetische ‘make-up’ van organismen is een jonge technologie, met verstrekkende gevolgen voor de samenleving. Dat wordt in dit cahier meer dan duidelijk. Vanwege die mogelijke verstrekkende gevolgen, maar ook door de aard van deze nieuwe biotechnologie, het kunnen ingrijpen in het genoom, is deze technologie omgeven door een hekwerk van regelgeving. Die betreft vooral de toepassingen ervan, zowel bij mens, dier als plant, en de gevolgen ervan voor het milieu. Dat geldt vrijwel overal in de wereld, zij het dat die regelgeving behoorlijk uiteen kan lopen. Het ene land ‘doet moeilijker’ dan het andere.

Op het gebied van transgene dieren bestaat er in Nederland een “nee, tenzij” beleid. Dat betekent in de praktijk dat je geen dieren transgeen mag maken tenzij je er een vergunning voor hebt gekregen. Het verschil met een “ja, mits” beleid is dat daaraan geen verbod ten grondslag ligt, wat bij een “nee, tenzij” beleid wel het geval is. Wat formeler gezegd: biotechnologische handelingen bij dieren zijn vergunningplichtig. Ik kom daar uitvoerig op terug, maar wil er hier eerst op wijzen dat dit beleid natuurlijk niet uit de lucht is komen vallen. Sedert de laatste decennia van de negentiende eeuw komt de bescherming van dieren meer en meer in de belangstelling te staan (zie ook kader “Regelgeving buiten Nederland”). In de daarop volgende tijd doen zich op het gebied van de dierenbescherming in binnen- en buitenland vele belangwekkende ontwikkelingen voor, maar het is hier niet de plaats daarop nader in te gaan. Een belangrijke mijlpaal is de brochure *Rijksoverheid en Dierenbescherming* uit 1981, neerslag van overleg tussen deze beide partijen, waarin de intrinsieke waarde van het dier tot uitgangspunt van beleid wordt gemaakt. Daarmee wordt erkend dat een dier niet alleen maar (nuts)waarde voor de mens heeft, maar ook een eigenwaarde, die niet zomaar aangetast mag worden. Dit vormt de basis van het respect dat wij voor dieren dienen te hebben.

De Hoenderhof, Jan Steen (1660).

Bron: Koninklijk Kabinet van Schilderijen Mauritshuis Den Haag.



Door velen in onze samenleving wordt het veranderen van de genetische 'make-up' van dieren als zo'n aantasting van hun eigenwaarde beschouwd en als een volgende stap in de richting van de instrumentalisering van het dier, en dus als een gebrek aan respect. Meer algemeen gesteld wordt het transgeen maken van dieren op zijn minst als moreel problematisch ervaren. Vele mensen zijn er zelfs principieel tegen, omdat zij genetische modificatie beschouwen als een ongeoorloofd ingrijpen in Gods schepping, in de natuur en/of in de gang van de evolutie. In dat verband duikt soms de term 'voor God spelen' op, waarin tot uitdrukking gebracht wordt dat de mens hier op een riskante manier zijn boekje te buiten gaat. Een meer seculier beeld daarvoor is dat van de tovenaarsleerling, die de gevolgen van zijn handelen niet meer kan overzien.

Tegen die achtergrond werd in 1989 door de toenmalige minister van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij (LNV) een *Commissie van Advies ethiek en biotechnologie bij dieren* ingesteld. Deze kreeg de opdracht om vanuit ethisch perspectief de probleemvelden van biotechnologie bij dieren te omschrijven en een toetsingskader en criteria op te stellen, waarmee biotechnologische handelingen bij dieren getoetst zouden kunnen worden. De rapportage van de commissie, waarin een "nee, tenzij" standpunt wordt verdedigd, kwam in 1990 klaar en werd in het daarop volgende jaar grotendeels door het kabinet overgenomen. Dat betekende dat een "nee, tenzij" beleid volgens het door de commissie uitgezette bestek zou worden uitgevoerd. De voorbereidingen daarvoor waren al in volle gang, aangezien er een wet in de maak was, de Gezondheids- en Welzijnswet voor Dieren (GWWD). Deze wet werd in 1992 door de Tweede Kamer aangenomen. Daardoor kreeg het "nee, tenzij" beleid, dat door de Tweede Kamer werd gesteund, een wettelijke basis. Maar omdat de GWWD een zogenaamde raamwet is, die middels nader te nemen maatregelen moet worden 'ingekleurd', duurde het tot 1997 voordat het *Besluit Biotechnologie bij Dieren* (BBD) van kracht werd.

In dat BBD wordt de oprichting van de *Commissie Biotechnologie bij Dieren* (CBD) geregeld. De CBD is dus niet een particulier initiatief, maar een bij wet ingestelde multidisciplinaire commissie van deskundigen die tot taak heeft de overheid, in feite de minister van LNV, van advies te dienen over het al dan niet verlenen van vergunningen voor het verrichten van biotechnologische handelingen bij dieren

## Besluit biotechnologie bij dieren, art.2 = Samenstelling van de CBD

### Artikel 2

1. *De commissie bestaat uit ten hoogste 9 leden*
2. *In de commissie hebben naast een voorzitter zitting:*
  - a. *één deskundige op het terrein van de ethiek*
  - b. *één deskundige op het terrein van de maatschappijwetenschappen*
  - c. *twee deskundigen op het terrein van de medische of de dierlijke biotechnologie*
  - d. *één deskundige op het terrein van de proefdierkunde of de dierproefvraagstukken*
  - e. *één deskundige op het terrein van de ethologie*
  - f. *één deskundige op het terrein van de diergeneeskunde of de zoötechniek*
  - g. *één deskundige op het terrein van de humane medische wetenschappen*
3. *Onze minister en Onze ministers van Volksgezondheid, Welzijn en Sport, van Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer en van Onderwijs, Cultuur en Wetenschappen kunnen ieder één ambtenaar aanwijzen die bevoegd is de vergaderingen van de commissie bij te wonen.*
4. *Eén van de in het tweede lid bedoelde leden wordt benoemd op voordracht van de Commissie genetische modificatie, bedoeld in artikel 2.26 van de Wet milieubeheer.*

De CBD is overigens niet de enige commissie waarmee iemand die genetische modificaties in dieren tot stand wil brengen te maken krijgt. Ook de Commissie Genetische Modificatie (Cogem) speelt een belangrijke rol, vooral op het punt van de veiligheid voor mens en milieu. Haar blikveld is echter breder dan dat van de CBD; het betreft alle genetisch-gemodificeerde organismen (ggo's), dus niet alleen dieren. De taakstelling van de Cogem is vastgelegd in de Wet Milieubeheer (art. 2.27) en kan in drieën worden onderverdeeld:

1. Het adviseren van de minister van VROM over de indeling in risicogroepen van het vervaardigen van en omgaan met ggo's, en over veiligheidsmaatregelen die in verband daarmee moeten worden getroffen. Daaronder vallen ook de eisen die aan de deskundigheid van personen die ggo's vervaardigen of ermee omgaan moeten worden gesteld;
2. Het adviseren zowel van vergunningverlenende instanties over vergunningsaanvragen die betrekking hebben op het vervaardigen van of het verrichten van handelingen met ggo's, alsook de advisering van de Milieu inspectie die belast is met het toezicht daarop;
3. Het informeren van de minister van VROM of andere ministers, als aan het vervaardigen van of omgaan met ggo's ethische of maatschappelijke aspecten zijn verbonden die naar het oordeel van de Cogem van belang zijn.

Het transgeen maken van dieren wordt ook beschouwd als een dierproef in de zin van de Wet op de Dierproeven (WOD). Dat betekent dat door iemand die biotechnologische handelingen bij dieren wil verrichten ook de Dierexperimentencommissie (DEC) moet worden gepasseerd. Een DEC is geen landelijke commissie, zoals de CBD en de Cogem, maar ze is meestal verbonden aan een instelling die een vergunning heeft voor het doen van dierexperimenteel onderzoek. Overigens kan zo'n vergunninghouder ook gebruikmaken van de DEC van een andere instelling. Er zijn in Nederland zo'n tachtig vergunninghouders en ongeveer vijftientig DEC's. Een onderzoeker moet middels het invullen van een aanvraagformulier de benodigde informatie verschaffen op basis waarvan de commissie een oordeel kan vellen. Omdat deze informatie van vertrouwelijke aard kan zijn, zijn de vergaderingen van DEC's besloten, wat overigens de laatste tijd tot discussie aanleiding geeft. Het oordeel van een DEC is bindend. Bij een negatief advies kan in beroep gegaan worden bij de Centrale Commissie Dierproeven en als die beoordeling eveneens negatief uitvalt, mag de proef niet uitgevoerd worden.

De belangrijkste taak van een DEC is te beoordelen of het belang van de dierproef opweegt tegen het ongerief – zeg maar het lijden – dat het dier te verduren krijgt. In de WOD worden een aantal belangen genoemd met het oog waarop dierproeven zouden kunnen worden verricht: pathologische, diagnostische, toxicologische, medicinale, farmaceutische en veterinaire toepassingen en het

beantwoorden van wetenschappelijke vragen. Het zal niemand verbazen dat deze verscheidenheid aan belangen binnen de DEC's soms aanleiding geeft tot interpretatieproblemen. Bovendien kunnen DEC-leden het wel eens moeilijk hebben met de doelstellingen van de dierproeven die ze moeten beoordelen, bijvoorbeeld het ontwikkelen van diergeneesmiddelen die gebruikt worden voor het in stand houden van een vorm van dierhouderij die zij als verre van ideaal beschouwen.

Daarnaast heeft een DEC tot taak zich ervan te vergewissen of de herkomst, huisvesting en verzorging van de proefdieren conform de wet is en of de onderzoeker voldoende deskundig is. Ook moet gelet worden op de zogenaamde drie V's: **V**ermindering van het aantal proefdieren, **V**erfijning van de proef met als gevolg het verminderen van ongerief en **V**ervanging van proefdieren door alternatieven (bijvoorbeeld reageerbuisonderzoek of computersimulaties). Een en ander wordt gecontroleerd door een proefdierkundige, een zogenaamde artikel 14 functionaris, die aan de betreffende instelling is verbonden, en door de inspectiedienst van de VWA (de Voedsel- en Warenautoriteit). Tenslotte heeft een DEC tot taak een oordeel te vellen over de morele aanvaardbaarheid van de betreffende dierproef. Met het oog daarop dient er ethische expertise van buiten de instelling in elke DEC aanwezig te zijn.

Over beide commissies, de Cogem en de DEC's zou veel meer te zeggen te zijn, maar om goed zicht te krijgen op



Commissievergadering CBD

Fotografie: Ronno Tramper

het eigene van de Nederlandse regelgeving is het goed om de aandacht te richten op de CBD. Waarom? Wel, omdat de CBD min of meer uniek is in de wereld. Veiligheid rond biotechnologie (kernthema van de Cogem) staat ook in veel andere landen, zeker in West-

Europa, hoog op de agenda. Dierenwelzijn (kernthema van de DEC's) krijgt elders eveneens aandacht, zij het in mindere mate. Maar een aparte ethische toets, zoals bij de CBD, komt nergens anders voor. Daarom is het goed stil te staan bij de taak en werkwijze van deze commissie.

## Maatschappelijke acceptatie – een omstreden zaak

**BERT LAEYENDECKER**

*Prof. dr. L. Laeyendecker is emeritus hoogleraar algemene sociologie van de Universiteit Leiden. Hij is lid van de Commissie Biotechnologie bij Dieren.*

In de recent verschenen *Trendanalyse Biotechnologie 2004* worden niet alleen allerlei te verwachten ontwikkelingen geschetst, maar blijkt ook enige onzekerheid over de mate waarin de bevolking bereid is die te accepteren. Er zijn redenen voor die onzekerheid zoals iedereen weet die de krant leest. Genvoedsel stuit op stevige weerstanden, proefgewassen worden vernield en bij velen leven zorgen over het “geknutsel aan dieren”. Is dat alleen te wijten aan onbegrip of onbestemde angst of is er meer aan de hand?

### Wat is acceptatie?

De grote Van Dale omschrijft ‘sociale acceptatie’ als het “geïntegreerd worden (van nieuwe producten, technieken e.d.) in het gedragspatroon van grote groepen in de samenleving”. Deze integratie betreft niet alleen de positieve aspecten van die producten, maar ook de kosten en risico's. Die mogen echter niet groter zijn dan de voordelen, anders haakt men liever af. Acceptatie impliceert dus altijd een afweging, bij iemand die een zorgvuldig oordeel nastreeft tenminste, van kosten en baten. Deze omschrijving laat overigens buiten beschouwing of de “integratie in het gedragspatroon” van harte of met tegenzin gebeurt, en of ze vrijwillig gebeurt of als onvermijdelijk aanvaard wordt. Als er alleen maar genvoedsel te verkrij-

gen is of niet genetisch-gemodificeerd voedsel te duur wordt, moet men toch eten.

De kosten en baten zijn niet alleen van fysieke aard; zij kunnen ook van ethische aard zijn. De huidige weerstanden tegen acceptatie van de biotechnologie betreffen zorgen omtrent te hoge kosten van beiderlei aard: genvoedsel bedreigt de gezondheid; gentechologie bij dieren schaadt de integriteit van het dier en is ethisch onbehoorlijk.

### Een maatschappelijk conflict

Er wordt krachtig gestreden over de voors en tegens van de moderne biotechnologie. Die strijd heeft allerlei gedaanten. De zakelijke vorm bestaat in het uitwisselen van wetenschappelijke analyses die de tegenstander moeten overtuigen. Minder zakelijk gaat het soms toe in hoorzittingen die krachtens de wetgeving inzake biotechnologie bij dieren over elk voorgenomen wetenschappelijk onderzoek op dat terrein moeten worden gehouden. En wat te denken van het gebruikte retorisch geweld, zoals dat bijvoorbeeld in Duitsland is geanalyseerd waar retorische middelen worden ingezet om mensen ervan te overtuigen dat de medische biotechnologie het heil van de mensen dient? Elisabeth Beck-Gernsheim heeft dat “*acceptatieretoriek*” genoemd. Die kent een aantal onderdelen. Zij begint met de “*bedreigingsretoriek*” waarbij men zich in een krimi waant. De biotechnologie is erop gericht de “moordlustigste vijanden van de mens” te bestrijden; de “ware booswicht in de zaak kanker” moet opgespoord en dat “schurkengen” dient onschadelijk gemaakt te worden. Aan alle kanten wordt ons leven bedreigd. Ook moet bedacht worden dat ‘ieder mens het risico loopt abnormale nakomelingen te krijgen’. Maar daaraan is iets te doen: de *reddingsretoriek* geeft het aan. “Kennis van de genen kan de weg naar een betere toekomst vrijmaken waarin minder onrecht en leed is, de ouderdom

draaglijk wordt en het ‘geboren worden’ geen door erfelijke ziekten gestempeld avontuur meer is”. In dat kader volgt een appèl tot preventie van dergelijke gevaren door de inzet van biotechnologische kennis bij, bijvoorbeeld, de prenatale diagnostiek. Men kan “ziekten voorkomen” – in feite gaat het om het voorkomen van dragers van ziekten – hetgeen tot heil van alle betrokkenen is. Wie dergelijke mogelijkheden afwijst, is onverantwoordelijk, zo wordt ons in het derde onderdeel, de *verantwoordelijkheidsretoriek* voorgelouden. Onverantwoordelijk bijvoorbeeld tegenover de samenleving “die een zwaar gehandicapt kind in de solidariteitsgemeenschap moet opnemen”.

Deze soms weinig fijnzinnige uitspraken zijn afkomstig van hooggeplaatste wetenschappers en politici. Op een dergelijke wijze scheppen zij een klimaat waarin mensen die nieuwe medische mogelijkheden inzake het zeer vroegtijdig opsporen van defecten afwijzen, al te gemakkelijk wegens een gebrek aan verantwoordelijkheid ‘schuldig’ worden geacht. Dat is zwaar geschat en tekent de ernst van het conflict. Maar om dat conflict goed te begrijpen, is het beter het kader te bezien waarin de discussies zich afspelen.

### **Omstreden wetenschappelijke context**

Dan valt onmiddellijk op, dat aan deskundigheid groot belang wordt toegekend. Het zijn de wetenschappelijke specialisten die verzekeren dat de voordelen de eventuele nadelen overtreffen. Deze specialisten doen, zij het onder voorwaarden, positieve voorspellingen over de toekomst. Zij doen daarbij een beroep op het vertrouwen dat men in de wetenschap mag hebben. De wetenschap belichaamt immers het goede gebruik van de rede en is in het verleden juist daarom de sterkste motor van de vooruitgang gebleken. Wie zouden dan beter kunnen oordelen?

Deze opvatting was heel lang vrijwel onbestreden, maar lijkt nu haar beste tijd te hebben gehad. Het vertrouwen ebt een beetje weg. In de *Achtergrondstudies* die de reeds genoemde *Trendanalyse* begeleiden, wordt op dat tekort aan vertrouwen gewezen, maar die constatering hangt een beetje in de lucht, omdat niet naar diepere gronden wordt gezocht. Mijs inziens zijn die te vinden in de veranderende relatie tussen wetenschap en samenleving.

Die verandering komt vooral voort uit het feit dat de

wetenschap en tegelijk daarmee de technologie, de belangrijkste middelen zijn geworden voor het verwerpen van economische en politieke macht, met name sinds de Tweede Wereldoorlog. De economische groei hangt voor een groot deel van wetenschappelijke en technische innovaties af – vandaar bijvoorbeeld het gehamer op de kennissamenleving – en militair overwicht is tegenwoordig gebaseerd op steeds geavanceerdere technologie. Ontwikkeling van wetenschap en technologie vraagt investeringen die alleen door een economisch sterk land kunnen worden opgebracht. Er is dan ook een hechte relatie gegroeid tussen wetenschap en technologie aan de ene kant en economie en politiek aan de andere kant. Deze nauwe verwevenheid heeft de vroegere, relatieve onafhankelijkheid van de wetenschap verloren doen gaan. Anders gezegd, de wetenschap, i.c. de natuurwetenschap, staat tegenwoordig voor een belangrijk deel in dienst van economische en politieke belangen.

Dat blijft niet zonder gevolgen voor de onafhankelijkheid van de wetenschapsbeoefenaren. De meesten daarvan zullen ongetwijfeld vrij en onafhankelijk willen zijn, maar dat klopt niet met het beeld dat de buitenwacht van hen krijgt. Dat hangt niet zozeer van de meerderheid der wetenschappers af die in laboratoria onopvallend hun werk doen, maar van degenen die als duidelijke belangenbehartigers optreden. Evaluaties van het kernenergie-debat – dat nu is opgevolgd door het biotechnologiedebat – hebben interessante informatie opgeleverd over de manier waarop te werk werd gegaan. Die hield onder andere weigering in van onwelkome gegevens in vaktijdschriften, ontslag van kritische wetenschappers die de officiële lijn bestreden en persoonlijke verdachtmakingen tot regelrecht bedrog, zoals blijkt uit een aansporing, geuit in de Duitse wetenschappelijke raad voor het kernonderzoek: “Mijne heren, de zaak is ernstig. Spreek u overal uit vóór de kernenergie; het hoeft niet allemaal waar te zijn, als het maar luid is”.

Dat soort voorvallen blijft niet verborgen en ondergraaft het vertrouwen in de deskundigen. Maar er is een tweede reden voor de erosie van het traditionele vertrouwen. Die ligt in het hand over hand toegenomen verschijnsel van de “tegenexpertise”. Als er een wetenschappelijk rapport verschijnt ter verdediging van een bepaalde positie wordt als reactie een

andersluidend wetenschappelijk rapport gepubliceerd. De commentaren liggen dan voor de hand: die rapporten verdedigen tegengestelde belangen en: met de wetenschap kan men klaarblijkelijk alle kanten op. Deze ontwikkeling heeft krachtig bijgedragen aan wat de 'demontage van de deskundigen' genoemd is. Een derde factor ligt in het feit dat de wetenschap niet, zoals vroeger, vooral als een probleemoplosser werd gezien, maar steeds meer als probleemveroorzaker. Dat wordt pregnant uitgedrukt met de woorden: "we staan steeds vaker voor de vraag hoe we met behulp van wetenschap en techniek problemen moeten oplossen die we zonder wetenschap en techniek niet gehad zouden hebben". De twijfel groeit dat het oplossend vermogen geen gelijke tred houdt met het probleemoplossend vermogen. Daarmee bevindt de wetenschap zich in een paradoxale positie: we kunnen er niet buiten, maar de heilbrenger – dat woord wordt hier, gezien vele uitingen van wetenschappers, bewust gebruikt – wordt met stijgend wantrouwen gezien. Een vierde factor hangt daarmee onmiddellijk samen. Wetenschap kan als sterkste motor van de vooruitgang beschouwd worden, maar als het geloof in de vooruitgang tanende is, daalt de waardering voor de motor. En dat geloof is in de vorige, rampzalig verlopen eeuw sterk verzwakt.

### Eenzijdige rationaliteit

De laatste hier te noemen factor betreft de afbrokkeling van de overtuiging dat de wetenschap de optimale belichaming is van de menselijke rede. Langzamerhand is de eenzijdigheid van deze wetenschappelijke rationaliteit duidelijker geworden. Zij is een vorm van wat de instrumentele of doelrationaliteit wordt genoemd. Deze heeft betrekking op het zo effectief en efficiënt mogelijk afstemmen van middelen op een gegeven doel. In het wetenschappelijk onderzoek wordt die bijvoorbeeld zichtbaar in het methodische experiment. Op breder terrein in vragen als: hoe maak ik winst, hoe organiseer ik met de minste kosten en inspanningen, hoe reduceer ik fysieke risico's enzovoort?

Geen kwaad woord over deze instrumentele rationaliteit als zodanig. We hebben er veel aan te danken. Het gaat alleen mis als zij andere vormen van het gebruik van de menselijke rede verdringt. Dat dit op vele domeinen van het leven het geval is, blijkt uit de fre-

quentie waarmee woorden als praktisch nut, economisch rendement en effectiviteit in ons dagelijkse vocabulaire zijn doorgedrongen.

Daardoor worden ook de vragen verdrongen die naar aanleiding van de wetenschappelijke ontwikkelingen met goed recht gesteld kunnen worden. Vragen die niet alleen betrekking hebben op de doeleinden van de wetenschap – 'Wat willen we eigenlijk weten en waarom?', 'Welke onderzoeken worden er wel en niet geëntameerd?' en 'Waartoe vindt de selectie plaats?' – , maar ook op het maatschappelijk kader waarbinnen de wetenschap haar plaats heeft. Vragen als: 'Aan wie komen de voordelen van de wetenschap eigenlijk ten goede?', 'Hoe worden de verantwoordelijkheden voor de negatieve gevolgen verdeeld?', 'Wie mag besluiten over de richting die de wetenschap inslaat als de gevolgen daarvan iedereen raken?', 'Hoe legitiem zijn de huidige sociale en politieke arrangementen waarbinnen het wetenschappelijk-technologisch-economisch bestel functioneert', 'Wie definieert de risico's?' enzovoort.

Deze vragen zijn in een democratische samenleving die gelijkberechtigtheid in haar vaandel voert van groot belang. Zij laten zich echter moeilijk kwantificeren en wegen, dat wil zeggen, met behulp van instrumentele rationaliteit beantwoorden. En het gros van de argumenten die door de natuurwetenschappelijk deskundigen inzake de voordelen en de gevaren geleverd worden, zijn van typisch instrumentele aard. Het kernenergie-debat concentreerde zich op de grenswaarden van de fysieke risico's: wanneer wordt het echt gevaarlijk? Het debat over het genvoedsel gaat over de eventuele gezondheidsrisico's en milieueffecten die zich misschien met behulp van experimenten en berekeningen laten bepalen, hoewel dat erg onzeker is voor de lange termijn. Op zich is met dergelijk veiligheidsonderzoek niets mis, het probleem is veel eerder dat deze benadering de enig mogelijke geacht wordt. Anders gezegd: zij wordt tot de enige aanvaardbare – en hanteerbare – methode geproclameerd om te komen tot legitieme beslissingen inzake biotechnologische ontwikkelingen.

Daardoor wordt niet alleen voorbijgegaan aan de andere, hierbovengenoemde en fundamentele vragen, maar tevens bewerkstelligd dat ook de fundamentele zorgen – wel eens zorgen over de onteigening van de toekomst genoemd – zich alleen via verzet



tegen de wetenschappelijke argumenten kunnen uiten. Op die manier wordt een brede discussie op oneigenlijke manier versmald.

Helaas bestaat er voor overwegingen als de bovenstaande in natuurwetenschappelijke, economische en politieke kringen weinig belangstelling. Dominant lijkt de opvatting te zijn dat het verzet, juist omdat het wetenschappelijke argumenten niet accepteert, irrationeel is, voortkomt uit diffuse, niet te beredeneren angsten of domweg uit onwetendheid. Voorlichting moet dan helpen: als mensen eenmaal de voordelen gaan beseffen, neemt de acceptatie wel toe. Die laatste formulering, ook in de Trendanalyse te vinden, is een fraai voorbeeld van de hier bekritiseerde denkwijze. Is het trouwens toeval dat van de 22 personen die voor de samenstelling van de Achtergrondstudies bij de Trendanalyse zijn geïnterviewd, er 21 natuurwetenschappers zijn?

### Acceptatie of accepteerbaarheid?

Eén vraag tot slot. Is de vraag naar de 'accepteerbaarheid' niet belangrijker dan de vraag naar de

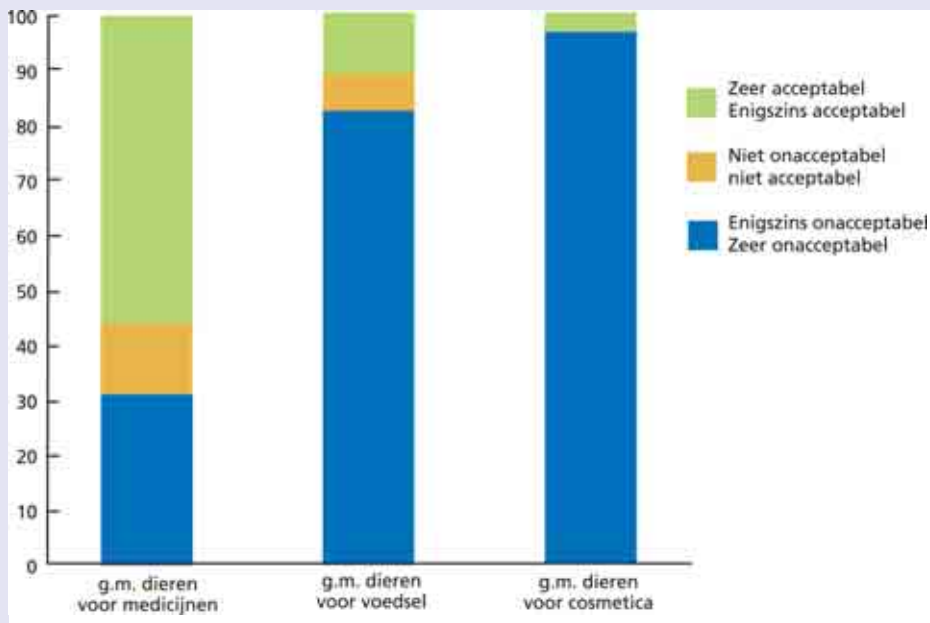
'acceptatie'? In de eerste gaat het er namelijk om of en in hoever nieuwe vindingen te verzoenen zijn met de waarderings, wensen en verlangens in de samenleving, de tweede mikt op de aanpassing van die waarderings, wensen en verlangens aan de nieuwe ontwikkelingen die als onvermijdelijk en a-priori als heilzaam worden gepresenteerd? Men hoeft ze niet geheel tegenover elkaar te stellen om toch een accentverschuiving wenselijk te achten.

### Literatuur

E. Beck-Gernsheim, Die soziale Konstruktion des Risikos. In: C. Geyer (Hrsg.), Biopolitik, Frankfurt/M, 2001.

L. Laeyendecker, Wetenschap en ethiek: een moeilijke verhouding. In: Wetenschap en ethiek, Mededelingen van de afd. Letterkunde KNAW, nr. 58, 1996.

Trendanalyse Biotechnologie 2004. Trends in de biotechnologie en hun mogelijke betekenis voor de maatschappij. Gezamenlijke notitie van de CBD, CCMO en COGEM in 2004 (met Achtergrondstudies). Opvraagbaar bij COGEM.



Figuur SWOKA onderzoek Acceptatie genetische modificatie (g.m.) bij dieren. Een meerderheid van in Nederland gepolste burgers vindt g.m. dieren voor medisch onderzoek (zeer) acceptabel, voor cosmetica onderzoek echter zeer onacceptabel. G.m. dieren voor voedselonderzoek vinden ook weinig bijval. Gegevens ontleend aan het SWOKA onderzoek uit 1998 (ministeries LNV en Economische Zaken).

Zoals gezegd heeft de CBD tot taak de overheid te adviseren over vergunningverlening inzake biotechnologische handelingen bij dieren. In Artikel 66 van de GWWD en in paragraaf 3 van de Nota van toelichting bij het BBD wordt duidelijk aan welke handelingen we dan vooral moeten denken. Het gaat om:

1. Het wijzigen van het genetisch materiaal voorbijgaand aan de natuurlijke barrières van geslachtelijke voortplanting en recombinatie (bijvoorbeeld middels recombinant-DNA-technologie);
2. Het toepassen van biotechnologische technieken bij een dier of een embryo (bijvoorbeeld kloneren door celkerntransplantatie);
3. Het rechtsreeks in een dier, bevruchte eicel of embryo inbrengen van genetisch materiaal dat buiten het dier is geprepareerd en het toedienen van aangewezen stoffen die het functioneren van het dier veranderen.

Op deze biotechnologische handelingen is het “nee, tenzij” beleid van toepassing. Ze zijn verboden tenzij er een vergunning voor wordt verleend door de minister van LNV. Zo’n vergunning kan alleen worden verleend als deze handelingen ten eerste geen onaanvaardbare gevolgen voor gezondheid en welzijn van de betreffende dieren met zich meebrengen en er ten tweede geen (andere) ethische bezwaren zijn

Daarover moet de CBD een advies aan de minister uitbrengen. In de Nota van toelichting bij het BBD wordt nader ingegaan op het hoe en waarom daarvan. Aangezien in de samenleving het denken over de ethische (on)aanvaardbaarheid van biotechnologische handelingen bij dieren nog steeds in ontwikkeling is, heeft de commissie de taak toebedeeld gekregen om stapsgewijs, geval voor geval op zoek te gaan naar de grenzen van het aanvaardbare. Dat stap-voor-stap beleid is nodig om uiteindelijk te komen tot het stellen van algemene regels over biotechnologische handelingen bij dieren, waarin de maatschappelijke consensus op dit gebied tot uiting kan komen. Met het oog daarop heeft het toetsen van de vergunningaanvragen mede ten doel: (1) de opheldering en versterking van de morele positie van het dier ten opzichte van de opkomende biotechnologie en (2) de vroegtijdige signalering, formulering en beoordeling van problematische ontwikkelingen.

Hoe gaat zo’n toetsing nu in zijn werk? Als iemand bio-

technologische handelingen bij dieren wil verrichten, moet daarvoor een aanvraag worden ingediend bij het ministerie van LNV. Daarvoor is een vrij uitgebreid aanvraagformulier ontworpen dat voorzien is van een uitvoerige toelichting. Het is uiteraard zo opgesteld dat bij een goede beantwoording van de vragen voldoende gegevens beschikbaar zijn voor een verantwoord besluit inzake het al dan niet verlenen van een vergunning. Natuurlijk gaat het dan om algemene gegevens, zoals bijvoorbeeld de aard, plaats en duur van het onderzoek. Maar het zal geen verbazing wekken dat vooral gefocust wordt op het verkrijgen van precieze informatie over de voorgenomen biotechnologische handelingen, de aantallen te gebruiken dieren, de korte- en langetermijndoelstellingen van het onderzoek en de mogelijke alternatieven om die doelstellingen te bereiken. Verder moet een inschatting gemaakt worden van de mogelijke effecten van de transgenese op gezondheid, welzijn en integriteit van de betrokken dieren en tenslotte dient de onderzoeker een eigen oordeel te geven over de toelaatbaarheid van die handelingen vanuit ethisch perspectief.

Is zo’n aanvraag bij het ministerie van LNV binnengekomen, dan wordt deze met een verzoek om advies naar de CBD gestuurd. Een concept advies moet binnen een termijn van twee maanden opgesteld worden. Op basis daarvan neemt de minister een conceptbesluit. Dat wordt gepubliceerd op de website van het ministerie en het conceptbesluit ligt daar tevens gedurende een maand ter inzage in de bibliotheek. Zodoende kan ieder die dat wil daar kennis van nemen. Wanneer mensen bedenkingen willen uiten, kan dat. Bij voldoende belangstelling wordt op het ministerie een hoorzitting georganiseerd, meestal in aanwezigheid van de onderzoekers die de aanvraag hebben ingediend. Het zijn vooral vertegenwoordigers van maatschappelijke organisaties die opkomen voor de belangen en het welzijn van (proef)dieren, zoals de Dierenbescherming, en soms ook van patiëntenverenigingen die daar aanwezig zijn. Maar er komen ook steeds wel enkele burgers op af. Hoewel de hoorzittingen, zoals het woord aangeeft, bedoeld zijn om aan te horen welke bedenkingen tegen een concept besluit worden ingebracht, ontstaat toch vaak een gesprek of een discussie, meestal met de onderzoekers en soms met de vertegenwoordigers van de CBD en/of het ministerie van LNV.

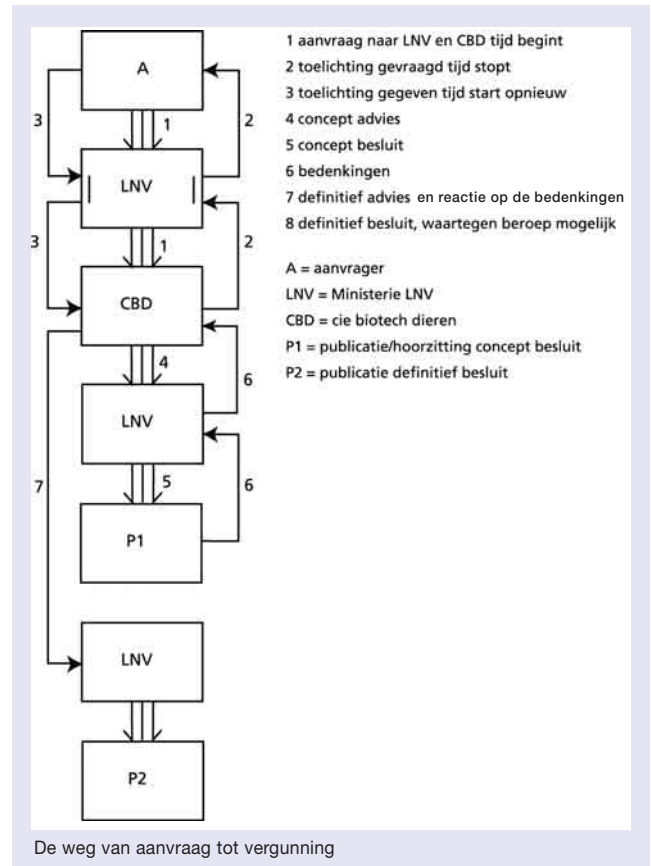
De ingebrachte bedenkingen zijn meestentijds algemeen van aard en keren telkens weer terug. Zo worden vaak



bedenkingen ingediend tegen de manier waarop naar alternatieven voor de betreffende genetische modificatie is gezocht, tegen het oordeel dat een bepaald onderzoek van substantieel belang is en tegen de wijze waarop de CBD haar uiteindelijke afweging maakt. Ook in de hoorzittingen cirkelen de gesprekken rond steeds terugkerende thema's. Wat daaruit duidelijk wordt, is dat er op het punt van de biotechnologie (bij dieren) in onze samenleving sprake is van fundamentele verschillen van inzicht tussen de vergunningverlener en de CBD (waarin de leden overigens ook verschillend denken) enerzijds en de indieners van de bedenkingen anderzijds. En de standpunten lijken in de loop van de tijd niet dichterbij elkaar gekomen te zijn. Het is veeleer zo dat de reactie van de Commissie op eerdere bedenkingen door de indieners ervan vaak wordt aangegrepen om deze bedenkingen een volgende keer aan te scherpen en in enigszins gewijzigde vorm weer in te dienen. Daardoor krijgen de hoorzittingen en het indienen van de bedenkingen min of meer het karakter van een 'rituele dans', waarin het onbehagen van bepaalde groepen in de samenleving over biotechnologische handelingen bij dieren tot uitdrukking komt.

Hoe dit ook moge zijn, met of zonder hoorzitting kunnen bedenkingen worden ingebracht tegen een concept besluit. Deze dienen aan het ministerie te worden toegezonden. Het ministerie legt ze dan weer voor aan de CBD met verzoek om commentaar. De CBD behandelt de bedenkingen in een vergadering en stuurt een met redenen omklede reactie terug naar het ministerie. Soms leiden bedenkingen tot een (meestal kleine) aanpassing van het betreffende advies. Het definitieve advies van de CBD wordt vervolgens naar de minister gestuurd, die dan een definitief besluit neemt. De mogelijkheid staat open daartegen in beroep te gaan, hetgeen zo nu en dan ook gebeurt.

Tot zover de procedure. Maar hoe gaat nu zo'n toetsing door de CBD in zijn werk? In de praktijk wordt door het secretariaat van de CBD een concept advies opgesteld waarover vervolgens in de commissievergadering wordt gediscussieerd. De concept adviezen lijken qua opzet sterk op elkaar. Ze beginnen met een korte inleiding waarin geconstateerd wordt dat er in de betreffende aanvraag inderdaad sprake is van biotechnologische handelingen. Dan volgt een gedeelte waarin zo objectief mogelijk een samenvattende beschrijving wordt gegeven van de aanvraag. In het daarop volgende gedeelte vindt de eigenlijke beoordeling plaats, die uitloopt in een finale



afweging waarin alle voorgaande overwegingen nog eens op een rijtje worden gezet. Tenslotte wordt het advies geformuleerd dat, als het positief uitvalt, meestal aan voorwaarden wordt gebonden.

Deze volgorde bepaalt in veruit de meeste gevallen de gang van de discussie in de commissie. Ook de inhoudelijke beoordeling loopt volgens een bepaald stramien van aandachtspunten. Aangezien deze ethische toetsing elders in dit cahier uitvoerig aan de orde komt, kan ik er hier kort over zijn. De belangrijkste aandachtspunten zijn:

- Vormt het aangevraagde onderzoek een dusdanige eenheid dat het als geheel getoetst kan worden? In het jargon van de CBD: Is er sprake van een 'toetsba-

- re eenheid'? Onderzoekers hoeven namelijk niet voor elk afzonderlijk onderzoek een aanvraag in te dienen. Ze mogen onderzoek clusteren, mits het op een aantal punten vergelijkbaar is. Die punten zijn: doelstelling, te gebruiken techniek(en), te verwachten effecten op gezondheid en welzijn van de betrokken dieren en het al dan niet aanwezig zijn van reële alternatieven. Op grond daarvan stelt de commissie vast of de clustering van onderzoeken als geheel te toetsen is of niet. Is dat niet het geval dan wordt de onderzoekers gevraagd de aanvraag te splitsen in delen die elk wel een toetsbare eenheid vormen. In een enkel geval doet de commissie dat ook wel eens zelf.
- Is de doelstelling van het onderzoek zo belangrijk dat er een reden in gevonden zou kunnen worden om het 'nee tenzij' te veranderen in een 'ja mits'? Er wordt daarbij onderscheid gemaakt tussen de doelstelling op de korte termijn en op de lange termijn, alsook tussen het wetenschappelijk en het maatschappelijk belang ervan. Tot op heden is de ervaring dat de aanvragen vrijwel uitsluitend uit de biomedische hoek komen en dat de doelstellingen dus direct of indirect in zulke termen worden geformuleerd en beargumenteerd.
  - Zijn er alternatieve onderzoeksmethoden om het in de aanvraag gestelde doel te bereiken? Als dat zo zou zijn dan zou het "nee, tenzij" beleid immers betekenen dat eerst volgens zo'n methode gewerkt moet worden.
  - Wat zijn de te verwachten effecten van de biotechnologische handelingen voor de gezondheid en het welzijn van de betrokken dieren? Gezien hetgeen al eerder is gezegd, ligt ook deze vraag voor de hand.
  - Wat zijn de gevolgen voor de integriteit van de gebruikte dieren? Deze vraag hangt direct samen met de aard van de biotechnologische handelingen die worden verricht. Daardoor wordt immers de genetische 'make-up' van dieren doelbewust veranderd. Zij worden met andere woorden door direct menselijk ingrijpen in hun genetische integriteit aangetast.
  - Hoeveel dieren worden gebruikt? Is dat nodig? Om begrijpelijke redenen legt de commissie hier strenge maatstaven aan: zo min mogelijk. Dat kan gezien worden tegen de achtergrond van wat sinds de tweede helft van de vorige eeuw de spelregel van proefdiergebruik is geworden, de al eerder genoemde drie V's: Verminderen, Vervangen (als het kan), Verfijnen (als het dan toch moet). Het zal duidelijk zijn dat ook het bovenstaande aandachtspunt van de mogelijke alternatieven in dit licht gezien moet worden.

- Hoe lang duurt het onderzoek of liever: Voor hoelang zou een eventuele vergunning moeten worden verleend? Veel aanvragen maken deel uit van langlopend onderzoek. In de praktijk geeft de CBD nooit vergunningen af voor langer dan vijf jaar. De argumentatie daarvoor is dat enerzijds de onderzoekers genoeg tijd moeten hebben om de beoogde biotechnologische handelingen te verrichten, hun onderzoek uit te voeren en te publiceren. Anderzijds gaan de ontwikkelingen op het gebied van de gentechnologie snel en kan/zal het zo zijn dat uit onderzoeken nieuwe inzichten voortkomen, misschien ook in methodologisch opzicht. Ook in de samenleving en in de ethiek vinden ontwikkelingen plaats en tenslotte is het in wetenschappelijke kringen gebruikelijk om onderzoek geregeld te evalueren. Een en ander brengt de commissie tot de overtuiging dat een maximum termijn van vijf jaar voor dit soort onderzoek redelijk is.
- In de finale afweging wordt tenslotte, zoals boven al werd gezegd, alles wat de discussie over de voorgaande aandachtspunten heeft opgeleverd nog eens op een rijtje gezet en tegen elkaar afgewogen.

Soms valt een advies negatief uit, maar de meeste zijn positief. Dat wordt de CBD wel kwalijk genomen, want ze zou niet streng genoeg zijn. Daarom is het goed daar even op in te gaan. Dat de meeste adviezen uiteindelijk positief uitvallen, betekent niet dat aanvragen zonder slag of stoot door de commissie komen. Integendeel. Er wordt in de commissie soms langdurig over aanvragen gediscussieerd, wat in sommige gevallen leidt tot een meerderheids- en een minderheidsstandpunt. Maar afgezien daarvan is het zo dat aan de onderzoekers vrijwel altijd nadere (kritische) vragen worden gesteld, soms zelfs meer dan één keer. Niet zelden worden bepaalde onderdelen van een aanvraag niet gehonoreerd of aan beperkingen en voorwaarden gebonden. Een ander punt is het feit dat de aanvragen die bij de commissie binnenkomen uitsluitend uit de biomedische hoek komen. Anders gezegd, ze hebben allemaal direct of indirect betrekking op de gezondheidszorg. Onderzoek op dat terrein kan rekenen op een breed draagvlak in de samenleving, want gezondheid wordt hoog gewaardeerd, en dat weerspiegelt zich in de commissie. Dat neemt overigens niet weg dat binnen de CBD herhaaldelijk gediscussieerd wordt over de vraag of een bepaalde aanvraag nu wel zo'n groot belang op het gebied van de gezondheidszorg behelst dat daar dieren aan moeten worden opgeofferd.

# Genetisch-gemodificeerde dieren onmisbaar voor waardevolle producten

PETER BERTENS EN ROB JANSSEN

*Dr. P.J.A. Bertens is seniorbeleidsmedewerker bij Niaba en drs. R.T.A. Janssen directeur van Niaba, de Nederlandse Biotechnologie Associatie. Niaba behartigt de biotechnologische belangen van alle bedrijven die biotechnologie gebruiken en/of ontwikkelen.*

Genetisch-gemodificeerde dieren zijn onmisbaar bij veel onderzoek naar ziektes, maar ook bij de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen en andere waardevolle producten. Bedrijven zorgen ervoor dat uit de wetenschappelijke kennis waardevolle producten worden ontwikkeld. In Nederland is het overheidsbeleid voor het gebruik van genetisch-gemodificeerde dieren veel strenger dan waar ook ter wereld. Hierdoor lopen onderzoek en productontwikkeling in ons land aanzienlijke vertraging op. Deze vertraging is schadelijk voor de internationale concurrentiepositie van Nederlandse bedrijven. Bedrijven die genetisch-gemodificeerde dieren nodig hebben, zien zich daardoor veelal genoodzaakt hun werk in het buitenland te doen. Met alle schade voor onze economie en werkgelegenheid van dien. Wil Nederland verbetering brengen in deze situatie, dan zal het overheidsbeleid in ons land echt zorgvuldig moeten worden. In de praktijk is het beleid te eenzijdig gericht op het voorkomen van het gebruik van genetisch-gemodificeerde dieren. Zorgvuldig wordt het overheidsbeleid pas als het onderzoek en productontwikkeling niet meer onnodig hindert. Dit betekent niet dat alles mogelijk moet zijn,

maar wel dat genetische modificatie van dieren mogelijk moet zijn als dat een belangrijk maatschappelijk doel dient en er geen haalbare alternatieven zijn.

## Belangrijk wetenschappelijk onderzoek en waardevolle producten

Moderne biotechnologische technieken zoals genetische modificatie van dieren zijn voor de samenleving van groot belang (zie hoofdstuk 2). Wereldwijd spelen genetisch-gemodificeerde dieren een belangrijke rol bij het wetenschappelijk onderzoek naar menselijke ziektes en aandoeningen. Daarnaast spelen deze dieren een belangrijke rol bij het ontwikkelen en testen van geneesmiddelen. Iets waar bedrijven veel geld in moeten investeren en wat bij maar zeer weinig projecten tot succesvolle geneesmiddelen zal leiden. Maar er is meer. Genetisch-gemodificeerde dieren worden sinds enige jaren ook gebruikt voor de productie van nieuwe geneesmiddelen. Op een andere manier kunnen deze geneesmiddelen vaak niet of in onvoldoende grote hoeveelheden gemaakt worden. Buiten Nederland worden genetisch-gemodificeerde dieren ook gebruikt voor niet-medische toepassingen (zie het kader 'Transgenese bij vee en vis' bij hoofdstuk 2). Zo wordt er onderzoek gedaan naar de mogelijkheden om andere stoffen in dieren te produceren, zoals supersterke vezels. Ook vindt onder meer onderzoek plaats naar de verbetering van de ziekteresistentie van landbouwdieren.

In Nederland worden genetisch-gemodificeerde dieren alleen gebruikt in het medisch-wetenschappelijk onderzoek. Een aantal jaren geleden heeft de Nederlandse overheid namelijk strenge wetgeving opgesteld voor het gebruik van dit soort dieren. Hierdoor is bijvoorbeeld het gebruik van genetisch-gemodificeerde dieren voor de productie van geneesmiddelen in ons land zeer moeilijk. Met dit zogenoemde "nee, tenzij" beleid neemt Nederland wereldwijd een uitzonderingspositie in (zie hoofdstuk 3). De meeste andere landen hebben voor een "ja-mits" benadering gekozen, waarbij bedrijven en

wetenschappelijke instellingen meer mogelijkheden hebben.

### **Beschermen en mogelijk maken**

Genetische modificatie van dieren roept vragen en morele afwegingen op. Mogen we alles met dieren doen wat technisch mogelijk is? Natuurlijk niet. Ook bedrijven doen dat niet. Veel bedrijven hebben een eigen ethische code voor het omgaan met proefdieren waaronder genetisch-gemodificeerde dieren. Dieren worden alleen gebruikt als dat echt noodzakelijk is voor het onderzoek naar en de productie van maatschappelijk waardevolle producten. Net als wetenschappelijke instellingen, werken ook bedrijven aan de ontwikkeling van alternatieven voor het gebruik van dieren. In bepaalde gevallen worden dierlijke en menselijke cellen gebruikt voor de productie van geneesmiddelen en vaccins. Ook werken bedrijven aan de verdere ontwikkeling van alternatieve onderzoeks- en productiemethoden om zo het aantal gebruikte dieren terug te brengen. Dit alles met het doel dieren optimaal te beschermen én waardevolle ontwikkelingen mogelijk te maken.

### **Huidige wet- en regelgeving schiet haar doel voorbij**

Zoals elders in dit cahier beschreven, hebben de voortschrijdende ontwikkelingen binnen de biotechnologie geleid tot een heel scala van wetten en regels. Vooral ingegeven door zorgen over de mogelijke risico's en nadelen van de technologie heeft de Nederlandse overheid een heel stelsel van regels ingevoerd. Doel van deze regelgeving was vooral het voorkómen van ongewenste handelingen met dieren. De Nederlandse wetgeving voor het biotechnologische gebruik van dieren is op veel punten strenger dan in andere landen. Zo heeft ons land als enige niet alleen een beoordelingsprocedure voor het gebruik van proefdieren bij medisch onderzoek, maar ook nog eens een aparte vergunningprocedure voor het genetisch veranderen van deze dieren. Inhoudelijk is er tussen beide trajecten een behoorlijke overlap. Dit leidt tot een onnodige verzwarende van administratieve lasten, zowel bij de overheid als bij wetenschappelijke instellingen en bedrijven.

Wat is het effect van deze strenge regelgeving? Ten

eerste wordt het medisch onderzoek in academische ziekenhuizen, universiteiten en wetenschappelijke instituten door de lange termijnen voor vergunningprocedures ernstig vertraagd. Een aantal wetenschappers doet daarom de experimenten met genetisch-gemodificeerde dieren in het buitenland. Daarnaast heeft het “nee, tenzij” beleid ertoe geleid dat bedrijven werkzaamheden met genetisch-veranderde dieren zoveel mogelijk buiten Nederland doen. Voor de Nederlandse bedrijven is de strengere wet- en regelgeving schadelijk voor hun internationale concurrentiepositie. De extra vergunningprocedure leidt tot vertraging in onderzoek, productontwikkeling en marktintroductie. En vertraging kan er bijvoorbeeld toe leiden dat concurrenten eerder een uitvinding kunnen octrooieren of eerder met een product op de markt kunnen komen. Niet zelden komt er helemaal geen product op de markt, omdat bedrijven door het tijdverlies hun investeringen niet meer kunnen terugverdienen en daarom productontwikkeling niet starten of gedwongen stoppen. Voor bedrijven die contractonderzoek doen, betekenen dergelijke vertragingen vaak dat de opdracht voor het onderzoek naar een buitenlandse concurrent gaat. Het “nee, tenzij” beleid gaat dus ten koste van werkgelegenheid en de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen en andere producten in Nederland.

Verder kan de negatieve Nederlandse houding ten opzichte van genetisch-gemodificeerde dieren op langere termijn tot gevolg hebben dat ook de wetenschappers vertrekken naar landen waar dit soort ontwikkelingen wel meer de ruimte krijgen. Zou deze trend doorzetten, dan heeft Nederland op termijn ook de kennis niet meer om nieuwe biotechnologische ontwikkelingen goed op wenselijkheid en veiligheid te beoordelen.

De ontwikkelingen op het gebied van genetisch-gemodificeerde dieren gaan in de rest van de wereld in hoog tempo door. De negatieve Nederlandse houding tegenover het gebruik van deze dieren is nog steeds uniek in de wereld. Deze houding wordt schrijnend nu de eerste producten van genetisch-gemodificeerde dieren de Nederlandse markt bereiken. Zo heeft het Amerikaanse bedrijf GTC Therapeutics een aanvraag gedaan bij de Europese autoriteiten voor toelating van het geneesmiddel ATryn. ATryn is afkomstig uit de melk van genetisch-gemodificeerde geiten. Dit geneesmiddel kan

worden gebruikt bij de behandeling van bepaalde ontstekingen en aangeboren bloedstollingstoornissen. Naar verwachting zal dit middel binnenkort worden goedgekeurd voor gebruik. Nederlandse patiënten kunnen dan in principe ATryn gaan gebruiken. Het is natuurlijk een vreemde zaak dat Nederland het gebruik van genetisch-gemodificeerde dieren bijna onmogelijk maakt, maar vervolgens wel de producten die daaruit voortkomen wil gebruiken. Het is dan ook duidelijk dat we deze inconsequente situatie niet in stand kunnen houden en deze snel moeten veranderen.

Maar wat dan? Het biotechnologische bedrijfsleven is van mening dat wet- en regelgeving er niet alleen is om ongewenste ontwikkelingen en toepassingen te voorkómen. Het overheidsbeleid moet er ook voor zorgen dat de ontwikkeling van waardevolle producten en processen niet onnodig wordt gehinderd. Deze twee aspecten moeten zorgvuldig in balans worden gebracht en gehouden. Echte zorgvuldigheid betekent dus beschermen én mogelijk maken. Om dat te bereiken moeten er verschillende zaken in Nederland veranderen. Als signaal naar wetenschap en bedrijfsleven is het belangrijk de verantwoorde inzet van genetisch-veranderde dieren positief te benaderen. Ook zou de inzet van dit soort dieren toegestaan moeten worden als dit veilig en verantwoord is. Hierbij moet niet alles toegestaan worden; genetische modificatie van dieren moet alleen mogelijk zijn als dat een belangrijk maatschappelijk doel dient en alternatieven niet beschikbaar of niet haalbaar zijn. Daarom is het bedrijfsleven bijvoorbeeld geen voorstander van het gebruik van genetische modificatie bij het fokken van dieren voor gezelschap en sport. Het zou echter te ver gaan om andere zeer waardevolle toepassingen uit te sluiten, vooral waar het gaat om toepassingen die de gezondheid van mens en dier ten goede komen. In andere woorden: het “ja-mits” principe zou het uitgangspunt moeten zijn voor de wet- en regelgeving. Bovendien is het noodzakelijk de doorlooptijd van de Nederlandse vergunningprocedures sterk te bekorten en te vereenvoudigen. Met deze wijzigingen kunnen Nederlandse wetenschappers en bedrijven genetisch-gemodificeerde dieren op een verantwoorde manier inzetten, internationaal blijven concurreren én optimaal bijdragen aan nieuwe kennis en producten. Inmiddels lijkt de Nederlandse politiek die kant op te willen gaan.

## CODE OF CONDUCT AND ANIMAL WELFARE POLICY

### Pharming's code of conduct

1. Pharming will carry out all activities with transgenic animals in a consistent manner, which is at least in conformity with the laws and regulations in force in the countries where we operate. Pharming will address all relevant safety concerns.
2. Pharming will breed and keep transgenic animals in facilities that are specially equipped for such purposes. There will be no release of transgenic animals, nor of their semen into nature.
3. Pharming will take appropriate measures to ensure that only verified distribution of genetic material of the animals involved takes place.
4. Pharming will keep the milk of transgenic animals totally separate from the milk of non-transgenic animals.
5. Pharming will ensure that its products are labeled with and accompanied by product information that is fully transparent, adequate, and honest, showing clear compliance with industry and regulatory standards.

### Pharming's animal welfare policy

Pharming's utilization of animals will be in the interest of human healthcare.

Pharming will avoid products with unacceptable adverse effects on animal health and welfare.

Pharming will adopt all reasonable precautions to prevent such unacceptable adverse effects. In particular, Pharming will develop and apply technologies which ensure that expression of the products is concentrated in animals' milk.

Pharming will terminate projects which, in spite of all precautions, produce unacceptable adverse effects.

Pharming will carefully monitor the health and welfare of all animals in its care.





CBD jaarverslagen

Fotografie: Ronno Tramper

Als we het voorgaande overzien, kunnen we concluderen dat biotechnologie bij dieren in Nederland goed geregeld is. Als je dieren transgeen wilt maken, moeten er forse hordes genomen worden. Maar in de titel van dit hoofdstuk staat tussen haakjes een vraagteken. Wat is de bedoeling daarvan? Wel, in de eerste plaats is het bedoeld om aan te geven dat niet iedereen even gelukkig is met de strenge regelgeving in ons land. Vooral vanuit de hoek van wetenschap en bedrijfsleven klinken kritische geluiden op over de tijdrovende procedures, over het feit dat bij drie instanties een vergunning moet worden aan-

gevraagd, over de gedeeltelijke overlap en over de even zovele belemmeringen in de competitie met het buitenland. Dat laatste brengt ons bij een tweede reden voor het vraagteken in de titel. In het buitenland is de regelgeving vaak (veel) minder streng en dat betekent dat daar dingen mogen op het gebied van biotechnologie die hier waarschijnlijk niet door de toetsing zouden komen. Een voorbeeld daarvan is de GloFish (gloeivis), een aquariumvisje dat door genetische modificatie licht geeft. Er komen dus elders in de wereld producten op de markt die zijn vervaardigd op een manier die wij hier in Nederland

niet goedkeuren. Deze producten zullen vroeg of laat ook bij ons geïmporteerd worden, zeker als mensen er belang bij hebben, bijvoorbeeld in het geval van nieuwe medicijnen. Nederland is geen eiland. Maar dat betekent dat het Nederlandse “nee, tenzij” beleid op den duur de kans loopt links en rechts te worden ingehaald en zodoende een wassen neus dreigt te worden. Daarom is het niet ondenkbaar dat het Nederlandse biotechnologiebeleid bij de volgende evaluatie van het BBD (en dus van het werk van de CBD) in 2005 zal moeten worden heroverwogen. Niet dat het “nee, tenzij” beleid onmiddellijk zal verdwijnen, maar het zou op bepaalde punten wel kunnen worden bijgesteld. Dat is ook mogelijk, want het Nederlandse biotechnologiebeleid is een ‘stap-voor-stap-beleid’, waarin op basis van voortschrijdend inzicht verandering kan worden aangebracht. Het voortschrijdend inzicht kan nader ingekleurd worden door de inmiddels jarenlange ervaring van de CBD.

## Toetsing is niet kosteloos

Het is goed te beseffen dat er aan al dit – door de samenleving gewilde – wikken en wegen van het transgenetisch onderzoek een prijskaartje hangt. Om wat voor bedragen gaat het daarbij? Een grove schatting van de met dit alles gemoeide kosten levert het volgende beeld op. Het eenvoudigst zijn de kosten die de aanvrager per aanvraag moet betalen: € 250,-. Dat lijkt een redelijk bedrag, maar het geeft wel een vertekend beeld. Vooreerst omdat daar bovenop kostbare tijd nodig is om de aanvraag te maken en verderop in de procedure bij te stellen. Al met al mag je deze tijd op een volle werkweek schatten. Wordt vervolgens ook gekeken naar de kosten van de totstandkoming van een advies, dus naar de kosten van CBD en naar die van het maken van een besluit op het ministerie van LNV, dan komen er nog heel andere bedragen om de hoek kijken. Als dit alles meegerekend wordt – en dat ligt voor de hand – zullen de kosten per aanvraag tussen € 15.000 en € 20.000 kunnen liggen. Per jaar gaat het om ongeveer 20 aanvragen. In dit gehele kostenplaatje zijn die kosten, welke met de toetsing door een DEC worden gemaakt, niet meegerekend. Die moeten er nog bij. Al met al gaat het om niet-geringe bedragen.

## Literatuur

CBD Jaarverslagen, m.n. van 1997, waarin enkele interessante bijlagen zijn opgenomen. De Jaarverslagen zijn te bestellen bij het secretariaat van de CBD (Postbus 8359, 3503 RJ Utrecht).

L.E. Paula. Biotechnologie bij dieren ethisch getoetst? Een onderzoek naar het functioneren van het besluit Biotechnologie bij Dieren. Den Haag, Rathenau Instituut 2001 (Werkdocument 84) H.Schellekens e.a. (red.), Medische Biotechnologie. Maarssen (Elsevier Gezondheidszorg) (2001), m.n. deel I.

Trendanalyse Biotechnologie 2004. Trends in de biotechnologie en hun mogelijke betekenis voor de maatschappij. Gezamenlijke notitie van de CBD, CCMO en COGEM in 2004 (met Achtergrondstudies). Opvraagbaar bij de COGEM.





# 4 Biotechnologie bij dieren ethisch getoetst

RONNO TRAMPER

*Drs. R. Tramper (1961) is adjunct-secretaris van de Commissie biotechnologie bij dieren. Hij studeerde theologie aan de Universiteit Utrecht. Sinds 1989 is hij als onderzoeker en docent werkzaam bij het Ethiek Instituut, voorheen het Centrum voor Bio-ethiek en Gezondheidsrecht, van die universiteit. Voor NWO en diverse maatschappelijke organisaties nam hij deel aan de uitvoering van projecten op het terrein van de dier- en natuurethiek, onder andere over de opvang van dieren uit het wild, dierproeven en het beheer van natuurgebieden met grote grazers. Hij is op dit moment tevens lid van diverse dierexperimentencommissies, die tot taak hebben dierproeven ethisch te toetsen.*

Linkerpagina: Genetisch-gemodificeerde zebra-vissen in een aquarium: gloeivisjes.  
Bron: [www.glofish.com](http://www.glofish.com)

## Inleiding: ontstaan van het “nee, tenzij” beleid

In de jaren tachtig en negentig van de vorige eeuw werd in Nederland volop gediscussieerd over genetische modificatie van dieren. In de media doken spraakmakende gevallen op. Soms was dat omdat het goed misging. Bij de varkens van Beltsville (in de Verenigde Staten) was een gen voor het menselijk groeihormoon ingebouwd in het genoom in de hoop dat de vlees-vet verhouding en de groeisnelheid zouden verbeteren. De dieren bleken grote gezondheidsproblemen te hebben. Opschudding ontstond ook in Nederland, toen pakweg tien jaar later, de genetisch-gemodificeerde stier Herman bij het Leidse biotechbedrijf Gene Pharming (later kortweg Pharming) ter wereld kwam. Die opschudding was onder andere het gevolg van het feit dat het raakte aan de kern van een voor Nederland belangrijke economische activiteit, namelijk het fokken en veredelen van runderen en het produceren met runderen. De vrouwelijke nakomelingen van stier Herman zouden, als het goed was, humaan lactoferrine, een ontstekingsremmend hormoon, in hun melk maken. Daartoe was een menselijk gen ingebouwd in het genoom van stier Herman. Het gebruik van een menselijk gen, het gebruik van landbouwhuisdieren en de schimmigheid die aanvankelijk heerste rond de werkelijke doelstelling leidden tot een maatschappelijke discussie. De teneur van die discussie werd al snel dat een absoluut ‘nee’ met betrekking tot biotechnologie bij dieren niet op zijn plaats zou zijn, maar dat wel opgepast diende te worden voor een hellend vlak. Al begin jaren negentig is politiek gezien duidelijk dat er een “nee, tenzij” beleid gaat gelden. Het duurt daarna overigens nog ruim zes jaar voor de Gezondheids- en welzijnswet voor dieren, waarin dit “nee, tenzij” beleid is vastgelegd, op het punt van de biotechnologie bij dieren in werking treedt. Dan wordt de Commissie biotechnologie bij dieren (CBD) ingesteld, die de minister van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit moet gaan adviseren over het verlenen van vergun-

ningen voor biotechnologische handelingen bij dieren. Als in dit artikel over biotechnologie bij dieren gesproken wordt, dan gaat het om het genetisch modificeren van dieren met voorbijgaan aan de grenzen van de natuurlijke voortplanting en om het kloneren van dieren door middel van kerntransplantatie. De wet kent weliswaar nog een aantal andere vergunningplichtige biotechnologische handelingen, maar die komen in de praktijk in Nederland niet voor. Vanaf het moment dat de CBD is ingesteld, wordt geval voor geval bekeken waar de grenzen van het ethisch toelaatbare liggen, als het gaat om biotechnologie bij dieren.

De achterliggende gedachte van het “nee, tenzij” beleid is dat biotechnologie bij dieren moreel problematisch is. Daarmee wordt niet bedoeld dat het moreel verkeerd is, maar dat ethische reflectie noodzakelijk is om meer dui-

delijkheid te krijgen over de toelaatbaarheid ervan. Men meent dat biotechnologie bij dieren problematischer is dan bijvoorbeeld “gewone” dierproeven. Dat is de rechtvaardiging voor het “nee, tenzij” beleid. Wie dieren genetisch wil modificeren moet daarvoor extra goede argumenten hebben. De vraag waarom biotechnologie bij dieren extra problematisch is, is minder eenvoudig te beantwoorden. Het antwoord is uiteindelijk terug te voeren op levensbeschouwelijke overwegingen, zoals de mens-dier relatie en de visie op wat het betekent om het erfelijk materiaal van de dieren te wijzigen. Sommigen zullen wijzen op de overschrijding van soortgrenzen en de aantasting van de scheppingsorde, anderen zullen menen dat de integriteit of het wezen van het dier erdoor wordt aangetast en weer anderen zullen aanvoeren dat we op deze wijze dieren tot instrumenten reduceren.

## Regelgeving buiten Nederland

WIM DE LEEUW EN BART VAN DEN ASSUM

*Drs. W.A. de Leeuw, voormalig accountmanager dierproeven en dierenwelzijn van de Voedsel en Warenautoriteit, ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit (LNV) (thans beleidspool LNV). Ir. J.B.F.C. van den Assum is werkzaam bij het ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit (LNV), directie Voedselkwaliteit en Diergezondheid*

### Inleiding

Instellingen en onderzoekers in de Europese Unie (EU) die dierproeven willen uitvoeren, moeten aan een aantal eisen voldoen. Deze eisen hebben betrekking op de bescherming van proefdieren. Daarnaast moeten in een aantal EU-landen experimenten, waarbij genetisch-gemodificeerde dieren worden vervaardigd of gebruikt en gehouden, vooraf worden beoordeeld op mogelijke risico's voor mens en milieu.

### EU-wetgeving over bescherming proefdieren

In Groot-Brittannië werd al in 1876 specifieke wetgeving van kracht ter bescherming van proefdieren. Hiermee was dit land decennia lang koploper in de wereld. In diverse andere West-Europese landen stond het onderwerp dierproeven weliswaar vanaf het begin van de 20<sup>e</sup> eeuw regelmatig op de politieke agenda, maar specifieke regelgeving werd in de meeste landen pas in de laatste decennia van de vorige eeuw van kracht. Een gemeenschappelijk Europees proefdierbeleid is in de tachtiger jaren van de 20<sup>e</sup> eeuw van de grond gekomen.

In 1986 bracht de Raad van Europa de “Conventie voor de bescherming van gewervelde dieren die voor experimentele en andere wetenschappelijke doeleinden worden gebruikt” (ETS123) uit. Deze Conventie kan worden beschouwd als het Europese moederdocument. Kort daarna werd door de EU een eigen Richtlijn (Dir. 86/609/EEC) opgesteld. Deze Richtlijn “inzake de onderlinge aanpassing van de wettelijke en bestuursrechtelijke bepalingen van de lidstaten betreffende de bescherming van dieren die voor experimentele en andere wetenschappelijke doeleinden worden gebruikt” is grotendeels een kopie van de Conventie ETS123 van de Raad van Europa. Alhoewel

de Richtlijn bepalingen bevat die gericht zijn op de bescherming van proefdieren, is het primaire doel het wegwerken van verschillen tussen de nationale wettelijke bepalingen in de verschillende lidstaten ten aanzien van dierproeven. Deze verschillen kunnen immers een ongunstige weerslag hebben op de werking van de gemeenschappelijke markt.

De EU is in de eerste plaats een economische gemeenschap. Alle EU-lidstaten, dus ook Nederland, zijn verplicht de bepalingen van de Richtlijn op te nemen in hun nationale wetgeving. Als lidstaten dat wensen mogen ze eventueel meer of strengere bepalingen opnemen in hun regelgeving dan op basis van de EU-Richtlijn noodzakelijk zou zijn. Nederland heeft in 1996 de Wet op de dierproeven (Wod) gewijzigd. Bij deze wijziging is de Wod in lijn gebracht met de EU-Richtlijn. In ons land kennen we bovendien het onderscheid tussen het zogenaamde “ja, mits” en het “nee, tenzij” principe (zie het kader op pagina 64).

Daarnaast zijn er nog enkele bepalingen ingevoegd die niet afkomstig zijn uit de EU-richtlijn. Voorbeelden hiervan zijn: de verplichting voorgenomen dierproeven eerst voor te leggen aan een door de Minister erkende Dierexperimenten-commissie (DEC), het verbod op het verrichten van dierproeven voor de ontwikkeling van cosmetica en het verrichten van dierproeven in de vorm van *LD50* of *LC50*. Deze laatstgenoemde groep betreft dierproeven waarbij de giftigheid van stoffen wordt getest door vast te stellen bij welke dosering van de te onderzoeken stof 50% van de dieren waaraan de stof is toegediend sterft. Hoe lager de dosis waarbij 50% van de dieren sterft, hoe giftiger de stof. Aangezien het aantal lidstaten van de EU inmiddels tot 25 is gestegen, heeft deze Richtlijn een grote invloed. De Richtlijn bevat onder meer bepalingen met betrekking tot de goedkeuring van experimenten, de erkenning van instellingen voordat er dierproeven mogen worden uitgevoerd, over de huisvesting en verzorging van proefdieren, de voorwaarden waaraan experimenten moeten voldoen en over het betrekken van dieren. De Richtlijn bepaalt ook, dat wanneer er een alternatief voor de dierproef voorhanden is waarbij geen dieren worden gebruikt, minder dieren worden gebruikt en/of minder ongerief wordt veroorzaakt, de dierproef niet op de oorspronkelijk voorgenomen wijze mag worden uitgevoerd.

## Genetisch-gemodificeerde dieren

In de EU-Richtlijn zijn geen specifieke bepalingen met betrekking tot het maken en het gebruiken van genetisch-gemodificeerde dieren opgenomen. Tot op heden hanteren de lidstaten (met uitzondering van ons land) het standpunt dat het gebruik van genetisch-gemodificeerde dieren voor dierproeven gelijk te stellen is aan het gebruik van ‘gewone’ proefdieren en dat daarom voor het gebruik van genetisch-gemodificeerde dieren in dierproeven geen specifieke bepalingen noodzakelijk zijn. Het maken van en het fokken met genetisch-gemodificeerde dieren wordt alleen gezien als een dierproef, als dit leidt tot ongerief bij de betrokken dieren. Alleen dan zijn de bepalingen van de Richtlijn van toepassing. Men is echter wel van mening dat vooral in de eerste generaties van nieuw gecreëerde genetisch-gemodificeerde dieren een nauwkeurige en frequente observatie van de dieren noodzakelijk is, omdat onverwachte bijeffecten niet kunnen worden uitgesloten.

De Richtlijn bevat geen specifieke bepalingen die betrekking hebben op een ethische toetsing van dierproeven in het algemeen of het maken en gebruiken van genetisch-gemodificeerde dieren in het bijzonder. Op dit moment vindt er in de meeste lidstaten wel een ethische toetsing van dierproeven plaats, maar de wijze waarop die ethische toetsing plaatsvindt en de juridische status ervan verschilt sterk tussen lidstaten. Bovendien is deze toetsing niet altijd verplicht.

Nederland is dus het enige land in de EU met een vergunningplicht voor genetische modificatie van dieren en embryo's van dieren, waarbij aanvragen worden getoetst op ethische aanvaardbaarheid. Aanvragen worden beoordeeld op grond van het zogenaamde “Nee, tenzij” principe. De minister van LNV geeft alleen een vergunning als de genetische modificatie geen onaanvaardbare gevolgen heeft voor het welzijn of de gezondheid van het dier, en er geen doorslaggevende ethische bezwaren bestaan tegen de genetische modificatie.

De Commissie biotechnologie bij dieren (CBD) beoordeelt aanvragen voor een vergunning, en geeft advies aan de minister van LNV over het al of niet verlenen van een vergunning. De CBD geeft alleen een positief advies als het doel van het onderzoek van substantieel maatschappelijk belang is, er geen reële alternatieven



voor de genetische modificatie zijn, en het belang van het onderzoek opweegt tegen de mogelijke schade die de dieren ondervinden van de genetische modificatie. Deze vergunningplicht is vastgelegd in de Gezondheids- en Welzijnswet voor dieren (Gwwd). De procedure voor vergunningverlening duurt 6 maanden en biedt ruime mogelijkheden aan burgers en organisaties om hun zienswijze in te brengen (zie ook hoofdstuk 3).

Met name door het ontbreken van deze publieke consultatie is de procedure voor het verkrijgen van toestemming om genetisch-gemodificeerde dieren te vervaardigen in Duitsland, het Verenigd Koninkrijk en Frankrijk beduidend korter. De lengte van de procedure varieert in deze landen van 2 tot 8 weken.

### Ja, mits / Nee, tenzij

De beoordeling op grond van het “nee, tenzij” principe verschilt wezenlijk van de beoordeling op grond van het “ja, mits” principe, zoals dat wordt toegepast bij de beoordeling van genetische modificatie van planten. Op grond van het “ja, mits” principe wordt genetische modificatie toegestaan, als dit geen onaanvaardbaar risico oplevert voor mens en milieu. Bij deze beoordeling vindt dus geen afweging plaats van het belang van het doel van het onderzoek. Ook de aan- of afwezigheid van reële alternatieven voor het onderzoek wordt niet in de beoordeling betrokken.

### Import van genetisch-gemodificeerde dieren

Onderzoekers die genetisch-gemodificeerde proefdieren willen importeren in Nederland, hebben geen vergunning nodig van de minister van LNV op grond van de Gezondheids- en welzijnswet voor dieren. Deze vergunningplicht is immers beperkt tot het verrichten van biotechnologische handelingen bij dieren in Nederland. Onderzoekers die in Nederland onderzoek willen doen met geïmporteerde genetisch-gemodificeerde proefdieren moeten zich wel houden aan de regels uit de Wet op de dierproeven en het Besluit GGO (zie de laatste paragraaf).

### Wijziging richtlijn

Sinds het van kracht worden van de Richtlijn is in Europa het denken over het verrichten van dierproeven en de bescherming van proefdieren niet stil blijven staan. Vanuit de huidige zienswijzen geredeneerd, wordt de bestaande Richtlijn als incompleet gezien. Daarom is inmiddels een begin gemaakt met een wijziging van de eerdergenoemde Richtlijn 86/609/EEC. In de gewijzigde Richtlijn zullen in ieder geval bepalingen worden opgenomen met betrekking tot de ethische toetsing en goedkeuring van alle dierproeven. Tevens zal meer informatie worden opgenomen over de reikwijdte van de Richtlijn en zullen onder meer extra bepalingen worden opgenomen over het toezicht op de naleving van de wetgeving en het betrekken van dieren. Het is vooralsnog onduidelijk of er in de herziene Richtlijn specifieke bepalingen met betrekking tot het genereren en gebruik van genetisch-gemodificeerde dieren worden opgenomen. Het lijkt er op dat, gezien de uiteenlopende wijzen waarop met dit onderwerp wordt omgegaan in de verschillende lidstaten, de Europese Commissie en diverse lidstaten bij de herziening op dit punt erg terughoudend zullen zijn.

### Ingeperkt gebruik genetisch-gemodificeerde dieren

Genetisch-gemodificeerde dieren worden in laboratoria vervaardigd. Dit gebeurt onder andere door de techniek van micro-injectie. Daarbij wordt een gen dat men wil inbrengen geïnjecteerd in bevruchte eicellen (zie hoofdstuk 1). In een aantal lidstaten van de Europese Unie is voor deze handeling een milieuvergunning nodig. In zo'n vergunning kunnen specifieke inperkingsmaatregelen worden gesteld om het contact van het betreffende genetisch-gemodificeerde dier met de buitenwereld te beperken. Zo worden er eisen gesteld aan de inrichting van het laboratorium en werkvoorschriften verplicht, die het risico van contact met de buitenwereld inperken.

Basis voor deze regelgeving is *Richtlijn 98/81/EG* inzake het ingeperkt gebruik van genetisch-gemodificeerde organismen. Nederland heeft deze richtlijn geïmplementeerd in het zogenoemde *Besluit GGO*.

## De ethische toetsing in de regelgeving

Voor het maken van genetisch-gemodificeerde dieren geldt dus in Nederland een “nee, tenzij” beleid. Wil de Commissie biotechnologie bij dieren adviseren om vergunning te verlenen, dan dient volgens de wet aan twee voorwaarden voldaan te zijn: 1. er mogen geen onaanvaardbare gevolgen zijn voor de gezondheid en het welzijn van de dieren en 2. er mogen geen ethische bezwaren bestaan tegen de handelingen. In feite komt het erop neer dat de wet een ethische toetsing voorschrijft. Die ethische toetsing heeft als direct doel het adviseren over vergunningverlening in concrete gevallen. De nota van toelichting bij het Besluit biotechnologie bij dieren specificeert daarnaast nog een aantal andere, meer algemene doelen. De eerste is om stap voor stap te komen tot algemene regels die aangeven wat wel en niet ethisch toelaatbaar is als het gaat om biotechnologie bij dieren. Ten tweede dient de toetsing te leiden tot een verheldering en versterking van de morele positie van het dier ten opzichte van de opkomende biotechnologie en ten derde moet de toetsing bijdragen aan een vroegtijdige signalering van problematische ontwikkelingen ten behoeve van de publieke discussie over biotechnologie bij dieren.

## Het ethische toetsingskader

De regelgeving is niet erg duidelijk over de concrete vorm die de ethische toetsing zou moeten krijgen. Er staat eigenlijk niet veel meer dan dat er geen ethische bezwaren mogen zijn. Opvallend is ook dat de wet apart vermeldt dat er geen onaanvaardbare gevolgen voor gezondheid en welzijn van de dieren op mogen treden. Alsof het optreden van onaanvaardbare gevolgen voor gezondheid en welzijn geen ethisch bezwaar zou zijn. Het illustreert dat men op dat moment nog geen duidelijk beeld had van wat ethische bezwaren zouden kunnen zijn. En dit terwijl de toen ook net van kracht geworden nieuwe versie van de Wet op de dierproeven (1996) voorschrijft dat een dierexperimentencommissie (DEC) bij elke dierproef dient te toetsen of het belang van het doel van de proef opweegt tegen het ongerief voor de dieren. Deze toets werd algemeen als een ethische toets beschouwd.

Eén van de eerste dingen die de CBD bij haar aantreden deed, was een werkgroep van gerenommeerde ethici samenstellen, die de Commissie zou moeten helpen bij het opstellen van een ethisch toetsingskader. Het resulterende toetsingskader kent vijf stappen en wordt met

enkele kleine aanpassingen nog steeds door de Commissie gehanteerd. De gedachte achter het toetsingskader is, kort gezegd, dat er geen doorslaggevende ethische bezwaren zijn, indien een vergunningaanvraag ongeschonden de confrontatie met het toetsingskader doorstaat.

De vijf stappen van het ethische toetsingskader zijn stuk voor stuk “nee, tenzij” stappen. Komt een aanvraag niet over de horde, dan wordt eenvoudigweg negatief geadviseerd. Het zetten van de volgende stappen is niet eens meer nodig. Bij de eerste stap wordt getoetst of het om onderzoek met een substantieel belang voor mensen gaat. Bij de tweede stap is de vraag of er alternatieven, waarbij geen biotechnologie bij dieren nodig is, beschikbaar zijn. Bij stap drie wordt onderzocht hoeveel schade aan gezondheid en welzijn van de dieren zal optreden en of die schade onaanvaardbaar groot is. Bij stap 4 van het toetsingskader wordt onderzocht in hoeverre de integriteit van het dier wordt aangetast door de biotechnologische handelingen en of die aantasting onaanvaardbaar is. Bij stap vijf, tenslotte, wordt gekeken of het belang van het onderzoek opweegt tegen de aantasting van de gezondheid en het welzijn en van de integriteit. Zie ook het bijgevoegde schema op pagina 66.

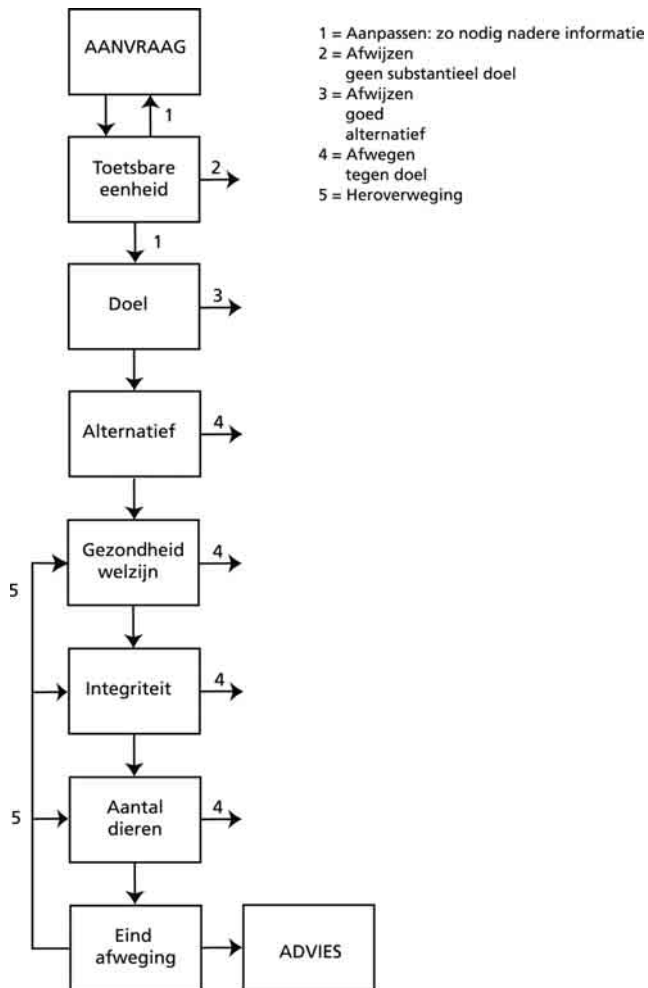
De afzonderlijke stappen vragen natuurlijk om een nadere toelichting. Met name zal duidelijk moeten worden gemaakt hoe de CBD dit toetsingskader toepast op individuele aanvragen. Dat zal ik in de volgende paragrafen doen.

## De toepassing van het toetsingskader

### *Stap 1 De doelstelling*

Het uitgangspunt van de ethische toetsing is dat biotechnologische handelingen bij dieren extra moreel problematisch zijn, problematischer dan gewone dierproeven. Dan ligt het dus ook voor de hand om te stellen dat dergelijke handelingen een speciale rechtvaardiging vragen. Om die reden wordt in de eerste stap van het toetsingskader de eis gesteld dat de doelstelling van het onderzoek van substantieel belang dient te zijn. Bij gewone dierproeven is elk menselijk belang in principe een voldoende rechtvaardiging, als dit maar opweegt tegen de schade voor de dieren. Daar geldt een “ja, mits” benadering, in tegenstelling tot het “nee, tenzij” bij biotechnologie. Bij biotechnologie bij dieren is niet elk triviaal menselijk belang vol-





Het ethische toetsingskader in 5 stappen.

doende, ook al weegt dat belang misschien op tegen de schade voor de dieren. Een goed voorbeeld daarvan vormt de GloFish die recent in de media opschudding veroorzaakte. Het ging om een genetisch-gemodificeerde zebra vis die oplicht in het donker, doordat er een gen van een kwal was toegevoegd aan het genoom van het dier. Deze vis was gemaakt voor wetenschappelijk onderzoek,

maar iemand had bedacht dat ook aquariumbezitters er vast wel belangstelling voor zouden hebben. De Commissie biotechnologie bij dieren zou er vrij snel uit geweest zijn. Als iemand een vergunningaanvraag had ingediend om in Nederland gloeivisjes te mogen maken, dan zou de Commissie ongetwijfeld geadviseerd hebben geen vergunning te verlenen. Er is weliswaar een belang, namelijk het plezier dat de aquariumbezitters beleven aan deze bijzondere vis. Verder is de schade voor de dieren nihil, zodat het belang zonder meer opweegt tegen de schade voor de dieren. Het betreft echter geen substantieel belang.

Potentiële vergunningaanvragers zijn op de hoogte van het ethische toetsingskader dat de Commissie biotechnologie bij dieren hanteert. Het komt dus zelden voor dat er een aanvraag wordt ingediend voor onderzoek dat niet van substantieel belang is. Eigenlijk kan gezegd worden dat vrijwel alle vergunningaanvragen betrekking hebben op biomedisch onderzoek. Het gaat ofwel om fundamenteel onderzoek in de hoop dat dit informatie oplevert die uiteindelijk gebruikt kan worden voor het ontwikkelen van nieuwe therapieën, ofwel om toegepast medisch onderzoek, zoals het maken van ziektemodellen waarop nieuwe behandelingen kunnen worden getest. De eerste aanvraag voor andersoortige doelstellingen die van substantieel belang zouden kunnen zijn, bijvoorbeeld het maken van landbouwhuisdieren die beter bestand zijn tegen de ziekten die de afgelopen jaren voor zoveel opschudding hebben gezorgd, moet nog komen.

Daarmee lijkt de Commissie het eenvoudig te hebben, want dit soort biomedisch onderzoek is toch altijd van substantieel belang? Zo eenvoudig ligt het echter niet. Soms lijkt het uiteindelijke doel van een onderzoek wel erg ver verwijderd van het concrete onderzoek dat hier en nu uitgevoerd gaat worden. Een goed voorbeeld daarvan is ontwikkelingsbiologisch onderzoek met genetisch-gemodificeerde muizen. Simpel gezegd wordt in dergelijk onderzoek gekeken wat de rol is van verschillende genen bij de ontwikkeling van een embryo tot een volgroeide muis. Het gaat uitsluitend om het verwerven van interessante kennis. Bekend is echter dat genen die een rol spelen in de ontwikkeling van het embryo later in het leven kunnen bijdragen aan het ontstaan van kanker. Er zijn ook voldoende voorbeelden van ontwikkelingsbiologisch onderzoek dat belangrijke informatie heeft opgeleverd over kanker. De Commissie biotechnologie bij dieren

staat dan voor de vraag of het verwerven van interessante kennis op zichzelf een substantieel belang vormt. Daarnaast dient de vraag beantwoord te worden of het feit dat dit soort onderzoek relatief vaak informatie oplevert over ernstige ziekten bij de mens, mee mag tellen bij het bepalen van het belang ervan. Het is immers niet de bedoeling, en ook absoluut niet zeker, dat dergelijke informatie uit het onderzoek voort zal komen.

Een andere vraag die men zich zou kunnen stellen is of onderzoek naar een ernstige ziekte wel van substantieel belang is, als blijkt dat er maar weinig mensen aan die ziekte (over)lijden. Wij hebben allemaal toch op zijn minst de intuïtie dat onderzoek naar hart -en vaatziekten (veel patiënten en veel doden) belangrijker is dan onderzoek naar een ziekte die maar heel weinig voorkomt en die wel invaliderend, maar niet direct dodelijk is. Moeten we de enkele mensen die aan die ziekte lijden dan maar meedelen dat een kans op verbetering van hun situatie niet belangrijk genoeg is om het genetisch veranderen van dieren te rechtvaardigen?

De conclusie is dat het binnen een “nee, tenzij” beleid op zichzelf terecht is om te eisen dat een onderzoek een substantieel doel dient, maar dat het niet altijd eenvoudig is om te bepalen wanneer gesproken kan worden van een substantieel doel, zelfs niet als het gaat om biomedisch onderzoek.

### *Stap 2 Alternatieven*

Als is vastgesteld dat het onderzoek een substantieel doel dient, dan is de volgende stap je af te vragen of dit doel ook op een andere manier gerealiseerd kan worden. Ook dit is binnen een “nee, tenzij” beleid een volstrekt logische stap. Als biotechnologische handelingen bij dieren ethisch problematisch zijn en er is een minder problematische methode voorhanden om hetzelfde te bereiken, dan is het ethisch niet toelaatbaar om toch gebruik te maken van biotechnologische handelingen. Daarnaast wordt onder een minder problematische methode ook verstaan het genetisch modificeren van “lagere” diersoorten. De wet maakt weliswaar geen onderscheid tussen lagere en hogere diersoorten, maar de Commissie meende toch dat het genetisch modificeren van *C. elegans*, een zeer kleine worm, minder problematisch is dan het genetisch modificeren van bijvoorbeeld een muis. Een van de redenen die de Commissie daarvoor heeft, is dat bij deze lagere dieren eigenlijk niet op een zinvolle

wijze over schade aan gezondheid en welzijn gesproken kan worden.

De eenvoud van de onderliggende logica staat in schril contrast met de praktische problemen die opdoemen bij het beantwoorden van de vraag of er een goed alternatief beschikbaar is. Daarvoor is niet alleen technische kennis nodig, maar vooral ook filosofisch denken. Het gaat in dit geval om een alternatieve methode waarmee hetzelfde doel bereikt zou kunnen worden. Er moet dus allereerst duidelijkheid zijn over de vraag wat redelijkerwijs als doelstelling van het onderzoek kan worden opgevat. Als de onderzoeker zijn doelstelling formuleert als “onderzoek doen naar ziekte X in een transgeen diermodel”, dan is er vanzelfsprekend geen alternatief zonder biotechnologische handelingen beschikbaar. Het op die manier krap formuleren van de doelstelling is dan ook meestal niet erg redelijk. De onderzoeker wil inzicht verwerven in het ontstaan en verloop van ziekte X. Dat kan in een transgeen diermodel, maar er zijn misschien wel andere methoden om dezelfde inzichten te verwerven. Op dezelfde manier is het niet erg redelijk om de doelstelling te ruim te formuleren. Zo zou een dierenbeschermmer naar voren kunnen brengen dat de onderzoeker uiteindelijk als doel heeft om levens van mensen te redden. Als de onderzoeker badmeester of brandweerman wordt, kan hij ook levens redden en dus is er een alternatief voor zijn onderzoek, gaat dan de redenering verder. Het is dus van belang om een redelijke overeenstemming te bereiken over de vraag hoe het doel dient te worden geformuleerd en dan te kijken of er een alternatief beschikbaar is.

Het is bij het formuleren van een doelstelling waarvoor een alternatieve methode wordt gezocht, ook van belang om fair te zijn. Zeer specialistisch fundamenteel onderzoek kan natuurlijk best kennis opleveren die bijdraagt aan het vinden van nieuwe behandelingen tegen kanker. Op grond daarvan wordt aan dergelijk onderzoek een substantieel belang toegeschreven. Als het bij het bepalen van het belang van het onderzoek acceptabel wordt gevonden een redelijk vergezochte doelstelling te hantieren, dan is het natuurlijk wat vreemd om bij het beantwoorden van de vraag of er alternatieven zijn, niet verder te kijken dan de neus lang is.

Daarmee zijn we er echter nog niet. Er is namelijk altijd wel een mogelijk alternatief te bedenken. Als de wetenschap over vijftig jaar ver genoeg is, hebben we mis-

schien helemaal geen dieren meer nodig voor onderzoek. Daarop wachten is in principe ook een alternatief. Daarvoor moet echter een prijs betaald worden. We komen dan vijftig jaar lang niet veel verder met onze kennis over ziekten en gebreken. Die prijs zal vrijwel ieder-



Foto boven: De Columba Livia, het oorspronkelijke ras.  
Foto onder: Een gefokt ras, de Oud Hollandse Tuimelaar, met geveerde poten.  
Bron (foto onder): Oud Hollandse Tuimelaarsclub

een te hoog vinden. Wat ook zou kunnen gebeuren, is dat het onderzoek verdwijnt naar het buitenland, waar geen “nee, tenzij” beleid geldt. De dieren schieten daar weinig mee op en het heeft allerlei ongewenste neveneffecten, zoals het verdwijnen van kennis en expertise uit Nederland.

De vraag is natuurlijk waar de grens ligt. Wanneer is de prijs die voor een alternatief betaald moet worden nog aanvaardbaar? Stel dat een alternatief zonder dieren een flinke aanslag doet op het budget van een kankeronderzoeker. Deze heeft daardoor geen 200.000 euro per jaar nodig, maar 300.000. Voor het extra geld moet hij aankloppen bij het Koningin Wilhelmina Fonds dat zijn kankeronderzoek financiert. Dat is geld dat met veel moeite door vrijwilligers is opgehaald en nuttig gebruikt had kunnen worden voor ander onderzoek. Moeten we dat maar op de koop toenemen? Of is die prijs te hoog?

We hebben het niet alleen over prijzen in geld. Soms is er een alternatief mogelijk waarbij menselijke vrijwilligers gebruikt worden. Stel nu dat deze mensen een relatief groot risico lopen en stel dat je desondanks vrijwilligers vindt, dan is het nog steeds de vraag of je humane vrijwilligers een dergelijk groot risico mag laten lopen. Een alternatief kan dus ook een ethische prijs hebben.

Tot slot wil ik nog wijzen op het feit dat biotechnologie bij dieren vaak zelf gezien kan worden als een alternatief voor veel ingrijpender (pijnlijker) dierproeven. Door met genetisch-gemodificeerde dieren te werken kan men dierproeven vaak met minder dieren, met minder leed voor de dieren en bovendien veel betrouwbaarder uitvoeren. Dan is er misschien wel een alternatief, namelijk werken met gewone, niet-transgene dieren, maar voor dat alternatief moet de prijs betaald worden dat er meer dieren meer leed wordt aangedaan en de resultaten minder betrouwbaar zijn. Ook dat is een prijs die de meeste van ons niet zullen willen betalen.

Samenvattend kan gezegd worden dat bij de zoektocht naar alternatieven niet alleen technische kennis vereist is, maar ook het vermogen om goed af te wegen wanneer een mogelijk alternatief aangemerkt kan worden als reëel en redelijk.

*Stap 3 Schade aan gezondheid en welzijn*  
Als genetische modificatie van een dier leidt tot schade

aan gezondheid en welzijn van dat dier, dan is dat een ethisch bezwaar. Is die schade onaanvaardbaar groot, dan is er binnen een “nee, tenzij” beleid geen andere mogelijkheid dan te zeggen dat de modificatie niet toelaatbaar is. Zo staat het ook geformuleerd in het toetsingskader.

De vraag is echter wat met onaanvaardbaar bedoeld wordt. De Commissie was er al snel van overtuigd dat het eigenlijk altijd om schade moet gaan die onaanvaardbaar is in het licht van de doelstelling. Het is natuurlijk best denkbaar dat je genetisch-gemodificeerde dieren kunt maken die er zo slecht aan toe zijn dat het onaanvaardbaar is, voor welk doel dan ook. De Commissie kon echter geen praktische voorbeelden bedenken van onderzoek waarvoor het zinvol zou zijn om dergelijke dieren te maken. In de praktijk zal de vraag dus altijd zijn of de schade aan gezondheid en welzijn aanvaardbaar is in het licht van het belang van de doelstelling. Het gaat dus om een “aanvaardbaar alles afgewogen”.

Voor het maken van die afweging is het noodzakelijk vooraf een goede inschatting te maken van de gevolgen voor gezondheid en welzijn. Een groot probleem daarbij is de onzekerheid die inherent is aan wetenschappelijk onderzoek. Vaak worden genetisch-gemodificeerde dieren gemaakt om meer inzicht te verkrijgen in de rol van bepaalde genen bij processen in de cel. De rol van die genen is nog niet precies bekend en dus valt vooraf ook niet met zekerheid te zeggen wat er zal gebeuren als die genen bijvoorbeeld worden uitgeschakeld. Een redelijke benadering lijkt dan om verschillende scenario's te maken en vervolgens uit te gaan van de schade die in het ergste geval op zou kunnen treden. Dat is dan de ergste schade in het licht van wat we nu weten. Er is weliswaar altijd een zeer kleine kans dat het echt helemaal fout gaat, maar in de uiteindelijke afweging altijd rekening houden met een “rampscenario” lijkt niet redelijk. Dat zou immers ertoe leiden dat er niets meer kan.

Juist omdat het vooraf inschatten van de schade moeilijk is, adviseert de Commissie altijd om de onderzoeker twee voorwaarden op te leggen. Hij moet een welzijnsdagboek bijhouden, zodat in de loop der jaren meer inzicht ontstaat in het optreden van onverwachte schade en hij dient het experiment te beëindigen (in de praktijk betekent dat de dieren doden) als er onvoorzien ernstig ongerief optreedt, zodat de schade in elk geval van korte duur is.

#### *Stap 4 Aantasting van de integriteit*

De wet stelt als eis dat er geen ethische bezwaren tegen de biotechnologische handelingen mogen bestaan. Een van de specifieke kenmerken van het verzet tegen biotechnologie bij dieren is dat de bezwaren van mensen zich niet uitsluitend richten tegen de schade aan de gezondheid en het welzijn van de dieren. De term “integriteit” is geïntroduceerd in een poging om die min of meer intuïtief gevoelde ethische bezwaren onder woorden te brengen. Er is op zichzelf helemaal niets tegen intuïtief gevoelde ethische bezwaren. Dergelijke morele intuïties vormen een belangrijk signaal dat er wel eens iets niet in de haak zou kunnen zijn. Een van de belangrijkste functies van ethische reflectie is om die morele intuïties onder de loep te nemen en te onderzoeken of we ze kunnen vertrouwen. Het is dus zaak om niet alleen de term integriteit te introduceren, maar daar ook zodanig inhoud aan te geven dat men zich erin herkent.

Het wijzigen van het erfelijk materiaal van het dier onder voorbijgaan aan de natuurlijke voortplanting wordt gezien als een aantasting van diens integriteit. Maar wat betekent dat? Kun je dat ergens aan zien? En, zo ja, waaraan dan? En, niet te vergeten, waarom is het erg dat er iets aangetast wordt als het dier er zelf niets van merkt? Een goede eerste stap is om uit te gaan van datgene wat een dier tot een typisch exemplaar van zijn soort maakt. Dat wat een varken tot een varken maakt en een muis tot een muis. Dan gaat het om zaken als uiterlijk, gedrag en het vermogen van het dier om zichzelf te redden in voor de soort geëigende omstandigheden. Het schrikbeeld van de mensen is dat onderzoekers een muis zullen maken die zo groot is als een hond, die licht geeft in het donker, buitengewoon agressief is en bovendien de intelligentie heeft van een zwakbegaafde mens. Dat is geen muis meer. Het gaat me niet zozeer om het feit dat dit een zeer gevaarlijk dier is en dat het alleen al om die reden ethisch bezwaarlijk is om een dergelijk genetisch-gemodificeerd dier te maken, als het al zou kunnen. Waar het me om gaat is dat de weerzin tegen het maken van dergelijke “monsters” en “misbaksels” waarschijnlijk een van de factoren is die aan de basis liggen van de intuïtief gevoelde ethische bezwaren. Het creëren van “monsters” en “misbaksels” is overigens geen nieuw probleem dat pas zijn intrede heeft gedaan met de moderne biotechnologie. Ook door fokken en veredelen zijn door de eeuwen heen nieuwe dierenrassen gecreëerd. Die voldoen wel aan bepaalde esthetische of praktische wensen van



Door fokken verkregen rassen; van wolf naar bulldog

de mens, maar zijn qua uiterlijk, gedrag en zelfredzaamheid vaak ernstig aangetast. De kenmerken uiterlijk, gedrag en zelfredzaamheid zijn niet toevallig gekozen als criterium voor de mate van aantasting van de integriteit. Men had reeds enige ervaring op dit punt.

Het maken van “monsters” met behulp van biotechnologie komt in de praktijk eigenlijk niet voor. Een heel enkele keer gebeurt het dat er, meestal ongewild, een “misbaksel” ter wereld komt, bijvoorbeeld een dier dat niet levensvatbaar is vanwege misvormingen of fouten in de aanleg van organen. In die gevallen waarin men er bewust naar streeft om middels genetische modificatie fouten te veroorzaken tijdens de embryonale ontwikkeling, zal de onderzoeker vrijwel altijd de dieren bestuderen in een embryonaal stadium. De meeste integriteitsaantastingen betreffen juist zaken waar het dier zelf niets van merkt. Het uiterlijk van het dier verandert enigszins, de weerstand tegen ziekten vermindert (wat geen probleem is zolang je het dier maar in een omgeving houdt die vrij is van ziektekiemen), of de levensduur wordt korter. In al die gevallen is het zeer de vraag of het dier daar iets van merkt. Dan komt natuurlijk vanzelf de vraag op waarom het dan toch ethisch bezwaarlijk zou zijn. De gedachte dat een aantasting van het dier alleen ethisch relevant is als het dier er iets van merkt, berust op een keuze voor een bepaalde opvatting van wat er moreel gezien toe doet. In dit geval is dat een keuze voor een



(utilistische) ethische theorie die stelt dat alleen de gevolgen van je handelen in termen van leed en geluk voor alle betrokkenen er moreel gezien toe doen. Een dergelijke keuze spreekt niet vanzelf en is ook niet moreel neutraal.

De problematiek van een integriteitsaantasting is daarnaast niet zozeer gelegen in de effecten, maar zeker ook in de intentie waarmee het gedaan wordt. Het is de intentie om een dier aan te passen aan onze wensen en het dier als een instrument te gebruiken die het ethisch problematisch maakt. Het amputeren van de staart van een hond vanwege een ernstige wond aan die staart is ethisch niet problematisch. Het uiterlijk van de hond verandert, maar een integriteitsaantasting zou ik het niet willen noemen. Als we echter de staart en de oren van een hond inkorten om cosmetische redenen, dan kan dat wel als een aantasting van de integriteit beschouwd worden. Het dier wordt verminkt, niet omdat het daar zelf wat aan heeft, maar omdat wij denken daar wat aan te hebben. Het getuigt dan van een gebrek aan respect voor dieren. De intenties waarmee bepaalde handelingen verricht worden zeggen ook iets over de morele kwaliteit van onze handelingen.

Ook is naar voren gebracht dat het bij een integriteitsaantasting gaat om een aantasting van kenmerken en eigen-



## Intrinsieke waarde en integriteit

Uitgangspunt van vrijwel alle wetgeving in Nederland met betrekking tot de omgang van mensen met dieren, is de erkenning van de intrinsieke waarde van het dier. Zowel de Wet op de dierproeven als de Gezondheids- en welzijnswet voor dieren noemen dit expliciet. Intrinsieke waarde is niet hetzelfde als integriteit. Met de uitspraak dat dieren intrinsieke waarde hebben, wordt enerzijds bedoeld dat dieren een eigen goed hebben. Van dieren kun je zeggen dat ze het goed doen, dat ze floreren. Dieren kunnen, met andere woorden, belangen hebben en die belangen doen er moreel gezien toe. Anderzijds wordt er ook mee bedoeld dat dieren, juist omdat ze een eigen goed hebben, niet uitsluitend een instrumentele waarde hebben. Erkenning van de intrinsieke waarde van een dier sluit dus uit dat men een dier puur als een instrument beschouwt, als een ding dat eenvoudigweg kan worden omgebouwd tot iets dat de mens van nut is. Dat is een kwestie van respect voor dieren. Er dient altijd ook rekening gehouden te worden met het eigen goed van dieren. Een andere manier om dit aan te duiden, is te zeggen dat dieren moreel relevant zijn. We

rekenen ze tot de kring van organismen die moreel gezien meetellen.

Uit de erkenning van de intrinsieke waarde van dieren volgt daarom dat wij morele verplichtingen ten opzichte van dieren kunnen hebben. Wat overigens nog niet wil zeggen dat wij ten opzichte van dieren exact dezelfde verplichtingen hebben als ten opzichte van mensen. Voorzover dieren van mensen verschillen kunnen we ook verschillende verplichtingen hebben ten opzichte van dieren. Die verplichtingen vloeien voort uit morele regels en principes. Twee morele principes nemen een centrale plaats in in de dierethiek: “niet schaden” en “respect voor integriteit”. Die principes krijgen handen en voeten in de derde en de vierde stap van het ethische toetsingskader van de Commissie biotechnologie bij dieren. Kortom: erkenning van de intrinsieke waarde houdt in dat dieren moreel gezien meetellen en dat wij morele verplichtingen ten opzichte van dieren kunnen hebben. Morele principes, zoals het principe van respect voor integriteit, geven aan om wat voor een soort verplichtingen het gaat.

schappen die het dier nodig heeft om in wisselende omstandigheden welzijn te verwerven of te behouden. Het gaat bij integriteit niet om welzijn, maar om mogelijkheden voor welzijn. In normale omstandigheden heeft een dier een goed functionerend immuunsysteem nodig om gezond te blijven. Dat een dier met een verzwakt immuunsysteem in een laboratorium in ziektekiemvrije omstandigheden gehouden wordt, doet dan niet ter zake. Deze benadering geeft weliswaar een (andere) interpretatie van wat onder een aantasting van de integriteit verstaan dient te worden, maar geeft niet echt aan waarom een dergelijke aantasting problematisch zou zijn als het dier niet in omstandigheden wordt gebracht waarin het last heeft van de aantasting van zijn integriteit. Het gaat in deze benadering immers uiteindelijk om het welzijn.

Samenvattend: bij integriteit is meer dan bij gezondheid en welzijn de vraag wat er precies onder verstaan dient te worden. Daarnaast is ook de vraag waarom een integriteitsaantasting een probleem is als een dier er niets van merkt, niet eenvoudig te beantwoorden.

### *Stap 5 De finale afweging*

De laatste stap in het ethische toetsingskader is de afweging van het belang van het doel van het onderzoek (dat hoe dan ook substantieel dient te zijn) tegen de schade voor gezondheid en welzijn en de aantasting van de integriteit. Het lijkt op het eerste gezicht wat vreemd om aan een dergelijke afweging te beginnen als reeds is vastgesteld dat het doel van substantieel belang is. Dat is echter niet het geval. Substantieel wil nog niet zeggen doorslaggevend en binnen substantieel zijn gradaties mogelijk. Eén miljoen euro is een substantieel bedrag, maar 10.000 euro is dat ook.

Als het om de afweging gaat, wordt vaak de metafoor van de weegschaal gebruikt. In de ene schaal ligt het belang van het doel van het onderzoek, in de andere liggen leed en ongemak van de dieren die voor dat doel worden gebruikt. Deze metafoor kent zijn beperkingen. Het beeld van de weegschaal suggereert dat wat aan beide kanten in de schaal ligt in dezelfde eenheid (bijvoorbeeld kilo's) uitgedrukt kan worden. Dit is vanzelfsprekend niet zo. Leed en ongemak voor de dieren en de aantasting van



hun integriteit laten zich vrij gemakkelijk in concrete termen uitdrukken, maar dat betekent nog niet dat ze eenvoudig zijn te kwantificeren. Hooguit kan er onderscheid gemaakt worden tussen erge en minder erge dingen. Daarom is het bijvoorbeeld gebruikelijk om te spreken van een geringe, matige of ernstige aantasting van de integriteit. Voor het belang van doelstelling geldt iets soortgelijks. Er zijn belangrijke en minder belangrijke doelstellingen, maar daarmee is nog niet gezegd dat het belang met enige exactheid gekwantificeerd kan worden. De afweging die gemaakt moet worden, kan dus ook geen wiskundige operatie zijn, die voor iedereen die zich erin verdiept na te rekenen is. De afweging is een “afweging de gehele discussie overziend”, een gezamenlijke inschatting van de leden van de Commissie gebaseerd op alles wat in de discussie over een aanvraag aan de orde is geweest. Dat een Commissie van deskundigen na een uitvoerige ethische discussie unaniem tot de conclusie komt dat een bepaald onderzoek alles afgewogen aanvaardbaar is, vormt geen absolute garantie voor een juiste beslissing. Als resultaat van een ethische discussie is het echter het best haalbare.

### **Conclusie**

Als de bespreking van het ethische toetsingskader van de Commissie biotechnologie bij dieren één ding duidelijk heeft gemaakt dan is het dat bij de toepassing van dat toetsingskader veel problemen van ethisch theoretische aard opduiken. De verleiding is groot om de conclusie te trekken dat al die problemen het in feite onmogelijk maken om op een verantwoorde wijze ethisch te toetsen. Dat is echter te pessimistisch en gaat ook voorbij aan het feit dat een belangrijk doel van de procedure nu juist is om helderheid te verkrijgen over de problemen die zich voordoen bij de ethische toetsing van biotechnologische handelingen bij dieren. Toepassing van een ethisch toet-

singskader dwingt er in feite toe om de begrippen en instrumenten die deel uitmaken van dat toetsingskader te doordenken aan de hand van concrete casus. Er is in de regelgeving omtrent biotechnologie bij dieren gekozen voor een stap voor stap benadering. Kenmerkend voor die stap voor stap benadering is dat men al doende meer duidelijkheid krijgt over de betekenis van begrippen die gebruikt worden in de discussie en over de toelaatbaarheid van de verschillende biotechnologische handelingen bij dieren. Op de vraag of dat gelukt is, is geen eenduidig antwoord te geven. Over de betekenis van de gebruikte begrippen en de wijze van toetsen is geen consensus, maar wel meer duidelijkheid ontstaan. Over de toelaatbaarheid van biotechnologische handelingen voor diverse doelen is nauwelijks meer duidelijkheid ontstaan. De realiteit is dat in Nederland vrijwel uitsluitend dieren genetisch worden gemodificeerd voor biomedisch onderzoek. Het zou dan ook voorbarig zijn om te stellen dat het “nee, tenzij” beleid voor biotechnologische handelingen bij dieren wel op de helling kan. Hooguit kan gezegd worden dat op één bepaald terrein, namelijk het genetisch modificeren van muizen en ongewervelde dieren voor biomedisch onderzoek, inmiddels zoveel duidelijkheid is ontstaan dat volstaan zou kunnen worden met een eenvoudige, kortere toetsing.

### **Literatuur**

- CBD, CCMO & COGEM, Trendanalyse Biotechnologie 2004 (COGEM, juli 2004).
- Frans W.A. Brom, Onherstelbaar verbeterd (Van Gorcum, Assen 1997).
- E. Regouin en F. Tillie, Een schaap met vijf poten? (Expertisecentrum LNV, 2003, nr. 2003/239).
- R. Tramper, Het kloneren van dieren nader bekeken, in: “Allemaal klonen” (Rathenau Instituut, Amsterdam 1998).

- Biotechnologie:** al die technieken met behulp waarvan levende organismen – planten en dieren – zodanig worden beïnvloed, dat producten worden verbeterd en/of productieprocessen meer efficiënt verlopen. In dit cahier betreft biotechnologie alleen ingrepen in het genoom van dieren.
- Chimaere:** organisme opgebouwd uit cellen afkomstig van tenminste twee genetisch verschillende bevruchte eicellen. De eicellen zijn afkomstig van verschillende maar nauw verwante diersoorten.
- Conditionele Knock-out muis:** een muis waarvan het genoom door middel van gerichte genetische modificatie zodanig is aangepast dat het beoogde gen op elk gewenst tijdstip en/of plaats (orgaan/weefsel) kan worden uitgeschakeld. De hierbij gevolgde werkwijze staat beschreven in de bijdrage van Verbeek.
- Cytostatica:** medicamenten die de groei van cellen remmen. Voornamelijk toegepast bij kankerpatiënten (chemotherapie).
- Deleties:** het ontbreken van een deel van de genetische code in het DNA.
- ES-cellen:** embryonale stamcellen. Cellen uit een vroeg embryonaal stadium die het vermogen bezitten bij te dragen aan de ontwikkeling van alle typen weefsels en organen die in een volgroeid organisme voorkomen, inclusief de geslachtsorganen. Deze cellen kunnen als permanente cellijnen worden gekweekt uit een specifiek deel (de ‘inner cell mass’ of ICM) van het vroege pre-embryo stadium dat blastocyst wordt genoemd.
- Eukaryoot:** elk organisme – plant of dier – waarvan de cellen een celkern bevatten (waarin zich het genoom bevindt), omgeven door cytoplasma. Alle zoogdieren zijn eukaryoot.
- Fenotype:** de manifestatie van het genotype als gevolg van de wisselwerking van de genetische informatie met zijn omgeving, en die afhankelijk van het ontwikkelingsstadium kan variëren.
- Gen en genconstruct:** onder een gen verstaat men een stuk DNA dat de code bevat voor een eiwit en voorzien is van regelementen (eveneens stukken DNA) die bepalen waar in het organisme, wanneer en in welke mate het gen tot expressie komt, d.w.z. het mRNA van het betreffende eiwit gevormd wordt. Een genconstruct is een kunstmatig gemaakt DNA-

molecuul bestaande uit het voor eiwit coderende deel van een gen geflankeerd door regelementen voor de expressie van dat gen. Het gen en de regelementen zijn veelal van verschillende herkomst. Bovendien zijn DNA-elementen van bacteriële oorsprong toegevoegd om vermenigvuldiging (“klonering”) in bacteriën mogelijk te maken.

**Genoom en genotype:** genoom is het geheel van de genetische informatie zoals opgeslagen in de basevolgorde van het DNA van ieder levend organisme. Het genotype is de *specifieke* genetische informatie (basevolgorde in het DNA) van één afzonderlijk individu.

**Homologe recombinatie:** uitwisseling van genetische informatie in DNA, tussen de individuele chromosomen van een chromosoompaar tijdens de vorming van de geslachtscellen. Het resultaat is een herschikking van het genetisch materiaal in de geslachtscellen waardoor een maximale variabiliteit in de nakomelingen kan worden verkregen. Van dit mechanisme van homologe recombinatie, dat is gebaseerd op een directe interactie tussen DNA-moleculen waarvan de basevolgorde in hoge mate overeenkomt, wordt gebruikgemaakt om nauwkeurig bepaalde genetische veranderingen aan te brengen in het genoom van bijvoorbeeld muizen.

**Integriteit:** in de dierlijke biotechnologie verwijst integriteit niet alleen naar een dier met een genoom dat niet door menselijk ingrijpen is geschonden, maar ook naar zo’n dier als typisch exemplaar van zijn soort, inclusief het soortspecifieke gedrag. Elk ingrijpen in het genoom van het dier, met mogelijke gevolgen voor het fenotype en het soortspecifieke gedrag, impliceert een aantasting van zijn integriteit. Het dier hoeft daar zelf niets van te merken.

**Knock-out (KO) muis:** een muis waarin als gevolg van een nauwkeurig bepaalde, kunstmatig geïntroduceerde genetische verandering de functie van een bepaald gen op beide chromosomen volledig is geblokkeerd. Analyse van het fenotype van de KO muis geeft vaak directe informatie over de rol van het gen in de normale biologische processen van de muis en soms ook over de rol ervan in bepaalde ziekten.

**Lentivirus:** een subklasse van de retrovirussen. Lentivirussen onderscheiden zich van vele andere retrovirussen doordat ze hun genoom in het DNA van de gastheer kunnen inbouwen zonder dat de cel daarvoor hoeft te delen. Het HIV behoort tot deze virus klasse.

**Myeloma cellen:** tumorcellen ontstaan uit witte bloedcellen.

**Oncogen:** een gen dat ten gevolge van een mutatie of verandering in expressie kan bijdragen aan het ontstaan van tumoren.

**Promotor:** regelementen, aanwezig in het DNA van een gen voorafgaand aan de eiwitcode, die bepalen waar in het organisme, wanneer en in welke mate het gen tot expressie komt, d.w.z. het mRNA van het betreffende eiwit gevormd wordt.

**Recombinatie:** zie bij homologe recombinatie.

**Regulatie element:** DNA-element dat (mede) bepaalt waar in het organisme, wanneer en in welke mate een bijbehorend gen tot expressie komt. Deze elementen zijn o.a. aanwezig in de promotor (zie ook bij promotor).

**Retrovirus:** klein virus met een RNA-genoom dat na infectie van een cel wordt omgezet in een DNA-kopie die vervolgens wordt ingebouwd in het chromosomale DNA van de gastheer. Bij de meeste retrovirussen moeten de cellen hiervoor delen.

**Selectie-gen:** een gen dat codeert voor een eiwit dat levende cellen beschermt tegen de toxische werking van bepaalde aan het kweekmedium toegevoegde stoffen zoals antibiotica. Een selectie-gen wordt door onderzoekers veelvuldig toegepast om in weefselkweek cellen te selecteren waarin een gewenste genetische verandering is aangebracht.

**si RNA (small interfering RNA):** korte RNA-moleculen waarvan de sequentie complementair is aan die van een

deel van een messenger RNA-molecuul. De specifieke, op deze complementariteit gebaseerde binding van het siRNA aan het mRNA, activeert een in alle eukaryotische cellen aanwezig mechanisme dat resulteert in de afbraak van het mRNA, waardoor de vertaling van dit mRNA in eiwit geheel of gedeeltelijk wordt geblokkeerd. Onder natuurlijke omstandigheden biedt dit mechanisme o.a. bescherming tegen virale infecties. Onderzoekers gebruiken siRNA als middel om de expressie van geselecteerde genen specifiek te verlagen onder experimentele condities.

**Structureel gen:** uitsluitend dat deel van het gen dat de code bevat van een eiwit, vanaf het eerste tot en met het laatste aminozuur, d.w.z. zonder de DNA-elementen die bepalen in welk celtype en wanneer die eiwitcode wordt afgelezen.

**T-lymfocyt:** witte bloedcel betrokken bij de afweer. Kunnen ook een rol spelen bij het doden van kankercellen.

**Tumor suppressor gen:** een gen dat het ontstaan van tumoren helpt voorkomen.

**Voorkern:** de haploïde kern van een geslachtscel (eicel of spermacel) die als gevolg van de reductiedeling precies de helft van de genetische informatie bevat van het diploïde organisme, d.w.z. van ieder chromosoom paar één chromosoom.

**Xenotransplantatie:** het transplanteren van weefsels of organen van de ene soort naar een andere soort.

# Eerder verschenen

## Transgene planten

onderzoek,  
communicatie en ethiek

W.J. STIEKEMA  
P.J.J. HOOYKAAS  
L.A.P. LOTZ, R.A. DE MAAGD  
EN H.J. BOSCH  
C.M.J. VAN WOERKUM  
P.J.H. KOCKELKOREN

cahiers  
bio-wetenschappen  
en maatschappij



# Eerder verschenen

## Transgene planten

onderzoek, communicatie en ethiek

### INHOUD

<b>1</b>	<b>HET GENOOM VAN DE ZANDRAKET</b>	5
	W.J. Stiekema	
	Extra kaders:	
	Genen en genomen	6
	Homologe genen	8
	<b>CENTROMEREN EN TELOMEREN</b>	13
	T. Bisseling	
<b>2</b>	<b>PLANTEN TRANSGEEN MAKEN</b>	15
	P.J.J. Hooykaas	
	Extra kaders:	
	Transformatietechnieken	16
	Virulentie-genen	20
	<b>REGELGEVING: VAN PETRISCHAALTJE TOT VELD</b>	23
	R.G.F. Visser	
<b>3</b>	<b>TRANSGENE PLANTEN</b>	27
	L.A.P. Lotz, R.A. de Maagd en H.J. Bosch	
	Extra kader:	
	Voor- en nadelen van farmaceutische eiwitten	32
	<b>VOORKOMEN EN BEHEERSEN VAN PLAGEN: EEN KUNST APART</b>	34
	J.C. van Lenteren en M. Dicke	
<b>4</b>	<b>LEIDT COMMUNICATIE TOT ACCEPTATIE?</b>	39
	C.M.J. van Woerkum	
<b>5</b>	<b>ETHIEK IN DE MAAK</b>	44
	P.J.H. Kockelkoren	
	Extra kaders:	
	Verantwoording	46
	De verlichting voorbij	48
	<b>GEEN TRANSGENE PLANTEN VOOR DE BIOLOGISCHE LANDBOUW</b>	52
	E.T. Lammerts van Buuren	
	<b>PATENT OP LEVEN</b>	55
	M.J.J.A.A. Korthals	

## Meer informatie:

Vereniging Samenwerkende Ouder- en Patiëntenorganisaties (VSOP)  
**[www.vsop.nl](http://www.vsop.nl)**

Stichting Erfocentrum; het Nationale Kennis- en Voorlichtingscentrum Erfelijkheid.  
**[www.erfelijkheid.nl](http://www.erfelijkheid.nl)**

Vereniging Spierziekten Nederland (VSN)  
**[www.vsn.nl](http://www.vsn.nl)**

De Commissie Genetische Modificatie (COGEM)  
**[www.cogem.net](http://www.cogem.net)**

Nederlandse Biotechnologie Associatie  
**[www.niaba.nl](http://www.niaba.nl)**

Ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit  
**[www.minlnv.nl](http://www.minlnv.nl)** : zoek op trefwoord 'biotechnologie bij dieren'

De Voedsel en Waren Autoriteit (VWA)  
**[www.vwa.nl](http://www.vwa.nl)**

De Nederlandse Vereniging voor Proefdierkunde (NVP)  
**[www.proefdierkunde.nl](http://www.proefdierkunde.nl)**

Netherlands Centre Alternatives to Animal Use  
**[www.nca-nl.org](http://www.nca-nl.org)**

Links naar alle biotechnologie websites van de overheid  
**[www.overheid.nl/themas/biotechnologie](http://www.overheid.nl/themas/biotechnologie)**

Stichting Informatie Dierproeven  
**[www.informatiedierproeven.nl](http://www.informatiedierproeven.nl)**

*[www.biomaatschappij.nl](http://www.biomaatschappij.nl): nieuwe ontwikkelingen in relatie tot dit en andere cahiers worden gepubliceerd op onze website. U treft hier ook een overzicht aan van alle eerder uitgebrachte cahiers en folders.*



## Stichting Bio-Wetenschappen en Maatschappij

Nooit tevoren waren er zoveel onderzoekers wereldwijd bezig met de verwerving van kennis op tal van gebieden van de biologie van de mens. Groots opgezette onderzoeksprogramma's als het 'Human Genome Project', dat in 2001 is afgerond, en het 'Decennium of the brain' zorgen voor databanken vol gegevens. Onderzoekers beschikken tegenwoordig over geavanceerde technieken, waarmee zij processen die zich in ons lichaam afspelen tot in detail kunnen ontrafelen en waarmee moleculen en cellen in beeld gebracht kunnen worden. Beeldtechnieken maken het tevens mogelijk dat men een kijkje in het lichaam neemt. Een ontoegankelijk gebied als de hersenen kan nu live bestudeerd worden, omdat men de activiteit van hersencellen zichtbaar maakt. Al die technieken leveren een stortvloed van gegevens op, die men bovendien geautomatiseerd kan verwerken en opslaan. Waar deze enorme toenames van informatie en kennis toe zal leiden, is niet te voorzien. Maar de ingrijpende maatschappelijke gevolgen, in het bijzonder voor de gezondheidszorg, tekenen zich al duidelijk af.

In 1969 werd door mensen die voorzagen dat ontwikkelingen in de bio-wetenschappen het dagelijks leven diepgaand zouden kunnen beïnvloeden, de stichting Bio-Wetenschappen en Maatschappij opgericht. Het leek hen niet verantwoord dat alleen een beperkt aantal experts geïnformeerd was over de te verwachten ontwikkelingen, bijvoorbeeld op het gebied van genetica, hersenonderzoek, reageerbuisbevruchting of transplantaties.

De stichting Bio-Wetenschappen en Maatschappij heeft als doelstelling: *'in brede kring het inzicht te bevorderen in de actuele en toekomstige ontwikkeling en toepassing der biowetenschappen, in het bijzonder met het oog op de betekenis en gevolgen voor mens en maatschappij'* (statuten, art. 2).

De stichting is onafhankelijk. Zij wil een bijdrage leveren aan de meningsvorming door toegankelijke informatie beschikbaar te stellen voor een breed publiek. De vraag is wat wij gaan doen met de mogelijkheden die de nieuwe wetenschappelijke inzichten en technieken ons kunnen bieden.