

# Code of practice voor het genereren van genetisch gemodificeerde dieren

## 1. Inleiding

Wereldwijd neemt het aantal GM-diermodellen in hoog tempo toe. In het algemeen zijn deze verkrijgbaar voor onderzoekers die ze willen gebruiken. Daardoor hoeven bekende GM-diermodellen niet steeds opnieuw geconcipieerd, gemaakt en gekarakteriseerd te worden en is er aansluiting bij de wetenschappelijke literatuur. In het geval een benodigd GM-diermodel niet bestaat of niet verkrijgbaar is, en ook niet effectief d.m.v. kruisingen van bestaande modellen tot stand kan worden gebracht, kan worden overwogen het model te genereren. De rechtvaardiging hiertoe dient duidelijk te worden onderbouwd. De hierna beschreven processtappen kunnen behulpzaam zijn in de onderbouwing.

Het genereren van een GM-diermodel verloopt in een aantal fasen:

1. De wetenschappelijk onderzoeker die voor zijn onderzoeksvraag een nieuw GM-diermodel nodig heeft, is leidend in de keuzes voor wat betreft de DNA-sequenties en soort modificatie(s) die moet(en) worden aangebracht voor het adresseren van de onderzoeksvraag.
2. De onderzoeker moet de noodzaak van het genereren van een nieuw GM-diermodel duidelijk maken aan de hand van een

Synthesis of Evidence<sup>9</sup> in het kader van een projectvergunning-aanvraag dan wel onderzoeksplan onder een bestaande projectvergunning voor het genereren van GM-dieren.

3. Vervolgens kan de vraag voor het genereren van het GM-diermodel voorgelegd aan een Gene Technology Platform<sup>10</sup>.
4. In overleg met het GTP wordt de keuze gemaakt welke genetische modificatie techniek /methode het meest efficiënt en kansrijk lijkt om de modificatie(s) aan te brengen op de voor het onderzoek benodigde genetische achtergrond.

<sup>9</sup> Synthesis of Evidence in het proefdieronderzoek, Zienswijze van het Nationaal Comité advies dierproevenbeleid (NCad), maart 2016

<sup>10</sup> Een Genoom Technologie Platform (GTP) is een (core) faciliteit, publiek dan wel privaat, waarin de kennis en kunde aanwezig is om het hele proces van ontwerp tot realisatie van een GM-diermodel te kunnen begeleiden en uitvoeren. GTPs moeten in staat zijn de processen efficiënt uit te voeren, te kunnen valideren en innoveren. GTPs zijn bereid de expertise te delen met andere platforms.

## 2. Voorbereiding/ Intake

### 2.1 Is er al een geschikt GM-diermodel beschikbaar?

Ga na of de lijn met de gewenste genetische modificatie op de goede genetische achtergrond, ergens in de wereld bestaat en leverbaar is. Dat heeft niet alleen als voordeel dat de lijn niet opnieuw gegenereerd hoeft te worden maar ook dat genotype, fenotype en toepassingen in onderzoek in beeld zijn.

Aanpak:

- Raadpleeg databases, zoals: [www.infracfrontier.eu](http://www.infracfrontier.eu), [www.findmice.org](http://www.findmice.org), [www.jax.org](http://www.jax.org), [www.mousephenotype.org](http://www.mousephenotype.org), [www.komp.org](http://www.komp.org), [www.rtrc.us](http://www.rtrc.us), [rgd.mcw.edu](http://rgd.mcw.edu); collega instituten en de wetenschappelijke literatuur. Het is aan te raden om een GTP te betrekken bij het doorzoeken van de databases en het raadplegen van expert netwerken.
- Indien de GM-lijn beschikbaar is, importeer deze dan als fokdieren of als sperma of embryo's. Afhankelijk van het importbeleid van de ontvangende proefdierfaciliteit dient rekening te worden gehouden met ontvangst in quarantaine dan wel met het doorlopen van een rederivatie-procedure om introductie van ongewenste micro-organismen te vermijden.
- Indien er een GM-lijn beschikbaar is met de gewenste genetische modificatie, maar niet leverbaar is op de gewenste stam achtergrond, overweeg dan of het de voorkeur heeft het model opnieuw te genereren of het bestaande GM-diermodel terug te kruisen op de gewenste achtergrond. Hierbij moet worden gekeken naar de slagingskans, tijdsinvestering en het aantal te gebruiken proefdieren.

### 2.2 Is er een projectvergunning van de CCD voor het genereren van het GM-diermodel?

Het genereren van GM-dieren is een dierproef volgens de Wet op de dierproeven en mag pas worden uitgevoerd als daar van overheidswege een projectvergunning voor is verleend. Omdat het genereren van een GM-diermodel geen doel op zich is, zal de aanvraag voor het genereren van de GM-dieren altijd in de context van een onderzoeksdoel moeten staan.

Aanpak:

- Raadpleeg de website van de **Centrale Commissie Dierproeven** voor de actuele projectvergunningaanvraagformulieren en de bijbehorende instructie.
- GTPs kunnen voor het genereren van nieuwe modellen ook een brede projectvergunning aanvragen. Elk te genereren model staat in de context van het onderzoek van de eindgebruiker die daar een projectvergunning voor aanvraagt. Dit heeft als voordeel dat de beschreven werkwijzen voor het genereren daarmee onder verantwoordelijkheid van de vergunninghouder van het GTP vallen en uniform beschreven worden. De IvD van de instelling waar het GTP is gevestigd verifieert de concrete aanpak voor elke aanvraag.

### 3. Inventarisatie van de eigenschappen van het nieuwe GM-diermodel

#### 3.1 Stel vast aan de hand van de eerder genoemde SoF welk type genetische modificatie moet worden aangebracht.

De keuze hiervoor wordt bepaald door de onderzoeksvraag. De mogelijkheden variëren van overexpressie tot gedeeltelijke, in tijd beperkte, of volledige inactivatie ('transgenen', 'knock-down' en 'knock-out') van een of meerdere genen en betreffen de keuze voor de meest geschikte locatie(s) in het genoom voor het aanbrengen van de gewenste genetische modificatie(s) ('transgenen' en 'knock-in').

#### 3.2 Stel vast hoe de genetische modificatie tot uitdrukking moet komen.

De volgende keuzen worden gemaakt:

- of de genetische modificatie altijd of alleen vanaf of op een gewenst moment tot uitdrukking moet komen (constitutief versus conditioneel);
- of de genetische modificatie in alle cellen van het lichaam tot expressie moet of mag komen of alleen in bepaalde celtypen of organen (constitutief versus conditioneel);
- of expressie alleen onder bepaalde condities moet plaatsvinden en of de expressie van de genetische modificatie aan- en uitgezet moet kunnen worden (conditioneel versus induceerbaar).

#### 3.3 Stel vast welke additionele kenmerken gekoppeld moeten zijn aan de genetische modificatie.

Genetische modificaties leiden niet altijd tot functionele veranderingen die meteen duidelijk zichtbaar of herkenbaar zijn. In die gevallen kan het noodzakelijk en/of wenselijk zijn om 'merkers' aan te brengen samen met de modificatie van het/de gen(en) van interesse. De aan- of afwezigheid van het 'merker' eiwit is dan indicatief voor de expressie van de genetische modificatie.<sup>11</sup> De aanwezigheid van een 'merker' kan ook gewenst zijn wanneer sprake is van een duidelijk fenotype of als enige modificatie om de expressie van een bepaald gen of om bepaalde cellen in het dier te kunnen volgen.

#### 3.4 Stel vast wat het gewenste genotype van het GM-diermodel voor gebruik in het dierexperiment is en wat het genotype van de fokdieren moet zijn indien de lijn niet 'zuiver' (homozygoot) gefokt kan worden met oog op het dierenwelzijn of de productiviteit in de fok.

Bepaald wordt of de genetische modificatie(s) in homo- of heterozygote toestand aanwezig moet(en) zijn en of dat voor de fok van de GM-lijn anders is dan voor de GM-dieren die gebruikt worden voor het dierexperiment. De keuze is mede bepalend voor de route waarlangs de introductie van meerdere modificaties dient plaats te vinden. Wanneer er meerdere geschikte methoden zijn met dezelfde

<sup>11</sup> Er worden ook GM-lijnen gemaakt met alleen expressiemerkers zonder functionele veranderingen.

mate van ongerief moet het beperken van het aantal dierproeven (dieren in experiment) en “dood of gedood voor gebruik in fok of dierproef” leidend zijn.

### 3.5 Stel vast op welke genetische achtergrond het GM-diermodel gegenereerd moet worden.

Het fenotype van het GM-diermodel wordt medebepaald door de genetische achtergrond waarop de genetische modificatie is aangebracht. De keuze voor de genetische achtergrond wordt daarom bepaald op wetenschappelijke gronden.

Indien de gewenste genetische modificatie reeds aanwezig is in een GM-stam die beschikbaar is, maar waarvan de genetische achtergrond niet geschikt is voor het bereiken van het voorliggende onderzoeksdoel, moet de afweging gemaakt worden de genetische modificatie terug te kruisen naar de gewenste genetische achtergrond of de genetische modificatie opnieuw aan te brengen in de gewenste achtergrond. De beoogde kwaliteit van het eindresultaat en het onvermijdelijke aantal dieren dat hierbij wordt gedood voor gebruik in fok of dierproef zijn leidend bij het maken van die afweging.

## 4. Ontwerp en productie

Wanneer gedefinieerd is aan welke kenmerken het nieuwe model moet voldoen kan de meest geschikte manier waarop de genetische modificatie moet worden aangebracht worden vastgesteld en kan ook het moleculaire construct c.q. vector, nodig voor het realiseren van de genetische modificatie, ontworpen worden.

Het betreft een aantal processtappen dat afhankelijk is van de stand van de technologie die continu verandert. Een GTP heeft de kennis en kunde in huis om volgens de actuele stand van de techniek GM-dieren te genereren. Vandaar dat geen opsomming van processtappen is opgenomen in deze CoP.

Voor iedere gegenereerde GM-lijn dient de correcte naam in overeenstemming met de internationale regels voor nomenclatuur (<https://www.jax.org/jax-mice-and-services/customer-support/technical-support/genetics-and-nomenclature>) te worden vastgesteld.

# Code of practice voor het fokken van GM-diermodellen

## 1. Fokcoördinatie

De coördinatie van de fok betreft de fok van proefdieren met het oog op het uitvoeren en bewaken van de specifiek voor de te fokken stam opgestelde fokstrategie ten behoeve van de productie van dieren voor de instandhouding van de stam en voor gebruik in dierproeven.

De fokcoördinatie ziet toe op de juiste benaming en naamvoering van de foklijnen in overeenstemming met de internationale regels voor nomenclatuur (<https://www.jax.org/jax-mice-and-services/customer-support/technical-support/genetics-and-nomenclature>). De fokstrategie is gericht op het bewaken van de genetische integriteit van de stam, het welzijn van de dieren en het voorkomen van vermijdbare fokoverschotten. Cryopreservatie en rederivatie maken onderdeel uit van de fokstrategie.

De fokcoördinatie overziet de gegevens over de fok binnen de instelling en het gebruik van de voortgebrachte dieren voor proeven en analyseert en beoordeelt deze aan de hand van de proefdier(fok) registratie. De fokcoördinatie stelt op basis daarvan de fokstrategie vast of stelt een reeds geïmplementeerde fokstrategie zo nodig bij. Afhankelijk van het type instituut en haar taakstelling is de fokcoördinatie belegd bij een of meerdere personen.

De fokcoördinatie adviseert en ondersteunt de onderzoeker en de Instantie voor Dierenwelzijn (IvD) over en bij het beheer en de uitvoering van de fok.

## 2. Het verwerven van GM-dieren

Indien sprake is van een GM-lijn met aangetast fenotype dan moet er een projectvergunning voorhanden zijn. Een lijn met een aangetast fenotype is een lijn waarbij bij alle of bepaalde dieren als gevolg van de genetische samenstelling sprake is van een welzijnsaantasting die evenveel of meer pijn, lijden, angst of blijvende schade kan veroorzaken als, dan wel dan het inbrengen van een naald volgens goed diergeneeskundig vakmanschap.

De fok van de GM-lijn kan onderdeel zijn van een projectvergunning met een specifiek onderzoeksdoel. Er kan ook gebruik gemaakt worden van een brede projectvergunning met als het doel het fokken van GM-lijnen met een aangetast fenotype.

### 2.1 Zelf gegenereerde GM-dieren

Zodra een nieuwe GM-lijn gegenereerd wordt, moet vastgesteld worden of er sprake is van een GM-lijn met een aangetast fenotype (in de zin van welzijnsaantasting). Hiertoe moet gedurende de eerste twee generaties van de nieuwe GM-lijn het welzijn van de dieren gemonitord worden. Dit monitoren is niet vergunningplichtig. Uitgangspunt is daarbij wel dat er voor het monitoren geen handelingen met drempel overschrijdend ongerief uitgevoerd worden.

Zowel de Europese Commissie als de CCD heeft richtlijnen opgesteld voor het uitvoeren van welzijnsmonitoring van een nieuwe GM-lijn.<sup>12</sup>

## 2.2 Import

GM-dieren kunnen in de onderzoeksfaciliteit geïntroduceerd worden door import van:

- Levende fokdieren
- Embryo's/ sperma/ ovaria/ eicellen al dan niet gecryopreserveerd

### Vorbereiding

- Leg de logistiek van het transport vast alsmede de specifiek voor dat transport vereiste administratie. Doe dit in geval van levende fokdieren in samenwerking met een erkend bedrijf gespecialiseerd in de logistiek van (proef)diertransporten.
- Zorg voor eenduidige communicatielijnen tussen aangewezen vertegenwoordigers van de partijen betrokken bij het verzenden, transport en ontvangst van de dieren.
- Zorg ervoor dat de verzender de beschikbare informatie over de dieren c.q. embryo's/ sperma/ ovaria/ eicellen deelt met de ontvanger c.q. de ontvangende proefdierfaciliteit.
- Toon aan dat de bestemming van de dieren c.q. embryo's/ sperma/ ovaria/ eicellen binnen het ontvangende instituut c.q. de proefdierfaciliteit bekend is.

<sup>12</sup> [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/pdf/corrigendum.pdf](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pdf/corrigendum.pdf)  
<https://www.centralecommissiedierproeven.nl/documenten/formulieren/16/10/13/handreiking-kaders-genetisch-gewijzigde-dieren>

- Leg vast dat passende maatregelen worden genomen ter bescherming van de integriteit van de zending en de omgeving na ontvangst (bijvoorbeeld voor wat betreft de microbiologische kwaliteit).

### Ontvangst

#### Quarantaine

- Ontvang levende dieren in een quarantaine omgeving. 'Nieuwe' fokdieren zijn pas na gedocumenteerde verificatie van de gewenste gezondheidsstatus toelaatbaar in de fok. Dit wordt bepaald aan de hand van de gezondheidsstatus van de kolonies van herkomst en van bestemming, en geborgd door microbiologische screening en/of rederivatie.
- Controleer en rapporteer de integriteit van de zending bij aankomst (labels, documenten, verpakking).
- Controleer en documenteer de dieren t.a.v.: conditie, aantal, sekseverdeling, etc. en bevestig overeenstemming met de beschrijving van de zending.
- Test het genotype van de dieren voordat extra handelingen plaatsvinden.
- Draag zorg voor een goede en volledige centrale registratie.

#### Cryogene-opslag

- Controleer en leg vast bij ontvangst of het materiaal nog in de juiste fysieke conditie is (bijvoorbeeld: is het materiaal nog diepgevroren?).
- Zorg ervoor dat het ingevroren materiaal bij ontvangst op de juiste temperatuur is en blijft in de daarvoor aangewezen opslagunit: bewaak de gewenste temperatuur.
- Draag zorg voor een goede en volledige centrale registratie.

## 2.3 Aankoop

- Stel het beleid vast hoe wordt omgegaan met dieren afkomstig van wettelijk erkende leveranciers en leg dat vast. Onderscheid kan worden gemaakt tussen dieren die direct bestemd zijn voor gebruik in experimenten en dieren die bestemd zijn voor de fok.

## 3 Het fokken van GM-dieren

Voor iedere GM-lijn wordt de fokstrategie afgestemd op het gebruik van de GM-lijn in het onderzoek, de complexiteit van het gewenste genotype inclusief de genetische achtergrond en de expressie van een fenotype al dan niet van invloed op de biologie van de voortplanting.

### 3.1 Fokstrategie

- Maak onderscheid tussen onderhoud-, expansie- en productiefok.
- Maak onderscheid tussen fok van GM-lijnen met drempel overschrijdend ongerief en de fok van GM-lijnen zonder drempel overschrijdend ongerief en leg dit vast. De fok van een GM-lijn met drempel overschrijdend ongerief is een dierproef waarvoor een van overheidswege verstrekte projectvergunning noodzakelijk is.
- Voorkom het aanhouden in fok van een GM-lijn zonder uitzicht op gebruik in een experiment. Als de lijn elders verkrijgbaar blijft, dient de fok te worden gestopt. Als het een unieke lijn of kruising betreft, en de uitkomsten van het onderzoek zijn gepubliceerd, dan dient de lijn beschikbaar te blijven, ook voor derden. Cryopreservatie is de aangewezen weg indien anders het vooruitzicht is dat de lijn langdurig in fok aangehouden wordt zonder dat gefokte dieren gebruikt worden in experimenten. Cryopreservatie van embryo's verloopt het meest efficiënt wanneer de lijn nog in productiefok is.
- Voorkom het onnodig fokken van algemeen (commercieel) verkrijgbare GM-stammen. Er kunnen legitieme redenen zijn om toch een eigen fok van zo'n stam op te zetten, zoals dierenwelzijn en speciale karakteristieken van de gebruikte dieren.

- Beëindig de fok van een GM-lijn waarmee wetenschappelijke resultaten zijn behaald en gepubliceerd nadat is vastgesteld dat van die GM-lijn in voldoende mate representatief genetisch materiaal in de vorm van embryo's en/ of sperma en/ of ovaria en/ of ES-cellen is opgeslagen in een (toegankelijke) cryo-bank.
- Stem expansie- en productiefokken af op de geplande afname van dieren (naar genotype, geslacht en leeftijd) voor gebruik in experimenten. Gebruik rekenmodellen voor de inschatting van de minimale omvang van expansie- c.q. productiefok.<sup>13</sup>
- Raadpleeg informatiebronnen, zoals:
  - De eigen gegevens over de fokproductie.
  - Algemene parameters m.b.t. de voortplanting van de achtergrondlijn.
  - Informatie over eventuele afwijkingen van een Mendeliaanse verdeling van genotypen bij het nageslacht.

### 3.2 In- en terugkruisen

In- en terugkruisen dragen bij aan het aantal dieren dood of gedood voor gebruik in fok of dierproef.

- Het kan efficiënter zijn om het gewenste GM-diermodel op een andere manier te genereren. Raadpleeg daarvoor een GTP. De fokcoördinatie bepaalt uiteindelijk of inkruisen of terugkruisen vermeden kunnen worden.
- Indien voor het terugkruisen een kruisingspartner nodig is van een (WT-)stam die algemeen commercieel verkrijgbaar is, kunnen dieren voor dat doel speciaal worden aangeschaft. Indien er moverende redenen zijn om toch een eigen fok van zo'n stam op te zetten, voorkom dan substamvorming door vervanging van de dieren door nieuw verworven dieren van dezelfde bron c.q. leverancier binnen uiterlijk 10 generaties.

### 3.3 Fok administratie:

Het optimaliseren van de fokresultaten van een GM-lijn is alleen mogelijk wanneer fokgegevens op een systematische manier continu worden verzameld, vastgelegd en geanalyseerd op een centraal toegankelijke locatie.

- Het registreren van tenminste onderstaande gegevens is daarvoor nodig:
  - De herkomst van de lijn
  - Het genotype en de genetische achtergrond van de stam
  - Het fenotype van de stam (kenmerken en waargenomen afwijkingen)
  - De stamboom

<sup>13</sup> Breeding strategies for maintaining colonies of laboratory mice: a Jackson Laboratory Resource Manual ([www.jax.org](http://www.jax.org)). Efficient breeding of genetically altered animals: assessment framework (<http://org.uib.no/dyreavd/Documents/GAA%20tool.pdf>) The Jackson Laboratory Handbook on Genetically Standardized Mice. Bar Harbor, Maine, USA: The Jackson Laboratory, 2009.

- Fokopbrengst (tussen-nest-tijd; aantal nesten per vrouwtje; aantal pups gespeend per nest; geslachtsverhouding per nest; genotype verdeling)

### 3.4 Rederivatie

Rederivatie is het proces waarmee dieren met de gewenste microbiologische status worden verkregen voor verdere fok en gebruik. Rederivatie kan worden uitgevoerd middels prepartum hysterectomie gevolgd door het overleggen van pups naar een 'schone' foster die zelf net geworpen heeft, of middels embryotransplantatie. Bij embryotransplantatie worden embryo's van donordieren, vaak na superovulatie, ingebracht bij ontvanger-dieren die eerst schijnzwanger zijn gemaakt door een paring met een steriele man. Rederivatie wordt toegepast wanneer geïmporteerde dieren niet de voor de proeven en/of dierfaciliteit benodigde gewenste microbiologische status hebben. Rederivatie wordt bij voorkeur uitgevoerd nadat bij de geïmporteerde dieren is vastgesteld dat ze het gewenste genotype hebben en de GM-lijn langere tijd gebruikt gaat worden. De ontvangers van de getransplanteerde embryo's hebben minimaal dezelfde gezondheidsstatus als de voor de proeven en dierfaciliteit vereiste status en dienen zelf geschikt te zijn voor microbiologische screening.

- Stel vast welke microbiologische status dient te worden gerealiseerd. Let op onder andere: internationale aanbevelingen, de eisen die het onderzoeksprogramma stelt en de infrastructuur van de faciliteit. Elke faciliteit dient voor de aanwezige dierbestanden een gezondheidsbewakingsprogramma te hanteren (*Bijlage III Richtlijn 2010/63/EU*).

- Beoordeel de rapportage van de microbiologische status van de te importeren dieren c.q. de zending in de context van het gezondheidsbewakingsprogramma van de kolonie waaruit de te importeren dieren afkomstig zijn.
- Importeer bij enkelvoudige homozygote GM-lijnen bij voorkeur mannetjes van de te importeren GM-lijn. Bij meervoudige GM-lijnen is het raadzaam om zowel mannetjes als vrouwtjes te importeren, deze te kruisen en de embryo's te verzamelen voor transplantatie.
- Gebruik als embryodonoren vrouwtjes met de gewenste genetische achtergrond.
- Verifieer de microbiologische status van de gerederiveerde dieren alvorens ze op te nemen in de kolonie. Dit kan door microbiologische screening van de foster. In afwachting van de uitslag dienen de dieren apart van de bestemmingskolonie gehuisvest te worden.

### 3.5 Cryogene-opslag

- Bepaal of een GM-lijn moet worden opgeslagen. Beantwoordt daartoe de vraag: is de (modificatie in bepaalde genetische achtergrond) lijn uniek, niet al ergens anders opgeslagen, nog van wetenschappelijk belang of kan de lijn 'eenvoudig' opnieuw gemaakt worden?
- Bepaal welk materiaal van een GM-lijn wordt opgeslagen op basis van: het aantal genetische modificaties en de status van die modificaties van de GM-lijn, de fok-efficiëntie.
- Zorg voor volledige documentatie en registratie van het ingevroren materiaal, de gebruikte invriesmethode en de aanbevolen methode voor ontthooien.

- Neem enkele invriescontroles mee.
- Controleer van iedere ingevroren GM-lijn de vitaliteit.
- Zorg ervoor dat het opgeslagen materiaal van een GM-lijn tenminste gelijkelijk verdeeld is over twee fysiek van elkaar gescheiden locaties, zodat in geval van calamiteit op tenminste één locatie de helft van het materiaal nog beschikbaar is.

### Embryo's

Een embryo bevat de dubbele set chromosomen (diploïd genoom) c.q. het complete genoom van de GM-lijn. Daarom heeft deze benadering de voorkeur voor de cryogene-opslag van GM-lijnen met meerdere genetische modificaties. Per lijn zullen doorgaans minimaal enkele honderden tot wel 500 embryo's worden ingevroren. Dit vergt aanzienlijke aantallen donormuizen. Om veel embryo's van een donor te krijgen kan superovulatie worden toegepast door (pre-puberale) vrouwtjes met hormonen te behandelen.

### Cryopreservatie van gameten

Mannelijke (sperma) of vrouwelijke gameten (eicellen en ovariumweefsel) bevatten slechts een enkele set chromosomen (haploïd genoom). Na ontdooien wordt sperma samengebracht met verse of ontdooide eicellen (meestal afkomstig van de wildtype achtergrondlijn) en ontdooide eicellen met vers of ontdooid sperma (meestal afkomstig van de wildtype achtergrondlijn). De resulterende embryo's worden geïmplant in schijnvruchtige ontvanger dieren. Ontdooid ovariumweefsel wordt getransplanteerd in een ontvanger die vervolgens gedekt wordt door een mannetje van de gewenste achtergrondlijn. De cryopreservatie van gameten is vooral geschikt

voor de cryogene-opslag van GM-lijnen met één genetische modificatie. Als er sprake is van een combinatie van modificaties dient de fok na de revival van de lijn allereerst gericht te zijn op het verkrijgen van de gewenste fokdieren, bij voorkeur homozygoot maar indien nodig heterozygoot.

### Embryonale stamcellen met de gewenste modificatie

Deze benadering is alleen een bruikbaar alternatief voor het invriezen van embryo's en gameten als de genetische achtergrond van de stamcellen dezelfde is als de gewenste genetische achtergrond van het GM-diermodel. Is dit niet zo, dan is terugkruising onvermijdelijk (zie 3.2) en dat kost veel tijd en extra dieren. In die gevallen dienen embryo's, sperma of ovariumweefsel ingevroren te worden.