

Vroege embryo's, klonen en transgenese

.....
Docenten Dr. W.M. Baarends, dr. A.J.J. Reuser en dr. A.T. Hoogeveen

1 Toelichting

1.1 Achtergrondinformatie

Bij dit vaardigheidsonderwijs staat de vroege ontwikkeling van het menselijke embryo vanaf de bevruchting tot de implantatie centraal (week 1 na bevruchting). De volgende onderwerpen komen aan bod: bevruchting, klievingsdelingen en de blastocyst. Daarnaast komt een aantal onderwerpen aan de orde die samenhangen met de eigenschappen van het vroege embryo: klonen, genetische manipulatie en het ontstaan van eeneiige tweelingen. Bij dit onderwijs maken we gebruik van audiovisuele middelen, digitale microscopie en schriftelijke opdrachten die in groepjes uitgewerkt worden.

1.2 Leerdoelen

Dit vaardigheidsonderwijs sluit aan bij de weekleerdoelen 3.1.5 /7, /8, /9, /10.

Meer specifiek kun je na het volgen van dit vaardigheidsonderwijs:

- de processen die plaatsvinden tijdens de bevruchting van de oöcyt beschrijven;
- de begrippen morula, compactie en blastula uitleggen;
- het principe van het maken van een 'knock-in mouse' beschrijven;
- het principe van het maken van een kloon beschrijven, en de overeenkomsten en verschillen met eeneiige tweelingen aangeven.

1.3 Literatuur

Carlson, B.M. (2004). *Human Embryology and Developmental Biology* (3th ed.). St. Louis: Elsevier Ltd. ► 27 -31 (Chap. 2, tot Formation and function), 32 (vanaf fertilization) - 41, 43 - 54 (Chap. 3, tot aan implantation), 55 - 58

N.B. Er zijn vele verwijzingen naar pagina's tekst en figuren in het boek! De pagina's 27-58 zijn gekopieerd in PDF file "pp27-58". Deze is te vinden op de server in de "Browse" directory, waar ook plaatjes staan!!!

1.4 Overige informatie

Studiebelasting

Dit vaardigheidsonderwijs neemt twee uur in beslag (exclusief voorbereidingstijd).

Vorbereiding

Lees bovengenoemde literatuur als voorbereiding op het vaardigheidsonderwijs.

2 Handleiding

2.1 Van bevruchting tot blastula

Dit onderdeel maakt gebruik van de volgende materialen:

- Video
- Gedigitaliseerde microscopische opnamen van:
 - 1 [Eencellig stadium/zygote](#)
 - 2 [Tweecellig stadium](#)
 - 3 [Vier-tiencellig stadium](#)
 - 4 [Morula](#)
 - 5 [Blastula a](#), [blastula b](#)
- [Figuren Compactie](#)
- Figuren en tekst uit Carlson, B.M. (2004). *Human Embryology and Developmental Biology* (3th ed.). St. Louis: Elsevier Ltd

Aan het begin van dit deel van het vaardigheidsonderwijs bekijk je een videofilm waarin een aantal aspecten van de bevruchting en de eerste stadia van embryogenese toegelicht wordt (totale duur 10 minuten):

- de onbevruchte eicel met de corona radiata, kort na de ovulatie;
- de bevruchting en de daarbij optredende zona reactie;
- de afronding van de tweede meiotische deling met vorming van het tweede poollichaampje;
- de eerste klievingsdelingen (morula en blastula);
- transport van het embryo door de tuba naar de uterus.

Bestudeer [Figuur 1-4](#) en de [tekst Stages of meiosis \(pp. 5/6\)](#) uit *Human Embryology and Developmental Biology*.

- 1 In welke fase van de meiotische deling bevindt de onbevruchte oöcyt zich kort na de ovulatie?

In Figuur 1-4 wordt een algemeen schema van meiose weergegeven. Tijdens de oogenese verloopt het proces iets anders; er ontstaat uiteindelijk maar 1 gameet.

- 2 Geef aan welke kern in Figuur 1-4 qua chromosoom-inhoud overeenkomt met het 1^e poollichaampje, en welke overeenkomt met het 2^e poollichaampje.

- 3 Hoeveel poollichaampjes heeft een onbevruchte eicel?

Bestudeer [Figuur 2-4](#), [Figuur 2-6](#) en [de tekst FERTILIZATION \(pp. 32-34 metabolic activation\)](#) uit *Human Embryology and Developmental Biology*.

- 4 Wat gebeurt er tijdens de acrosoom reactie?
- 5 Welke aspecten van het doordringen van de corona radiata zijn niet correct weergegeven in Figuur 2-4?
- 6 Wat gebeurt er tijdens de zona reactie?
- 7 Waar vindt de bevruchting plaats?
- 8 Wat is de ploëdie van de vrouwelijke pronucleus?

Aan de hand van gedigitaliseerde beelden van gefixeerde preparaten bestudeer je de ontwikkeling van de zygote tot aan de blastula. De verschillende ontwikkelingsstadia zijn verkregen door muizen embryo's, op verschillende tijdstippen na bevruchting, uit de eileiders te halen en te fixeren. Om je een beeld te geven van hoe klein een eencellig embryo in feite is, zijn in de onderwijszaal ook de preparaten aanwezig waarvan de gedigitaliseerde opnamen gemaakt werden.

Preparaat 1 Eencellig stadium/zygote

- 9 Zoek de volgende structuren op:
- het eerste poollichaampje
 - [de zona pellucida](#)
 - [de corona radiata](#)

Soms zie je nog een restant van de spermacel die de eicel heeft bevrucht

Na de ovulatie heeft de eicel de meiose nog niet voltooid. Het proces is geblokkeerd in de metafase van de tweede meiotische deling. Na de bevruchting wordt de tweede meiotische deling afgerond en hierbij wordt het tweede poollichaampje gevormd. Vervolgens worden de twee pronuclei gevormd. De mannelijke pronucleus is over het algemeen groter dan de vrouwelijke pronucleus.

Preparaat 2 Tweecellig stadium

- 10 Teken wat je ziet in dit preparaat.

Preparaat 3 Vier-tiencellig stadium De eerste delingen vinden plaats zonder dat meer cytoplasma wordt gevormd. Deze delingen worden dan ook klievingen genoemd. Na de eerste deling zijn de [poollichaampjes](#) veelal tussen beide blastomeren zichtbaar.

Preparaat 4 Morula

Na een serie klievingen is een klompje kleine cellen tot stand gekomen; bij elkaar in omvang nog altijd even groot als de eicel: alles past nog in de zona pellucida. Het klompje cellen wordt morula genoemd.

- 11 Teken de morula.
- 12 Waar bevindt zich het embryo in het morula stadium?

Preparaat 5 Blastula (a) en (b)

De morula ondergaat een proces van differentiatie, waarbij cellen wandstandig worden rondom een centrale met vocht gevulde holte. Het geheel wordt de blastula genoemd. De holte wordt aangeduid met blastocoel. De buitenste cellaag heet de trofoblast. Tegen de binnenwand van de holte (en slechts aan één kant) ligt een groep

cellen bij elkaar. Deze groep cellen wordt de embryoblast of inner cell mass genoemd. Uit de embryoblast ontwikkelt zich het embryo en een aantal extraembryonale weefsels. Uit de trofoblast worden alleen extra-embryonale structuren gevormd.

13 Teken de blastula.

14 Waar bevindt zich het embryo in het blastula stadium?

Compactie

Bestudeer de tekst op pagina 43-44 (Cleavage tot Molecular biology and genetics) uit *Human Embryology and Developmental Biology*.

15 Bestudeer de [figuren compactie](#). Omschrijf in je eigen woorden wat er gebeurt tijdens de compactie en wat de rol van cadherine E is bij dit proces.

16 Wat voor soort cel-cel verbindingen worden gevormd door E-cadherine?

Met een micropipet wordt één cel van een achtcellig embryo (muis) geïnjecteerd met het enzym peroxidase (HRP) met een molecuulmassa van 40000 Da.

Eén andere cel wordt geïnjecteerd met een veel kleiner molecuul de fluorescerende verbinding fluoresceïne (molecuulmassa 330 dalton). Dit experiment wordt uitgevoerd voor en na compactie van het embryo. Korte tijd na de micro-injectie wordt gekeken waar het enzym en de fluorescerende verbinding zich bevinden ([zie figuur 4](#)).

17 Verklaar het verschil in lokalisatie van peroxidase en fluoresceïne.

2.2 Mogelijkheden en onmogelijkheden in het vroege embryo

Eeneiige tweelingen en kloneren

Bestudeer de [tekst over tweelingen \(pp. 55-57\)](#) uit *Human Embryology and Developmental Biology*.

Een zygote die ontstaan is uit een bevruchting van een oöcyt met een spermacel kan zich ontwikkelen tot een volledig nieuw individu. Na de eerste celdeling zijn beide zogenaamde blastomeren in principe ook in staat zich tot een volledig individu te ontwikkelen. Zelfs wanneer het blastocyst stadium bereikt is, waarbij er een trofoblastlaag en een *inner cell mass* ontstaan zijn, kan de inner cell mass zich nog splitsen waardoor er alsnog twee (genetisch volledig identieke) individuen ontstaan. De kans op het ontstaan van een zogenoemde identieke tweeling is ongeveer 1:250. Men veronderstelt dat de meeste identieke tweelingen pas ontstaan tijdens het blastocyst stadium.

18 Waarop zou deze veronderstelling gebaseerd kunnen zijn?

Het ontstaan van een eeneiige tweeling is eigenlijk een natuurlijke vorm van reproductief kloneren. De term reproductief kloneren wordt echter in de meeste gevallen gebruikt om het kloneren van een volwassen individu te omschrijven. Voor reproductief kloneren wordt de haploïde kern uit een oöcyt verwijderd waarna een kern uit een somatische cel wordt teruggeplaatst. Deze geconstrueerde diploïde cel wordt vervolgens gestimuleerd om te gaan delen en na terugplaatsing in de baarmoeder zou deze zich kunnen ontwikkelen tot een nieuw individu wat genetisch identiek is aan de donor van de somatische cel. Het DNA in de mitochondriën is afkomstig van de eicel. Deze techniek is tot op heden nog niet erg succesvol

toegepast, en uitsluitend bij dieren gerapporteerd. Met name runderen zijn gebruikt voor reproductief kloneren. In het algemeen blijkt dat deze techniek leidt tot veel prenatale en neonatale sterfte door verschillende afwijkingen die samen het "Cloning syndrome" worden genoemd. Zie hiervoor ook de ZO *Stamcellen* in week 3.1.7. Reproductief kloneren van mensen is vooralsnog niet mogelijk, en onderzoek hiernaar is in vele landen verboden. Het is natuurlijk de vraag of deze vorm van kloneren ethisch aanvaardbaar is.

De onderzoeker J. Tesarik stelt in een recent artikel in het tijdschrift *Human Reproduction* (Tesarik, J. (2002). *Reproductive semi-cloning respecting biparental embryo origin. Human Reproduction*, 17 (8), 1933-1937) dat het nadeel van reproductief kloneren is dat slechts één van de twee ouders genetisch verwant is met het kind. Om deze reden stelt hij voor om te proberen een embryo te maken dat tot stand is gekomen door fusie van het genoom van een spermacel en het genoom van een somatische cel van de moeder. Hierbij dient het genoom van de somatische cel dan wel in een donor eicel gebracht te worden en 'gehaploïdiseerd' te worden.

Wanneer een vrouw bijvoorbeeld geen eicellen heeft, zouden uit een metaphase II oöcyt van een donor de chromosomen verwijderd kunnen worden (dit wordt dan een 'oöplast' genoemd). Vervolgens wordt van de onvruchtbare vrouw een kern uit een somatische cel genomen; deze kern is in G0/G1 en heeft dus nog geen DNA replicatie ondergaan.

19 Geef de ploidy (N) en DNA hoeveelheid (C) aan van deze somatische cel. Bestaan de chromosomen uit één of twee chromatiden?

20 Geef de ploidy (N) en DNA hoeveelheid (C) aan van een oöcyt na ovulatie. Bestaan de chromosomen uit één of twee chromatiden?

Deze somatische kern wordt in de donor oöplast geplaatst en door middel van ICSI (intracytoplasmatische sperma injectie) wordt een zaadcel van de vader ingebracht. Het blijkt dat in een deel van deze cellen na enige tijd een 'pseudo-tweede poollichaampje' wordt gevormd.

21 Wat gebeurt er na een normale bevruchting met de vrouwelijke chromosomen; en wat is na de afsplitsing van het tweede poollichaampje de ploidy (N) en DNA hoeveelheid (C) van de hele zygote?

22 Bedenk wat er in de donor oöplast zoals hierboven beschreven zou moeten gebeuren om een 'pseudo-tweede poollichaampje' met de juiste DNA inhoud te verkrijgen.

Het embryo is ingevroren om eventueel ooit nog in de moeder teruggeplaatst te worden.

Een andere groep onderzoekers (Tateno H, Latham KE, Yanagimachi R, *Human Reproduction*, Vol. 18, No. 3, 472 - 473, March 2003) reageert op het artikel van J. Tesarik. Eén van de kritieken op het experiment van J. Tesarik is als volgt geformuleerd:

"This proposed scheme is biologically unsound. A rudimentary knowledge of the mechanics of meiotic chromosome segregation should suffice to make this apparent."

23 Bediscussieer met elkaar het verschil tussen reproductive cloning en de 'semi-

cloning' techniek van Tesarik. Probeer te herleiden welke denkfout hij gemaakt heeft die tot de reactie van Tateno et al., geleid heeft. Is er een reële kans dat het embryo genetisch normaal is?

Manipulatie van het vroege embryo

Vanwege het feit dat de blastomeren van het vroege embryo nog totipotent zijn, zijn er vele manipulaties mogelijk. Een aantal experimenteel geïnduceerde veranderingen in de samenstelling van vroege embryo's heeft geleid tot kennis betreffende de 'developmental fate' van bepaalde cellen en tot de ontwikkeling van technieken voor het maken van transgene muizen.

Bestudeer de tekst op pp. 50-53 (Experimental manipulations of cleaving embryos) en figuur 3-9 uit *Human Embryology and Developmental Biology*.

Aangezien men (zoals uit de figuur blijkt) 'ongestraft' één of twee blastomeren kan verwijderen uit een 16-cellig embryo, kunnen deze cellen ook gebruikt worden om de 'kwaliteit' van het embryo te bepalen. Dit wordt in bepaalde gevallen gedaan met embryo's die bevrucht zijn door middel van ICSI of IVF, om zo te selecteren welke embryo's teruggeplaatst zullen worden. Deze zogenoemde preïmplantatiediagnostiek wordt bijvoorbeeld gebruikt in gevallen waarbij er een verhoogd risico bestaat op een ernstige erfelijke aandoening, of om te controleren of het embryo een normaal karyotype heeft.

24 Welke methode zou gebruikt kunnen worden om vast te stellen of het DNA in de geïsoleerde blastomeer een bekende puntmutatie heeft? Welke problemen kan deze techniek met zich mee brengen?

25 Met welke techniek kun je vaststellen of de cel een normaal karyotype heeft?

Genetische manipulatie

Om inzicht te krijgen in de functie van bepaalde genetische factoren zijn technieken ontwikkeld waarmee het mogelijk is om extra genetische eigenschappen toe te voegen, of bestaande genetische eigenschappen gericht uit te schakelen. Deze technieken worden voornamelijk toegepast bij de muis en vereisen eveneens manipulatie van het vroege embryo.

Bekijk figuur 3-10 in Carlson, en de figuur: *Constructie van knockout muismodel*.

26 Wat is het belangrijkste verschil tussen procedure A en procedure B in figuur 3-10?

Stel je wilt onderzoeken wat het effect is van overexpressie van de androgeenreceptor tijdens de seksdifferentiatie.

27 Welke techniek zou dan je voorkeur hebben? Wat zou je kiezen als je de functie van de androgeenreceptor juist uit wilt schakelen?
Motiveer je antwoord.