

De verborgen estafette

Hoe de kiembaan de
generaties verbindt



**RADBOUD
UNIVERSITY
PRESS**

Peter de Boer
illustraties van Marc Maas

De verborgen estafette

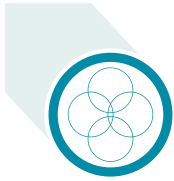
De verborgen estafette

Hoe de kiembaan de generaties verbindt

Peter de Boer

Illustraties van Marc Maas

Financiële ondersteuning is ontvangen van de Vereniging voor Klinische Embryologie (<https://www.embryologen.nl>) en van de Stichting Simonsfonds (<https://www.nvhg.nl/simonsfonds/>)



VERENIGING VOOR
KLINISCHE EMBRYOLOGIE



De verborgen estafette. Hoe de kiembaan de generaties verbindt

Uitgegeven door RADBOUD UNIVERSITY PRESS

Postbus 9100, 6500 HA Nijmegen

www.radbouduniversitypress.nl | www.ru.nl/radbouduniversitypress

radbouduniversitypress@ru.nl

Afbeeldingen: Marc Maas

Ontwerp omslag en binnenwerk: Marc Maas en Textcetera, Den Haag

Taalredactie: Radboud University Press, waarbij de uitdrukkelijke wensen van de auteur wat betreft schrijfwijze en spelling zijn gerespecteerd

Drukwerk: Pumbo.nl

ISBN: 978 90 8317 898 1

DOI: <http://doi.org/10.54195/PHHP7653>

Versie: 2022-12

Gratis te downloaden via: www.radbouduniversitypress.nl

© 2023, Peter de Boer

RADBOUD UNIVERSITY PRESS

Dit is een Open Access uitgave gepubliceerd onder de termen van de Naamsvermelding-NietCommercieel-GeenAfgeleideWerken 4.0 Internationaal (CC BY-NC-ND 4.0). De gebruiker dient de maker van het werk te vermelden, een link naar de licentie te plaatsen en aan te geven of het werk veranderd is. De gebruiker mag dat op redelijke wijze doen, maar niet zodanig dat de indruk gewekt wordt dat de licentiegever instemt met het werk of het gebruik van het werk. Gebruik voor commerciële doeleinden is onder deze licentie niet toegestaan. De gebruiker mag geen juridische voorwaarden of technologische voorzieningen toepassen die anderen er juridisch in beperken om iets te doen wat de licentie toestaat. Men mag het veranderde materiaal niet verspreiden als men het werk heeft gemixt, veranderd, of op het werk heeft voortgebouwd.

Hoewel aan de totstandkoming van deze uitgave de uiterste zorg is besteed, aanvaarden de auteur en de uitgever geen aansprakelijkheid voor eventuele fouten en onvolkomenheden, noch voor de directe of indirecte gevolgen hiervan.

Inhoudsopgave

Inleiding	11
1 Impressie van een cel	19
2 Chromosomen	27
2.1 Inleiding	27
2.2 Chromosomen tijdens de celcyclus	28
2.2.1 De celcyclus	28
2.2.2 Het kopiëren van het DNA ter voorbereiding van de celdeling	30
2.3 De chromatinestructuur van de kern	34
2.3.1 Inleiding	34
2.3.2 Soorten chromatine	38
Box 1 Centrale dogma van de moleculaire biologie	44
2.3.3 Soorten DNA	50
3 Genetische variatie	59
3.1 Inleiding	59
3.2 Variatie op en rond de base	60
3.3 Structurele varianten	65
3.4 De geschiedenis van de cytogenetica, het in beeld krijgen van structurele chromosoomafwijkingen en afwijkingen in het aantal chromosomen	66
3.4.1 De microscopie van structurele chromosoomafwijkingen	71
3.4.2 De microscopie van afwijkingen in het aantal chromosomen	72

4	Van genotype naar fenotype	75
4.1	Genetische dissectie	75
4.2	Genetische dissectie bij de mens	77
5	De meiotische delingen	83
5.1	De paring van de homologe chromosomen	83
5.2	De meiotische delingen zelf	96
5.3	De genetische gevolgen van de meiotische delingen	97
5.4	De toepassingen van meiotische uitkomsten	102
5.4.1	Het bepalen van verwantschap	102
5.3.2	Opsporen van een delinquent	103
5.3.3	De resten van <i>Homo neanderthal</i>	104
6	De overgang naar de kwantitatieve genetica	107
6.1	Het begrip erfelijkheidsgraad, de h^2	108
6.2	De polygene risico score (PRS) en genoom brede associatie studies (GWAS)	110
7	Het ontstaan van de primordiale kiemcellen in het jonge embryo	119
	Box 2 Pluripotente stamcellen	123
	Box 3 Genetische manipulatie	127
8	De ontwikkeling van de embryonale gonade	139
9	Het "resetten" van chromatine in de kiembaan	145
10	Genomische imprinting	151
	Box 4 Meer over X chromosoom inactivatie	160
11	Oogenese	167
11.1	Het overzicht	167
11.2	Ontwikkelingen in de eicel	173
11.3	DNA herstel in de eicel	174
11.4	Non disjunctie	178

11.4.1	Leeftijdseffecten	179
11.4.2	Mechanismen	181
11.4.3	Invloeden van buiten	184
11.5	Eicelkwaliteit	185
11.6	Oogenese <i>in vitro</i>	186
12	Spermatogenese	187
12.1	Inleiding	187
12.2	Beoordelen van de spermatogenese	190
12.3	De spermatogonale vermenigvuldiging	192
12.4	De Sertolicele barrière	194
12.5	Mannelijke aspecten van de meiose	194
12.5.1	“Sex bodies”	195
12.5.2	Chromatine veranderingen en genexpressie in de meiose	197
12.5.3	Checkpoints in de meiose	198
12.6	Spermiogenese	200
12.7	DNA herstel, beschadigende stoffen	201
12.8	Aantallen zaadcellen, de productie	208
12.9	Het spermioogram	211
12.9.1	Heterogeniteit	214
12.9.2	DNA methylering in zaadcellen	216
12.9.3	De X,Y en slecht zaad	217
12.9.4	DNA schade in zaadcellen	218
12.10	Dalende tellingen	218
12.11	Heeft een lage zaadcelproductie gezondheidsaspecten?	220
12.12	Genetische oorzaken van verstoorde zaadcelvorming	220
12.12.1	Chromosoomafwijkingen	223
12.12.2	Y deleties	224
12.12.3	Mutaties op gen niveau	228
12.13	Oudere vaders	230
13	Bevruchting en klievingsdelingen	233
13.1	Inleiding	233
13.2	Sperma transport	236

13.3	Sperma heterogeniteit	236
13.4	Gameten en het “fertile window”	237
13.5	De bevruchting	240
13.5.1	Eicelactivatie en de zona reactie	244
13.5.2	Chromatine veranderingen en DNA herstel	246
13.5.3	De “maternal to zygote” overgang	250
13.5.4	Afwijkingen bij de bevruchting	252
13.6.	De klievingsdelingen	253
13.6.1	Is de eicel overbemeten?	255
13.7	<i>In vitro</i> technieken	256
14	Mitochondriële overerving	261
15	Epigenetische aspecten van overerving	267
15.1	Inleiding	267
15.2	Intergenerationele en transgenerationele epigenetische overerving bij proefdieren, de proefopzet	271
15.2.1	Eerste effecten in “outbred” ratten	271
15.2.2	Het eerste muismodel: agouti yellow A^{vy}	272
15.2.3	Een rol voor kleine stukjes RNA (sncRNA) in de transgenerationele overerving.	276
15.2.4	Spelen histonen een rol in de epigenetische overerving?	278
15.2.5	Een onverwachte interactie in de zygote tussen de eicel en de zaadcel	279
15.2.5	Meer muismodellen, angst, reuk en ziekte	280
15.3	Stress gerelateerde epigenetische verschijnselen bij de mens	281
15.4	Van epigenetica naar genetica	283
15.5	Aanwijzingen voor een balans tussen genetische en epigenetische variatie rond methylCpG	284
16	Wat de kunstmatige voortplantingstechnieken ons leren over de reproductie-genetica van de mens	289
16.1	Inleiding	289
16.2	<i>In vitro</i>	294

16.3	Superovulatie	295
16.3.1	Het ontstaan van chromosoomafwijkingen tijdens de klievingsdelingen	297
16.3.2	Superovulatie en de “maternal to zygote” overgang	302
16.4	Vergelijkingen met spontane vruchtbaarheid	304
16.5	<i>De novo</i> mutatie bij ART nakomelingen	306
16.6	Zijn er epigenetische veranderingen bij ART?	310
16.7	Nog meer ART?	312
17	Milieu invloeden	317
17.1	Inleiding	317
17.2	Genotsmiddelen: alcohol, roken en cannabis	318
17.3	Chemische en fysische invloeden	319
17.4	Oxidatieve stress en voeding	321
17.5	Slotopmerkingen	322
18	Van individu naar populatie en weer terug	325
18.1	Het begrip “genetic load”	325
18.2	Hoe gaan we met de belasting van de “genetic load” om?	330
19	Slot	339
19.1	Seksuele reproductie, een wonder	340
	Appendix 1	343
	Nawoord	347
	Verklarende begrippenlijst	351
	Lijst van afkortingen	367
	Referenties	371
	Index	437

Inleiding

Waarom een populair wetenschappelijk boek over voortplantingsgenetica? Omdat voortplanting het centrale thema binnen de biologie en ook de evolutiebiologie is.

Hoe kan een soort blijven bestaan? Het estafette stokje in de vorm van het samensmelten van de eicel en de zaadcel zorgt voor een nieuwe generatie die weer een ronde mag lopen en het stokje kan doorgeven. Wat zit er achter deze beeldspraak en hoe werkt dit? Wat zijn de gevolgen van deze estafetteloop voor de soort? De voortplantingsgenetica zoekt naar antwoorden op deze vragen.

De thema's van de voortplantingsgenetica bevinden zich in het hart van de grote levensvragen: waar kom ik vandaan, wie ben ik en waar ga ik naartoe? Kwesties die niet alleen in het nu voor een bepaald individu opportuun zijn, maar waarbij ook achterliggende en komende generaties een grote rol spelen. De gedachte dat in de tijd voor ons de kiembaan nooit onderbroken is geweest kan je zeker doen duizelen, we zijn bij wijze van spreken zo oud als het leven zelf.

In de voortplantingsgenetica komen een aantal disciplines binnen de biologie samen, celbiologie, moleculaire biologie, genetica, celgenetica, moleculaire genetica, maar ook kwantitatieve en populatiegenetica. Trek je het iets breder dan komen ook anatomie, endocrinologie en de gedragsbiologie in beeld. Hier proberen we het gebied zo in kaart te brengen dat biologie op VWO niveau samen met belangstelling, nieuwsgierigheid en (waarschijnlijk) beroepsmatige betrokkenheid voldoende moeten zijn om in het boek te lezen. In het eerste deel wordt de basis-kennis opgefrist. Hierbij hebben we gebruik gemaakt van handboeken, zoals "Essential cell biology van Alberts et al., (2020) en "Introduction to genetic analysis" van Griffith et al., (2014).

Het boek voert je daarna mee op een reis door de kiembaan, van de bevruchte eicel via de eerste embryonale klievingsdelingen naar het apart zetten van de cellen waaruit later de rijpe

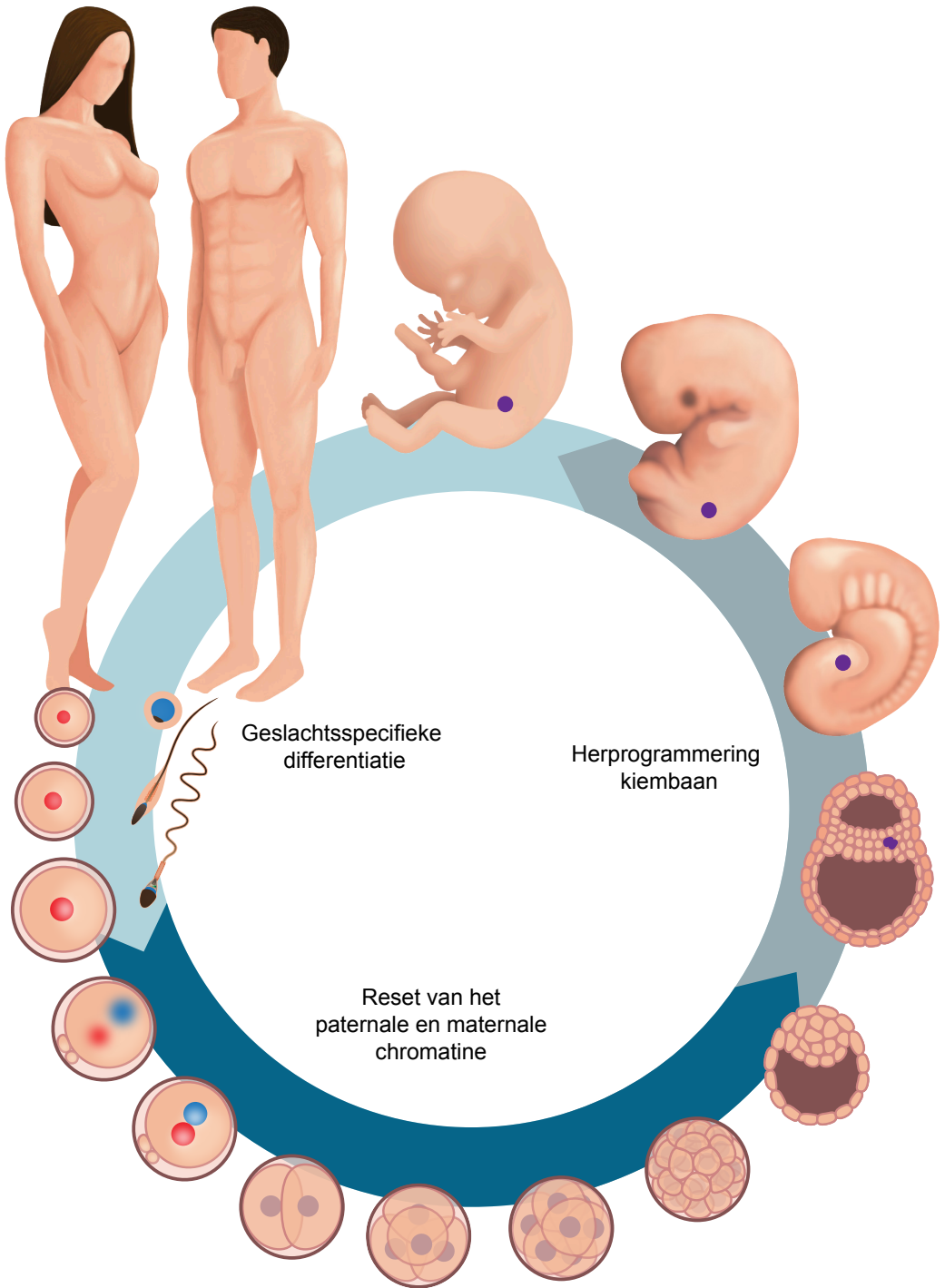


FIG 1

Een impressie van de **kiembaan**, geïllustreerd aan de mens. **Gameten** zijn gespecialiseerde cellen en tegelijkertijd maken ze nieuw leven mogelijk dat eindeloos door kan gaan. Daarvoor is nodig dat vanaf het begin van de bevruchting het **chromatine** wordt “gereset” (H9), er begint een nieuwe ronde van ontwikkeling. Maar voor de kiembaan is dat niet voldoende. Wanneer de nieuwe generatie **kiemcellen**, de **primordiale kiemcellen** net na het innestelen van het **embryo** zijn gedefinieerd (paars, fig 43) volgt er een tweede ronde van “resetten”, waarbij ook de naar herkomst specifieke chromatine merkers (van de vader of van de moeder) worden verwijderd. Deze vallen onder hoofdstuk 10, “**genetic imprinting**”. Later wordt dit chromatine met daarin een kleine maar belangrijke groep van **genen**, weer in de geïmprinte staat teruggebracht. Dit gebeurt tijdens de **oogenese** en de **spermatogenese** en is dan passend bij het geslacht van de drager. Zo wordt bepaald van welke ouder de hierbij betrokken genen in de volgende generatie “aan” zullen staan, de andere kopie staat uit.

eicellen en zaadcellen zullen ontstaan. De verworven inzichten zijn gebaseerd op een scala van onderzoekstechnieken. Ons begrip van de productie van eicellen en zaadcellen, de gameten, is de laatste tien jaar sterk toegenomen. Daarbij worden analyses op het niveau van een enkele cel steeds belangrijker. Ook hier drijft de ontwikkeling van de technologie het onderzoek. We zullen steeds beter gaan begrijpen wat er in de kiembaan moet gebeuren om genen aan en na de bevruchting vooral uit te zetten, en om welke genen het dan gaat.

Hoe worden na het samensmelten van de eicel en de zaadcel en de daaropvolgende ontwikkeling van het embryo, de eigenschappen van de ouders gecombineerd? Hoe vaak ontstaan er veranderingen in het DNA en eventueel het besturingsapparaat van het genetisch materiaal? Wat veroorzaakt deze veranderingen en is dit normaal? Hoe wordt bij het ontstaan van elke nieuwe generatie de klok weer op nul gezet? Wat zijn de invloeden van de kunstmatige voortplanting (IVF) op deze veranderingen in en rond het DNA? Om op al deze deelgebieden van de voortplantingsgenetica houvast te krijgen, heb ik literatuur van de afgelopen tien jaar uitgebreid bekeken. Niet alles omvattend, dat is niet mogelijk, maar geleid door meer dan veertig jaar ervaring met onderwijs en onderzoek op dit terrein. Daar hoort die literatuur bij. Soms is het inzicht dat je uit de wetenschappelijke productie verkrijgt algemeen gedeeld en soms meer persoonlijk. Dit laatste is wellicht wetenschappelijk minder verantwoord maar nog altijd volkomen

legitiem omdat cellen en organismen in contact met hun omgeving zo ongelofelijk ingewikkeld in elkaar steken, er is nog veel te onderzoeken en te leren. Daarnaast kennen we de “splitters” en de “lumpers”. De “splitters” volgen de al lang gebaande paden. Ze rafelen de cel tot in de kleinste onderdelen uit elkaar en proberen dan de functie van elk onderdeel, bijvoorbeeld een eiwit, vast te stellen, en dit min of meer te bewijzen. De “lumpers” proberen er dan weer een geheel van te maken, de holistische visie nastrevend. Vaak tref je op een hoger niveau dan het strikt moleculaire een situatie aan, die in het Engels met “accumulative evidence” (opstapelend begrip), wordt aangeduid. De observaties lijken een bepaalde richting van denken te ondersteunen. Tenslotte kan de “educated guess”, het laagste niveau van wetenschappelijke zekerheid, ook van waarde zijn.

De bedoeling van dit boek is om de complexe gebeurtenissen in de kiembaan, die van generatie op generatie worden herhaald, om te zetten in taal. “Waarom vragen” zullen hierbij onontkoombaar zijn. Deze zijn vaak lastig in de biologie. “Nothing in biology makes sense except in the light of evolution” poneerde de met fruitvliegsoorten werkende Oekraïens-Amerikaans geneticus, insectenkundige en evolutiebioloog Theodosius Dobzhansky aan het eind van zijn leven in 1973. Alle reden om het gebied hier in te perken tot de zoogdieren muis, soms rund en varken, maar met speciale aandacht voor de mens. Onderzoeksgereedschappen, methodieken en uitkomsten van wetenschappelijke experimenten nemen sterk in omvang toe. Dat heldert op maar opent ook weer nieuwe doorkijkjes van verwondering. Daarom is veel van de uitspraak van Dobzhansky mijns inziens nog steeds waar.

Voor de genetica geldt zeker dat het ook een taal is. Begrippen moeten goed gedefinieerd zijn en in 1972 bestond er al een “genetisch woordenboek”. Nu vind je al deze begripsomschrijvingen of definities aan het eind van de handboeken in de zogenaamde “glossary”. Deze aanpak hanteer ik ook hier. Bij eerste verschijnen in een hoofdstuk worden ze **vet** aangegeven. Ze zijn zoveel als mogelijk gebaseerd op de eerder vermelde wetenschappelijke tekstboeken, “Griffiths” en “Alberts”. In de aan het eind van het boek per hoofdstuk en tekstbox gegeven literatuurlijsten zijn de publicaties die belangrijk en/of inspirerend zijn met een asterisk gemerkt. Daaronder vallen ook de publicaties die zijn gebruikt voor de figuren en de tabellen. Hoe inzicht zich historisch ontwikkeld heeft komt in de hoofdstukken zeker aan bod. Dat kan verhelderend zijn, omdat de toepassing in de sfeer van de biotechnologie niet zelden de neiging heeft op het biologisch-genetisch inzicht vooruit te lopen. Uitkomsten anders dan in de gedachte richting treden bij de zogenaamde translationele wetenschappen ook vrij frequent op. Dit boek is niet primair geschre-

ven voor een direct gebruik in het onderwijs, maar het kan er heel goed voor worden gebruikt, in acht nemend dat bijvoorbeeld door het steeds bredere gebruik van DNA basenvolgordebepalingen de kengetallen voor genetische variatie en mutatie in de populatie steeds exacter zullen worden. Dit is maar één voorbeeld van de technologische revolutie in met name het celbiologische onderzoek. Hierdoor ontstaan grote databestanden, waarvan de essentie niet altijd makkelijk te communiceren is. De illustraties zijn een goede start en het boek leent zich voor het ernaast maken van een reader voor studenten. De termen uit de verklarende begrippenlijst zijn vet weergegeven wanneer ze voor het eerst in een tekstdeel (ook in legenda) opduiken.

Eind jaren 60 van de vorige eeuw startte mijn op de voortplanting gerichte onderzoeksactiviteit met het rund, daarna varken en muis; ik was veeteeltstudent in Wageningen. Vanaf 1971 was de aandacht jarenlang voornamelijk muis georiënteerd totdat eind 90-er jaren de mens in beeld kwam. Tenslotte richtte ik me alleen nog maar op onze eigen soort. Dat kwam natuurlijk doordat de voortplantingsgenetica zich vooral via de zich alsmaar uitbreidende betekenis van In Vitro Fertilisatie in de maatschappij nestelde en op toepassing gerichte onderzoeksvragen en -mogelijkheden zich uitbreidden. Maar niet alleen daardoor. Neem een van onze kwaliteitskranten en knip daar elke week uit wat een raakvlak heeft met het onderwerp. Vele weken is het raak, met een piek in de berichtgeving rond de publiekmaking van de eerste via de CRISPR/Cas techniek aangebrachte genetische veranderingen in de kiembaan van de mens, november 2018. Maar vragen ontstaan ook door het uitstellen van het realiseren van de kindwens, waarbij veroudering een cruciale rol speelt. En wat is er aan de hand met zaadcelproductie? Dat haalt de columns van onze kwaliteitskranten. Via de ruim besproken afnemende trend in de mannelijke vruchtbaarheid kom je zijdelings in de reproductie toxicologie terecht, niet alleen relevant voor de zaadcelvorming maar vrij zeker ook voor de eicelvorming. Het boek maakt ook uitstapjes richting het opsporen van verre verwanten en naar de paleobiologie, de reconstructie van ons recente evolutionaire verleden. Daar bovenop komen de steeds maar toenemende ambities in de wereld van de kunstmatige voortplantingstechnieken waarin vrij gemakkelijk een parallel met het boek "De tovenaars en de profeet" van Charles Mann (2018) valt te ontdekken. De biotechnoloog staat daarin als tovenaars tegenover de profeet, die de spontane vruchtbaarheid als vertrekpunt neemt.

De voortplantingsgenetica is een gebied met vele gezichten en aspecten, waarvan de meerderheid vanaf 1968 wel eens aan mij voorbij is gekomen. Wat is het beeld dat opdoemt wanneer je probeert deze zoveel als mogelijk met elkaar in verband te brengen? Leidt dat tot een groter biologisch begrip? Dat te onderzoeken is de eigenlijke bedoeling die ik met dit boek heb.

Een plaatje zegt soms meer dan 1000 woorden. Marc Maas, kind aan huis in de genetica en wetenschappelijk illustrator, heeft zijn talent willen aanspreken om het gat tussen de wetenschappelijke handboeken en populair wetenschappelijk schrijven, op te vullen. Wij wensen u een onderhoudende en inspirerende tocht door de kiembaan met een open oog voor al het wonderbaarlijke dat zich daar afspeelt.

DEEL I
BASIS
ERFELIJKHEIDSLEER

Impressie van een cel

Het lichaam bestaat uit een astronomisch aantal cellen, voorkomend in meerdere honderden van celtypen. Voor een mens van 75 kg wordt dit aantal op $37,2 \times 10^{12}$ geschat. Eén speciale groep van cellen uit deze enorme populatie staat in dit boek centraal. Dit zijn de cellen van de **kiembaan**, die de **gameten** (eicellen en zaadcellen) produceren waarmee de generaties verbonden worden. Deze cellen zijn al aanwezig tijdens de embryonale en foetale ontwikkeling en komen na de geboorte tijdens groei en volwassenheid in verschillende gedaanten voor, nodig om in een schier eindeloos aantal herhalingen de generaties door de tijd heen in elkaar over te laten gaan. De mannelijke en vrouwelijke kiembaancellen hebben natuurlijk hun eigen functie, maar in een aantal opzichten doorlopen ze vergelijkbare processen, waarin de eicel uitgroeit tot de grootste cel in het lichaam en de zaadcel tot de kleinste. Is een gemiddelde lichaamscel zo'n $3000 \mu\text{m}^3$ groot, een zaadcel is 10 x zo klein en een eicel 1300 keer zo groot (een μm is $1/1000$ mm).

Ondanks jaren van onderzoek begrijpen we nog steeds niet alles van de processen die cellen doen functioneren als de kleinste zelfstandig levende eenheid van onze weefsels en organen. Ook weten we nog verrassend weinig over de mechanismen die cellen gebruiken om vitaal te blijven en flexibel te reageren op de immer veranderende omstandigheden in hun leefomgeving. In het afscheidscollege dat professor Bé Wieringa, hoogleraar celbiologie aan het Radboudumc te Nijmegen, op 1 juni 2018 hield, kwamen naast vele bekende aspecten de lacunes in onze kennis omtrent cellen ruimschoots aan bod. Ook werd ons een blik gegund in mogelijke richtingen van toekomstig onderzoek. Zijn verhaal begon met het laten zien van de chemische formule van de samenstelling van het menselijk lichaam: deze is te schrijven als $\text{C } 10^{27}$; $\text{H } 10^{27}$; $\text{O } 10^{27}$; $\text{N } 10^{26}$; $\text{P } 10^{25}$; $\text{S } 10^{24}$; $\text{Ca } 10^{25}$; $\text{K } 10^{24}$; $\text{Cl } 10^{24}$; $\text{Na } 10^{24}$; $\text{Mg } 10^{24}$; $\text{Fe } 10^{23}$; $\text{F } 10^{23}$; $\text{Zn } 10^{22}$; $\text{Si } 10^{22}$;

Cu 10^{21} ; B 10^{21} ; I 10^{20} ; Sn 10^{20} ; Mn 10^{20} ; Se 10^{20} ; Cr 10^{20} ; Ni 10^{20} ; Mo 10^{19} ; Co 10^{19} ; V 10^{19} . Met een beetje rekenen kom je dan op ongeveer 10^{15} atomen per cel, chemisch verbonden in een ongelofelijk groot aantal soorten moleculen die samen het leven bepalen. Naast de alomtegenwoordige koolstof, waterstof, zuurstof en stikstof zijn fosfor, zwavel, calcium, magnesium, natrium en kalium hierin rijk vertegenwoordigd. De minder talrijke elementen noemen we sporenelementen. Dat deze minder voorkomen betekent niet dat ze minder belangrijk zijn. Zo worden zink (Zn) en selenium (Se) vaak in verband gebracht met de kwaliteit van de zaadcel (H17.4).

Figuur 2 laat een wat artistieke en extreem vereenvoudigde impressie van een cel zien. Hierin vallen allereerst de prominente wanden rond de cel zelf en rond de celkern op. Deze wanden bestaan uit membranen gevormd door een hechte dubbellaag van verschillende soorten lipiden, met fosfolipiden, glycolipiden en cholesterol als de meest voorkomende. Membranen spelen in veel activiteiten van de cel een rol, hun belangrijkste taak is niet alleen om een afscheiding te vormen, maar ook om communicatie en transport tussen binnen- en buitenmilieu mogelijk te maken. De kern, opslagplaats voor ons erf materiaal (het **DNA**) en het organisatie- en stuurcentrum van de cel, heeft hiervoor zelfs een dubbele membraan met bijzondere aanpassingen. Om transport tussen de kern en de rest van de cel te faciliteren bezit deze kernvelop poriën (fig 2) waardoor ook grote molecuulstructuren vanuit de kern de cel in getransporteerd kunnen worden. Rond en in de cel vind je veelal enkelvoudige membranen, zoals terug te vinden in de **organellen**, compartimenten met gespecialiseerde functies. Iedere cel bezit er meerdere soorten van. Zo kennen we o.a. het endoplasmatisch reticulum (fig 2), betrokken bij synthese en modificatie van eiwitten, het Golgi apparaat (fig 2), een soort sorteer- en transportstation van de cel (en betrokken bij het lipidemetabolisme) en de peroxisomen en lysosomen. De laatste twee zorgen voor respectievelijk oxidatieve omzettingen en de afvalverwerking in de cel. Opmerkelijk is dat de mitochondriën (fig 2), de energiefabrieken van de cel, die ook betrokken zijn bij andere metabole omzettingen en zelfs de regulatie van celdood (**apoptose**), weer wel een dubbele omhulling dragen.

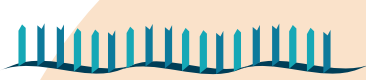
Vorm en functie van de cel worden verder ook nog eens gesteund door een inwendig skelet, met uiterst flexibele eigenschappen (fig 2). Dit skelet stuurt dynamiek en beweging van de cel en heeft een bijzonder belangrijke rol bij de celdeling. Ieder van deze onderdelen van de cel is inmiddels al uitgebreid met een veelheid aan technieken bestudeerd.

Toch is onze kennis van wat zich afspeelt in het vloeibare en vaste milieu van het binnenste van de cel, het **cytoplasma**, de kern en de organellen nog verre van compleet. Om een cel in

leven te houden moet er namelijk voortdurend een lichte mate van “uit evenwicht” bestaan, af te lezen aan de concentratie en het gedrag van die enorme aantallen moleculen (**RNAs**, eiwitten, lipiden, suikers, ionen etc.). Er is dus permanent sprake van een enorme dynamiek in de moleculaire samenstelling binnen en tussen de celcompartimenten, een dynamiek die zich ook openbaart in de communicatie tussen het milieu buiten de cel en het “milieu interieur”. Dit geeft een complexiteit die nauwelijks te bevatten is en “bevroren” illustraties van de locatie en de vaak enorme hoeveelheden verschillende soorten moleculen zoals aangegeven in figuur 2 zijn natuurlijk een verregaande vereenvoudiging van de werkelijkheid.

Het is druk in een cel, vreselijk druk. In het Engels wordt dit ook wel aangeduid met de term “molecular crowding”. Om alleen al een cel functioneel en vitaal te houden is expressie van een groot aantal genen nodig. Recente schattingen geven aan dat de **RNA** en eiwitproducten van ~3000 tot ~7000 van de ongeveer 20.000 voor eiwit coderende **genen** die een mens (en andere zoogdieren) heeft, betrokken zijn bij het overleiden van basale functies van iedere cel. Van ieder eiwit coderend gen worden daarbij vaak meerdere typen boodschapper RNA (**messenger RNAs**, box 1) gesynthetiseerd en worden deze mRNAs tot soms wel honderden of duizenden keren, door ribosomen, in eiwit vertaald (fig 2, box 1). Alleen al daarvoor bezit iedere cel een enorme synthesecapaciteit, in de vorm van gigantische aantallen ribosomen in het cytoplasma en op het endoplasmatisch reticulum (fig 2). Het totale aantal **mRNA** moleculen wordt geschat op meer dan 3×10^5 en resulteert na vertaling in een gemiddelde productie van ruwweg 10 miljard stuks eiwitmoleculen binnen iedere cel (fig 2, box 1). Zo'n 10% daarvan vinden we uiteindelijk in de celwand terug. Het hier geschetste beeld geeft echter alleen een gemiddelde indruk. Afhankelijk van het type cel en haar specialisatie worden ook nog celspecifieke genproducten gemaakt. De hier genoemde aantallen RNAs en eiwitten kunnen dus aanzienlijk afwijken en zelfs vele malen groter zijn. De complexiteit van dit alles wordt niet alleen in aantallen, maar ook in soorten van eiwitten verder uitgebreid omdat door een zeer groot percentage van onze genen meerdere eiwitvarianten kunnen worden gecodeerd (o.a. door zogenaamde alternatieve mRNA splicing, box 1, fig 9). Daarom bevatten de hiervoor genoemde 20.000 genen in ons erf-materiaal de informatie voor een veelvoud van verschillende typen eiwit. Elders in het genoom worden de codes voor bijzondere klassen van kleine eiwitten (tot ongeveer 100 aminozuren lang) gevonden. Ze zijn nog lang niet allemaal bekend maar wel van biologisch belang. Ook worden vele eiwitten vaak nog gemodificeerd door er, al dan niet tijdelijk, allerlei chemische groepen aan te hangen en zo hun functie of levensduur te sturen. Bekende voorbeelden uit de meer dan 50 reacties die hiervoor bekend zijn, zijn o.a. fosforylering, methylering, acetylering,

Cell inhoud $\approx 3000 \mu\text{m}^3$
Doorsnede $\approx 20 \mu\text{m}$



$>3 \times 10^5$ RNA moleculen



6×10^9 bp DNA



2×10^9 eiwitten



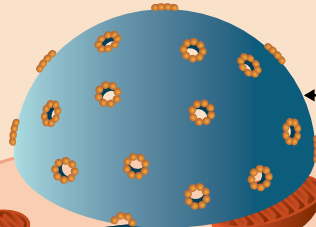
10^{11} fosfolipide moleculen



6×10^{13} water moleculen



10^6 ribosomen



Celkern

Ribosomen

Nucleolus

Endoplasmatisch
reticulum

Golgi
apparaat

Mitochondriën

Celmembraan

Cytoskelet

FIG 2

Sterk geschematiseerde impressie van een cel. In de kern heeft het rode **chromatine** een hogere dichtheid dan het licht blauwe (zie ook fig 7). De **nucleolus**, het kernlichaampje waarin zich het ribosomale **RNA** na transcriptie verzamelt (en wel een hoge dichtheid heeft) is aangegeven. De ribosomen op het endoplasmatische reticulum zijn geel. De weergave van het cytoskelet in groen is sterk schematisch en onvolledig. Het grote aantal fosfolipide moleculen onderstreept het belang van membraanstructuren voor de cel.

ubiquitineren, glycosylering, hydroxylering en sumoylering. Vele eiwitten doen namelijk niets in hun eentje en functioneren alleen samen met andere eiwitten in samengestelde complexen en ook werken ze vaak alleen maar op tijdelijke basis. Dit dynamische samenwerkingsgedrag en op die manier de biologische werking van het hele complex, wordt voortdurend door het aanbrengen en verwijderen van de genoemde chemische modificaties (die op hun beurt weer door de enzymatische activiteit van andere eiwitten worden uitgevoerd) gestuurd. Nog een andere invalshoek om de duizelingwekkende complexiteit van een cel mee aan te geven, is dat bij alle chemische processen die tezamen het **metabolisme** van de cel verzorgen, rond de 10.000 verschillende kleinmoleculaire organische en anorganische stoffen betrokken kunnen zijn.

Gezamenlijk zorgt deze niet voor te stellen hoeveelheid en variatie van moleculen voor handhaving van de coördinatie en balans in het doen en laten van de cel, inclusief de evenwichten binnen en tussen cellen. Dit natuurlijke fysiologische evenwicht wordt ook wel aangeduid met de term "**homeostase**". In de regulatie van deze homeostase zijn soms best brede marges mogelijk. Waar enerzijds strikte regels lijken te bestaan voor de tijdsfasering en hoeveelheid productie van sommige genproducten, lijkt de aanmaak en het gebruik van vele RNAs en eiwitten soms best een toevalsproces. Ook wanneer een cel hierdoor ontregeld en gestrest raakt is dat niet persé meteen fataal. Cellen hebben namelijk allerlei manieren om zich tegen stress te verweren, waardoor ze weer in balans komen. Een te grote mate van gelijkvormigheid in actie en interacties in de cel en met de omgeving is zelfs niet goed. Als er helemaal geen subtiele balansverstoringen en gradiënten van moleculaire concentraties zouden bestaan (tussen microcompartimenten in de cel en tussen binnen en buiten), stroomt of beweegt er niets en zou een cel morsdood zijn. Er is voortdurend actie en beweging en daarom leven!

Gestuurd door de techniek heeft het zonet beschreven inzicht geleid tot grote veranderingen in het celbiologisch onderzoek. Een voorbeeld: meer en meer wordt momenteel het fysisch chemische milieu tot in de kleinste uithoeken van de cel bestudeerd. Het gaat daarbij om de reactie op mechanische krachten, de aanmaak, verdeling en het gebruik van energiedragende verbindingen en de vreemde interacties die moleculen lokaal in de cel met elkaar kunnen hebben, waar door de ongelofelijke dichtheid aan moleculen geen plaats meer is voor water. Zo is sinds kort bekend dat er in dergelijke omgevingen “crowd control” nodig is om de drukte te beteugelen, vergelijkbaar met de maatregelen die werden afgekondigd om de Covid-19 pandemie beheersbaar te houden. Ook worden er met nieuwe moleculaire en microscopische technieken geheel nieuwe soorten associaties tussen RNA moleculen en eiwitten waargenomen, waarbij een zogenaamde fase transitie van vloeibaar naar vast optreedt en er kleinschalige aggregaten of membraanloze organellen (“biomoleculaire condensaten”) worden gevormd. Hierbinnen gelden chemische reactie-omstandigheden waar we nog niet zoveel van begrijpen. Een voorbeeld hiervan is het sinds de begintijden van de microscopie bekende kernlichaampje, de **nucleolus** als fabriek voor de aanmaak van onderdelen van ribosomen (fig 2), die op hun beurt weer essentieel zijn voor de eiwitsynthese. Het voordeel voor de cel van dergelijke verdichte structuren is dat bepaalde belangrijke reacties lokaal heel snel en efficiënt kunnen verlopen.

Een ander meer intensief bestudeerd nieuw fenomeen binnen de celbiologie betreft het multi inzetbaar zijn en het flexibele gedrag van RNA- en eiwitmoleculen, te vergelijken met de trend in de huidige maatschappij dat bij een lager uurloon één enkele baan niet meer voldoende is. Soms gaat het daarbij om moleculen die evolutionair oud zijn en over de tijd meerdere biologische functies hebben gekregen. Ook kan het gaan om eiwitmoleculen die niet meer een eenduidige 3-dimensionale vorm hebben. Ze kunnen hun werkzame gedaante aannemen wanneer actie vereist is, “alsof sleutel en slot passend worden gemaakt wanneer je de deur opendraait”, zoals Wieringa het in zijn afscheidsrede formuleerde. Ook voor de populatie van RNAs in de cel worden nog bijna maandelijks nieuwe functies beschreven. Zo kennen we tegenwoordig naast de drie klassieke types RNAs, r(ibosomaal) RNA, t(ransfer) RNAs en m(essenger) RNAs (box 1, fig 9) vele nieuwe vormen van RNA, zoals de s(hort) en l(ong) n(on) c(oding) RNAs en de circulaire RNAs, waarvan de functies nog bij lange na niet volledig zijn opgehelderd.

Uit het voorgaande zal duidelijk zijn dat de variatie in de moleculaire inhoud van cellen, zelfs binnen een populatie van één soort die er op het oog ongeveer gelijk uit zien, enorm kan zijn. Wanneer afwijkingen te groot worden waardoor één individuele cel binnen de populatie over de rand valt en door het proces van natuurlijke geregleerde celdood (apoptose) sterft, is dat

geen ramp. In multicellulaire organismen kunnen omgevingscellen uit een weefsel of orgaan dit makkelijk opvangen. Dit alles geldt ook voor de gameten, maar daar heeft het begrip kwaliteit toch wel een andere en vaak beslissende lading. Dat komt in deel II aan bod. Laten we ons eerst richten op de structuur en functie van de celkern, de directieruimte, waar ons DNA, ingebed in het **chromatine** van de **chromosomen** ligt opgeslagen (fig 2) en van waaruit alle genoemde levensfuncties worden aangestuurd (H2).

Chromosomen

2.1 Inleiding

Om vier redenen zijn **chromosomen** zo geweldig boeiend. Ten eerste functioneren ze als *het* kenniscentrum van de cel en collectief van het individu (H1); ten tweede dienen ze als fysiek podium voor het reguleren van de beschikbaarheid van genetische informatie (box 1) voor de cel (en dus voor het organisme) en ten derde kunnen chromosomen zichzelf kopiëren om de informatie door te geven naar dochtercellen en naar een volgende generatie. Hiervoor moeten ze transportabel zijn, d.w.z. dat ze zichzelf samen moeten kunnen trekken en een gespecialiseerde structuur moeten hebben, het **centromeer**, waaraan tijdens de celdeling getrokken kan worden (fig 3). Tenslotte kunnen de identieke types chromosomen verkregen van vader en moeder (de **homologen**) elkaar in de **kiembaan** vinden ter voorbereiding van de reductiedelingen op weg naar de **haploïde gameten**, een proces dat bekend staat als **meiose** (H5, fig 13).

Het aantal chromosomen van een enkele set wordt aangeduid met het symbool N (het haploïde aantal, fig 12). Dit getal varieert tussen de levensvormen, is soortspecifiek en varieert dus ook tussen zoogdieren. Deze set bevat bij de mens een dikke 3×10 miljard **DNA** basen. Een **diploïde** kern bevat $2N$ chromosomen: 46 bij de mens, 38 bij het varken, 40 bij de muis en 60 bij het rund. Dit maakt relatief weinig uit voor de totale hoeveelheid DNA per kern die tussen deze soorten niet veel verschilt.

2.2 Chromosomen tijdens de celcyclus

2.2.1 De celcyclus

Cellen worden over perioden gekenmerkt door een grote delingsactiviteit. Dat wil zeggen dat ze een actieve celcyclus hebben die aan regulatie onderworpen is, een aparte tak in de celbiologie. Het gaat er hier om een aantal begrippen te introduceren, waar we later bij het doorlopen van de kiembaan plezier van hebben. In figuur 4 wordt de celcyclus op de gebruikelijke leerboekachtige manier weergegeven.

Na een deling kan een cel al dan niet op geleide van de omgeving besluiten dat het mooi geweest is. Terminaal gedifferentieerde hersencellen en spiercellen zijn hier voorbeelden van. De **genen** die nodig zijn om dochtercellen te produceren worden uitgeschakeld.

Wanneer zojuist geproduceerde dochtercellen niet weten wanneer er weer delingsactiviteit plaats vindt (maar die mogelijkheid open houden) bevinden ze zich in het G0 stadium van de celcyclus (fig 4).

Vorbereidingen om het DNA te verdubbelen zijn even niet aan de orde. Een G1 dochtercel heeft die twijfel niet en maakt zich meteen op voor de volgende celdeling. Een beetje vooruitlopend op het ontstaan van **mutaties**: cellen hebben detectiesystemen voor het opsporen van problemen in het DNA in zijn algemeenheid, voor onregelmatigheden tijdens de DNA verdubbeling en voor de afwezigheid van een correcte verbinding tussen de chromosomen *i.c.* de **chromatiden** (een naam voor de gedupliceerde chromosomen voorafgaand aan de celdeling) en de **spoelfiguur** (fig 3, 4). In de literatuur spreekt men van “checkpoints”.

Detectie van DNA schade (een breed begrip, zie fig 33) activeert zo'n checkpoint en leidt tot het “bevrozen” van de celcyclus: het repareren van de DNA schade heeft voorrang, reparatie gaat voor progressie. In deel II zullen we zien hoe de checkpoints in de kiembaan functioneren, DNA herstel is ook daar actief.

Wanneer de schade door de cel als onredelijk groot wordt beoordeeld kan tot euthanasie worden besloten, zelfstandig of op bevel van de buren uit te voeren. Dit verschijnsel staat bekend als **apoptose** (H1). Een eiwit dat bij deze beslissing een belangrijke rol speelt heeft de codenaam p53 (fig 4). P53 is een **transcriptiefactor** (box 1) en kan dus bijdragen aan het “aan” zetten van genen ter bepaling van de volgende stappen. Transcriptiefactoren, eiwitten die direct of indirect via andere eiwitten, binden aan de **promotor** regio van het **gen** (box 1), werken nooit

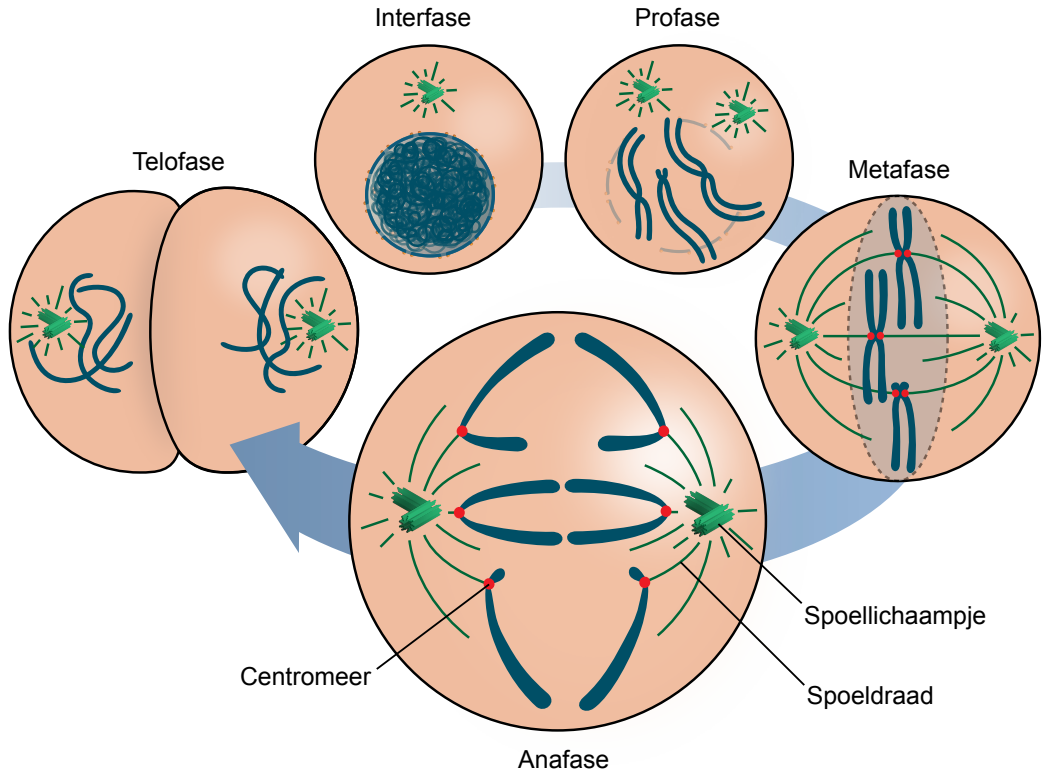


FIG 3

Een visuele weergaven van de celcyclus met een nadruk op de stadia (fasen) waarin de **chromosomen** door spiralisatie van het **chromatine** zichtbaar zijn; de **mitose** is begonnen. Als eerste verschijnt vanuit de interfase de profase. De **centromeren** voor de aanhechting van de **spoelfiguur** zijn rood. De spoelfiguur wordt mede georganiseerd vanuit de spoellichaampjes of centriolen, de “peper en zoutbus” achtige structuren die de polen van de celdeling definiëren (groen). Wanneer de chromosomen door de werking van de spoelfiguur in het scheidingsvlak van de deling zijn aangekomen spreekt men van de metafase van de celcyclus. Bij het loslaten van de **chromatiden** bij de centromeren is de anafase van de celcyclus aangebroken. Het stadium waarin de chromosomen nog zichtbaar zijn, kort voordat er een nieuwe kernmembran wordt gevormd, staat bekend onder de naam telofase. In de **kiembaan** gaat een kerndeling altijd gepaard met een deling van het **cytoplasma**.

in hun eentje (box 1). Dat verklaart mede waarom p53 aan kan sturen op zowel DNA herstel als apoptose, het hangt af van de partners. Wanneer p53 de kant kiest van het behoud van de cel, wordt de celcyclus machinerie in de G1 stopgezet, totdat het DNA gerepareerd is (fig 33). Het sein staat op groen en de DNA **replicatie** kan beginnen.

Deze stap in de kwaliteitscontrole staat bekend als het G1-S controlepunt (fig 4). Wanneer de schade wordt opgemerkt of aangericht terwijl het DNA wordt gerepliceerd, wordt p53 eveneens ingeseind dat er met betrekking tot leven of dood weer een besluit genomen moet worden. Bij een situatie waarin het ongeluk toeslaat tijdens de G2 fase is het in stelling brengen van het hele delingsapparaat een riskante operatie (fig 4). Ook nu wordt een pauze ingelast. Het sein tot het treffen van de voorbereidingen voor de **mitose** wordt uitgesteld tot het chromosomale DNA weer op orde is. Een laatste risicofase in het doorgeven van de juiste genetische informatie naar de dochtercellen is de deling zelf (fig 3, 4). Een eiwitcomplex, het “anaphase promoting complex” (APC) vervult een centrale rol in het voorkomen van een foute verdeling van de chromatiden (fig 3, 4) over de dochtercellen. Het checkpoint zelf wordt “spindle assembly checkpoint” (SAC) genoemd.

Wanneer er een mankement is in de verbinding van ook maar één chromatide met de trekdraden van de spoelfiguur (fig 3), wordt de deling bevroren, totdat die verbinding weer is hersteld. Een enkele keer gaat het toch mis en mist er een chromosoom in een dochtercel. Vaak heeft de andere dochtercel dan een extra kopie van dat chromosoom. Dit verschijnsel staat bekend als **non disjunctie**.

2.2.2 Het kopiëren van het DNA ter voorbereiding van de celdeling

Dat deel van de celcyclus dat zich met het verdubbelen van het genetisch materiaal bezig houdt wordt S-fase (van synthese) genoemd (fig 4). De tijd die een cel nodig heeft om het DNA te kopiëren is minimaal een uur of 5 en al gauw zo'n 8 uur, het kan behoorlijk variëren. De replicatievork (fig 5) verschuift met een snelheid van 100 basen per seconde. De replicatie moet om binnen dit tijdsbestek te blijven per chromosoom op vele plekken gelijktijdig beginnen, anders zou het kopiëren van het DNA dagen duren. Dat starten gebeurt clusterwijs dat wil zeggen dat de DNA polymerase machine (fig 5) op naast elkaar gelegen **chromatine** lussen (de “looped domains” en zo TADs van fig 7) synchroon geactiveerd wordt.

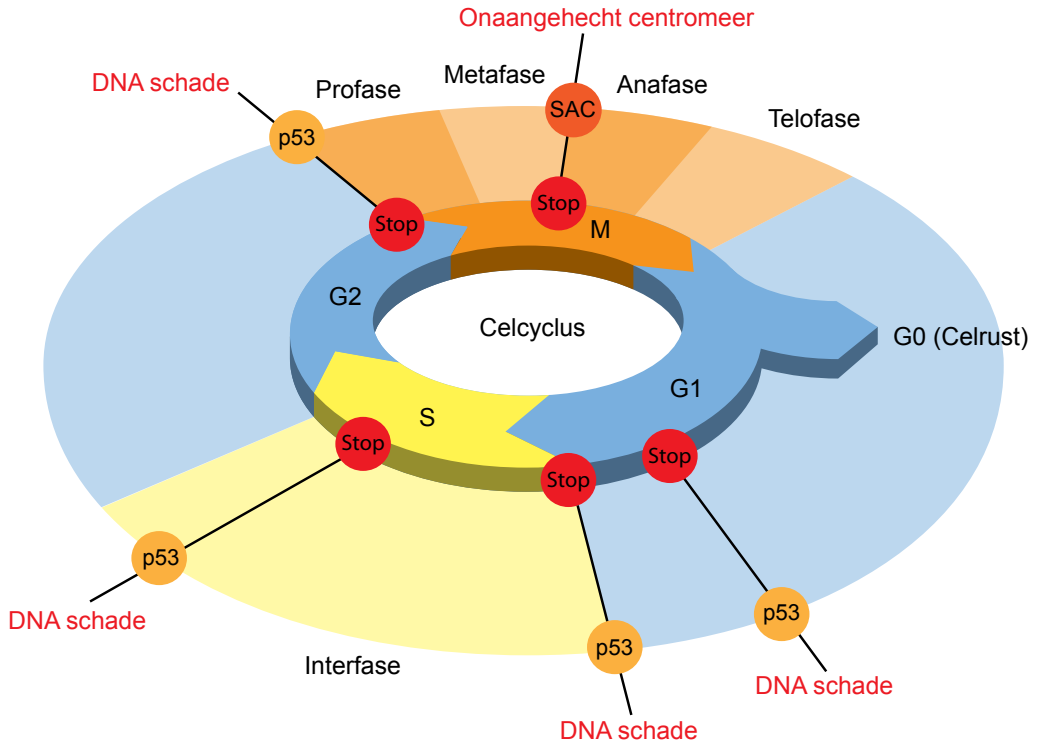


FIG 4

De celcyclus, maar nu met een nadruk op de interfase (G1, S en G2) waarin het verdubbelen van het **DNA** tijdens de S (van synthese) fase het bepalende element is. G staat voor “gap” en M voor de kerndeling, de **mitose** (fig 3) die samen met de deling van het **cytoplasma** resulteert in twee dochtercellen. De checkpoints waarin de **transcriptiefactor** p53 zo'n grote rol speelt zijn aangegeven. P53 wordt ook wel omschreven als een politiemann (zie ook fig 33). De representatie van de stadia van de celcyclus is niet representatief voor de tijdsduur, die voor de G1 en S variabelen zijn dan voor de G2 (korter) en M (nog korter). Voor zeer actief delende cellen is een cyclus van 12 uur mogelijk, maar meestal is dit langer. Een niet met de **spoelfiguur** verbonden centromeer brengt via het inactiveren van het “anaphase promoting complex” (APC) het “spindle assembly checkpoint” (SAC) in actie.

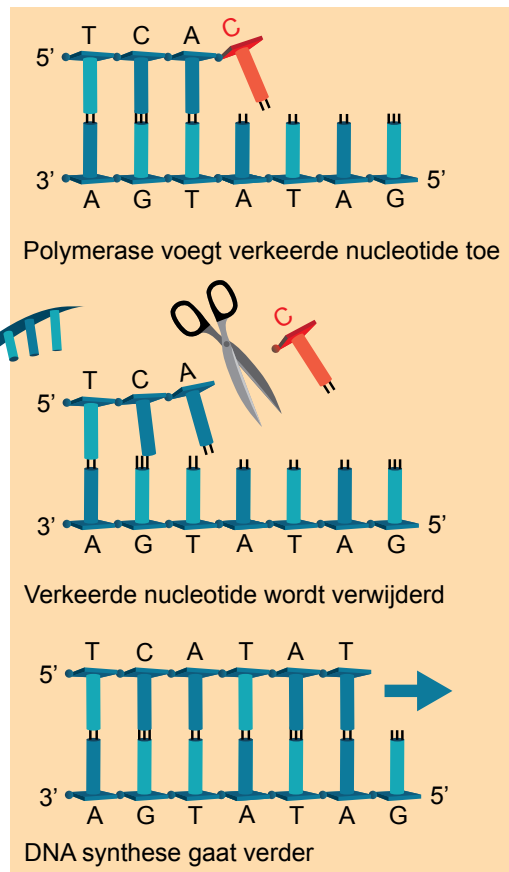
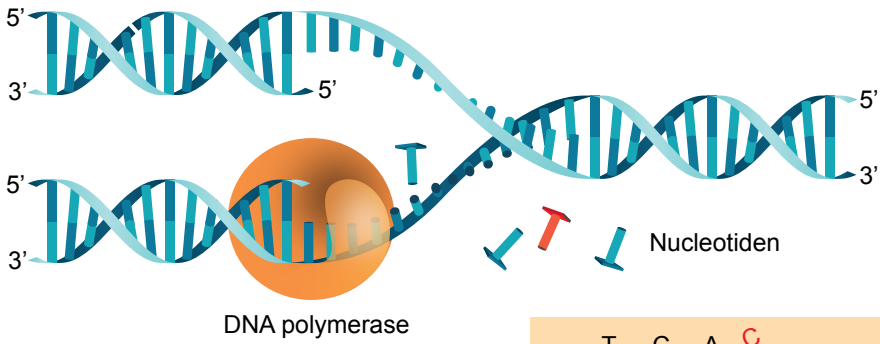


FIG 5

De **replicatie** van **DNA**. De ketens van de **nucleotiden** in DNA (en **RNA**) hebben polariteit. Deze wordt aan de einden aangegeven met een 3' en een 5', een notatie die is af te leiden uit de moleculaire structuur. Het DNA polymerase dat bij de replicatie de nucleotiden aaneen rijgt kan die er alleen aan het 3' eind aanzetten. Omdat het voor de paring van de complementaire basen A-T en C-G nodig is dat de ketens van de DNA dubbel helix tegengesteld lopen, werkt in de replicatievork het DNA polymerase ook in twee richtingen. Het polymerase volgt het ontwinden van de dubbele helix in enkelstrengs DNA. Het vermogen van het DNA polymerase tot "proofreaden" *i.e.* het direct corrigeren van een verkeerd geïncorporeerde base (nucleotide) is te belangrijk om het hier niet weer te geven.

Kopiëren gaat nooit helemaal zonder fouten. Geef een theaterbezoeker links op de vol bezette eerste rij een korte zin en vraag aan die persoon die fluisterend door te geven en zo verder. Vervolgens haal je de zin rechts voor weer op. Grote kans dat er dan weinig van over is. Dan doet het DNA kopieersysteem van de cel het heel veel beter, of het nu de darmbacterie *Escherichia (E) coli* is of een cel van een zoogdier.

Het DNA polymerase leest het te kopiëren enkelstrengs DNA molecule en bouwt een T nucleotide in tegenover een A en een A tegenover een T. *Mutatis mutandis* pakt het polymerase een C wanneer het in de te kopiëren streng een G ziet een vice versa een G wanneer in de te kopiëren code een G staat (fig 5). Daarbij maakt het een fout per 100.000 koppelingen. Dat wordt in 99 van de 100 gevallen herkend door een ander deel van hetzelfde eiwit, dat dan voor herstel zorgt (fig 5). Die frequentie van 1 op de 10 miljoen is biologisch nog steeds niet acceptabel. Zelfs een eenvoudig organisme zoals de bacterie *E coli* beschikt al over een reparatiesysteem dat de naam "**mismatch repair**" (MMR) draagt (fig 33). Het reageert op een verkeerd geïncorporeerd nucleotide, bijvoorbeeld een C tegenover een A in plaats van een T en heeft alle evolutionaire woelingen overleefd: alle zoogdieren (ook wij) hebben het. Weer wordt 99% van de fout geïncorporeerde nucleotiden gecorrigeerd. Hoe het systeem de zonet verkeerd gekozen base kan onderscheiden van de te kopiëren matrijs (of "template"), die de goede informatie bevat, is bij zoogdieren nog steeds niet volledig duidelijk. Blijft over dat het kopiëren in 1 op de miljard basen een fout resultaat oplevert. Dat zijn er 3 per **genoom** dus 6 voor een diploïde cel per

celdeling. Kennelijk is hier goed mee te leven. Het MMR systeem komt verderop in dit boek een aantal keren langs vanwege het grote belang ervan in de kiembaan.

Wanneer de chromosomen zijn gekopieerd blijven de zusterchromatiden in innig contact met elkaar verbonden (fig 3, 6). Al vóór de chromosomen worden gekopieerd is er een eiwitcomplex aanwezig dat structuur geeft, denk aan een ruggengraat (fig 7). In het onderzoek naar de kernstructuur en de robuustheid van chromosomen in die kern (zie hierna) speelt het zogenaamde **cohesine complex** (fig 6) een steeds grotere rol. Tijdens het kopiëren houdt het uit 4 eiwitten bestaande ringvormige complex de beide zusters bij elkaar. Wanneer dit complex niet zo'n grote rol zou spelen in de kiembaan zou het hier niet geïntroduceerd worden.

2.3 De chromatinestructuur van de kern

2.3.1 Inleiding

Wanneer je net na de deling van een diploïde cel de DNA moleculen van elk chromosoom van de mens zou kunnen isoleren, uitstrekken en ze allemaal achter elkaar aan legt, komt je op een totale lengte van 2 meter DNA per kern. Deze lengte zit opgesloten in een bolletje met een doorsnee van 5-8 μm : vergelijk het met 2 km draad in een tennisbal. In een interfasekern heb je al een gemiddelde verdichting met een factor 500. Om de chromosomen tijdens de celdeling transportabel te maken komt daar weer een factor 20 bovenop.

Om te helpen doorgronden hoe het mogelijk is dit alles kan zonder dat al dat DNA in een onontwarbare knoop raakt, zijn er chromosoommodellen ontworpen (fig 7). Met het vorderen van de techniek wordt er continu aan deze modellen gesleuteld. Nog steeds zijn lang niet alle raadselen onthuld als we die al kunnen formuleren. Want ook het aflezen van **genen** (box 1), het kopiëren van de chromosomen (fig 5), het repareren van het DNA dat voortdurend nodig is (fig 33) en het compacter maken van de chromosomen ter voorbereiding van de celdeling, gaat gepaard met veranderingen in de structuur van het complex van DNA met vele verschillende soorten eiwitten, het **chromatine**. De goede kleurbaarheid ervan draagt erg bij aan het herkennen van de celkern in weefselpreparaten en van chromosomen wanneer je die, net voor het moment van de deling (fig 3, 12, H3.4) op een microscoopglasje vangt.

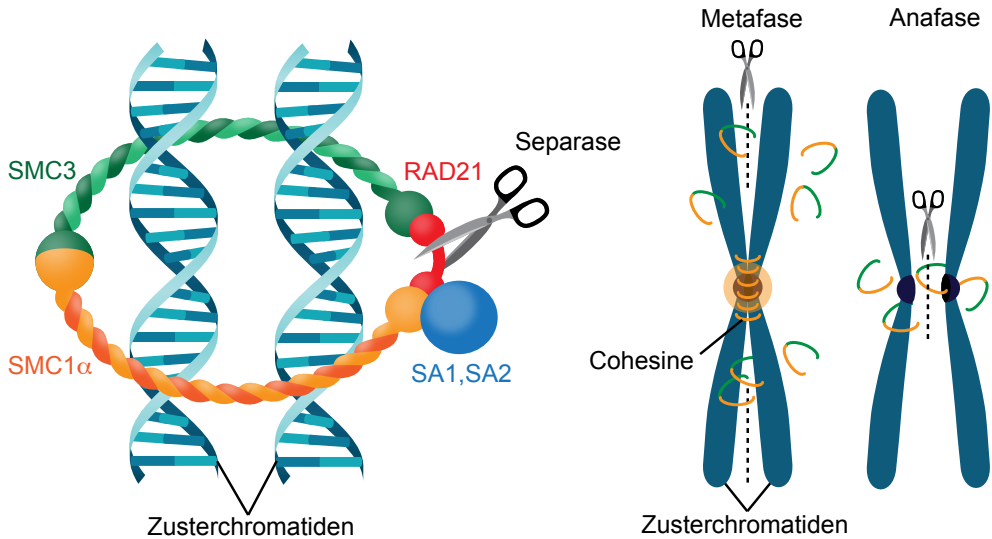


FIG 6

Een illustratie van het **cohesine complex** en een belangrijke functie ervan in de celcyclus. De betrokken eiwitten zijn in kleur aangegeven (behalve het knippende enzym separase). De afspraak is dat bij mens **gen** en eiwit in hoofdletters worden geschreven (bij muis alleen de eerste letter, zie ook fig 14). Het **centromeergebied** is donker. Op weg naar de metafase verliezen de **chromosoomarmen** als eerste het cohesine complex, in het centromeergebied gebeurt dat wanneer de anafase start. De meiotische versie ervan is subtiel gecompliceerder vergeleken met de mitotische versie hier. Werd dit complex aanvankelijk bestudeerd omdat het zo'n grote rol speelt bij het uiteengaan van de **chromatiden** in de **mitose** en de tweede **meiotische** deling, en van de **homologe** chromosomen tijdens de eerste meiotische deling (fig 3, 13 en 30), nu krijgt de functie ervan bij het organiseren van de interfasekern minstens evenveel aandacht (fig 7).

Het schema van figuur 7 begint met de structuur van de DNA dubbele helix (het Watson-Crick model uit 1953). Voor het eerste niveau van opbergen maken cellen gebruik van **nucleosomen**, die bestaan uit 8 kleine **histon** eiwitten waaromheen het DNA gewonden zit (fig 7, 8). Van de 4 histon hoofdtypen H2A, H2B, H3 en H4 bevat elk nucleosoom er 2.

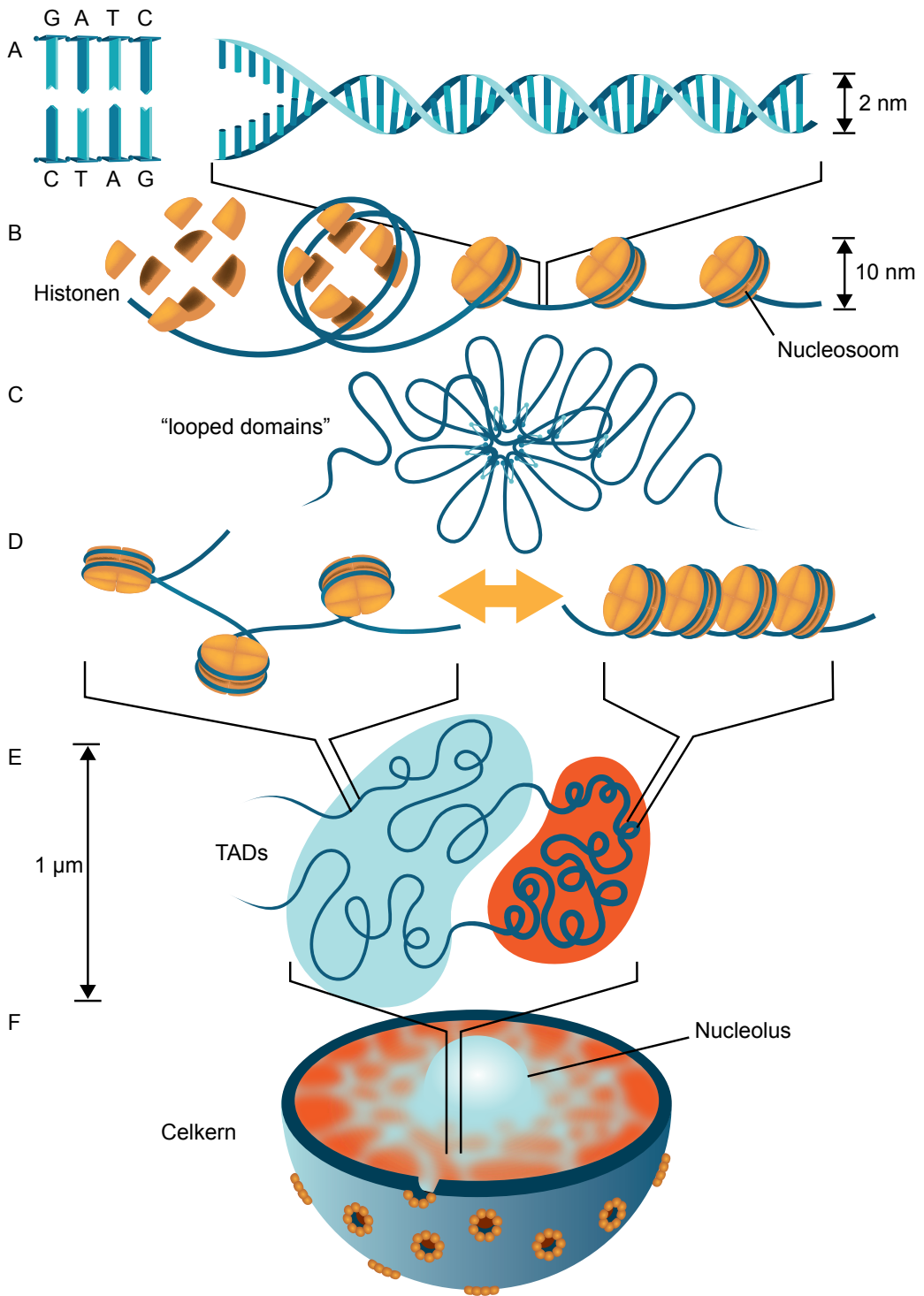


FIG 7

Sterk geschematiseerde voorstelling van de opbouw van **chromatine** in de interfasekern. De **DNA** dubbele helix (a) windt zich met regelmaat rond een complex van 8 histoneiwitten waardoor de **nucleosomen** ontstaan (zie ook fig 8) die schier eindeloze ketens vormen. De ketens zijn georganiseerd in lussen, vaak aangeduid als “looped domains” (c). Het **cohesine complex** (fig 6), hier heel klein weergegeven als de groen pijlpunten aan de basis, is belangrijk bij de vorming van deze lussen die aan de basis een soort van ruggengraat van het chromosoom verbeelden. Stukken van deze ketens kunnen een lossere en een meer open pakking hebben (d). De open pakking is nodig om **transcriptie** mogelijk te maken (box 1). Het meer recent ontdekte kernbegrip voor het begrijpen van de structuur van chromatine in de kern is het “topologically associated domain” (TAD, e). Deze kunnen een meer open (blauw, groter) of meer gesloten chromatine structuur hebben (roodbruin, kleiner), samenhangend met de transcriptie activiteit van genen in de “looped domains” die deze TADs bevolken. Ze zijn meerdere honderd kb groot (mediane waarde 880 kb). Tenslotte wordt in de kern (f) aangegeven dat de actieve TADs meer naar binnen liggen. De chromosomen hebben in de kern hun eigen domein, zodat de TADs meestal bestaan uit chromatine van één bepaald chromosoom (maar dat hoeft niet). Naast de TADs spelen de kernwand en de nucleolus ook een grote rol bij de chromatine organisatie van de kern.

Begrijpelijkerwijs zijn ze in de evolutie goed bewaard gebleven: tussen erwt en rund verschilt H4 bijvoorbeeld maar voor 2 van de 102 aminozuren. De posities van de nucleosomen op de DNA keten zijn niet vastgelegd, ze kunnen variëren. Dat verplaatsen gebeurt door gespecialiseerde eiwitfamilies de zogenaamde “chromatin remodelers” en kost natuurlijk energie. Het is bijvoorbeeld nodig voor de **transcriptie** (fig 9). Met wat kunstgrepen, bijvoorbeeld doordat het chromatine met behulp van zeep zich op een waterdruppel ontvouwt, is de ketting van nucleosomen, omwonden en verbonden door de DNA dubbele helix, in de jaren 1974, 1975 elektronenmicroscopisch zichtbaar gemaakt. Een nucleosoom heeft een diameter van zo'n 10 nm (fig 7). Hoe de “streng met kralen” daarna nog verder gevouwen en verdicht wordt is een grote vraag in het huidige onderzoek naar de puzzel van de kern. Duidelijk is dat de lusvorming die daarna optreedt (fig 7) onderdeel is van een mechanisme dat regelt of het chromatine transcriptief actief is of juist inactief. De lussen variëren in maat, 100 kilobasen (kb) wordt vaak genoemd, maar

het kan ook groter zijn. Praatte men in “het veld” voorheen alleen maar over “looped domains”, nu gaat het ook over “topologically associated domains” of TADs (fig 7), om aan te geven dat bij elkaar in de buurt liggende lussen vaak eenzelfde functionele status hebben, de genen in deze lussen staan overwegend “aan” of “uit”.

Duidelijk is dat het cohesine complex (fig 6) naast andere eiwitten een belangrijke speler is bij het bepalen van de lusstructuur. Er bestaat geen volledig overzicht over de ruggengraat van het chromosoom (fig 7), dat deel uitmaakt van de nucleaire matrix, een structuur die te vergelijken is met het skelet van de kern. Maar de bekende functies van chromatine zoals het veranderen van de structuur ten behoeve van genexpressie, het starten van het kopiëren van DNA ter voorbereiding van de celdeling, het ontwarren van DNA, het repareren van DNA en het condenseren van chromatine ter voorbereiding van de celdeling zullen ermee te maken hebben.

2.3.2 Soorten chromatine

Vanouds werd chromatine opgedeeld in **euchromatine** en **heterochromatine**. Deze indeling is sterk bepaald door het kleuringspatroon van kernen in **histologische** weefelcoupes met lichtmicroscopie. Alles wat donker kleurde was heterochromatine.

Niet veel onderzoekers, die iets echt nieuws en van algemener belang hebben ontdekt, overleven in de tekstboeken (en op Wikipedia), maar dat geldt niet voor Murray Barr uit Canada. Samen met collega Bertram publiceerde hij in 1949 dat de kernen van zenuwcellen van poezen en katers verschillen in kleurpatroon. In de vrouwelijke kernen zagen zij een homogeen intenser kleurend bolletje dat tegen de kernwand aangeschoven zat. Heden ten dage kun je daar nog steeds de term “Barr body” op plakken. Eigenlijk kleurde het als heterochromatine, maar wat betekent dit? Nadat in 1959 door de beroemde naar Los Angeles uitgeweken Japanner Susumu Ohno (o.a. bekend van het idee dat de evolutie wordt gedreven door het kopiëren en zo verdubbelen van de genetische informatie) was ontdekt dat het Barr body een van de twee X chromosomen moest representeren, ging uiteindelijk Mary Lyon er met de hoofdprijs vandoor. In een 1961 Nature publicatie stelde ze voor dat ergens in de ontwikkeling van vrouwelijke embryo's er per cel beslist wordt welke van de twee X chromosomen, die van de moeder of die van de vader, de lier aan de wilgen hangt, en dus stopt met het tot expressie brengen van genen. Dit is in het kort de Lyon hypothese. Mary stelde haar hypothese op werk met muizen. Deze proefdieren waren volop aanwezig op de plek waar ze werkte, de toenmalige Medical Research Council radiobiology unit in Harwell UK. De mutatie die ze gebruikte treft een vachtkleur gen op het X chromo-

soom, en de vrouwelijke muizen doen denken aan lapjeskatten. Het onderzoek met ioniserende straling en later ook chemische **mutagentia** in Harwell, leverde veel mutanten en biologisch genetisch inzicht op. In die dagen werden alle **mutante** lijnen levend aangehouden, omdat het invriezen van 8-cellige embryo's voor een embryobank (**cryopreservatie**) nog niet bestond.

Het inactieve X chromosoom kleurt als heterochromatine en heeft altijd een normaal kleurend en functionerend **homoloog**. Omdat de X in het begin van de embryonale ontwikkeling heeft kunnen kiezen, noemen we de **heterochromatische** staat **facultatief** in tegenstelling tot het heterochromatine bij de centromeren (fig 3, 12), dat **constitutief heterochromatisch** wordt genoemd. Box 4 is helemaal aan het inactieve X chromosoom gewijd.

De technologierevolutie die het DNA onderzoek zo'n vaart en omvang heeft bezorgd is niet aan het bestuderen van chromatine voorbij gegaan. Het gebied is groot en wordt ingewikkelder naarmate de onderzoekstechnieken voortschrijden, maar er zijn wel degelijk algemeen geldende regels ontdekt, waarmee je de toestand van het chromatine kunt beschrijven. De histonen spelen daarbij een hoofdrol (fig 7, 8, tabel 1). Bij de assemblage van de nucleosomen worden er eerst twee **dimeren** gemaakt van een H3 met een H4. Samen met DNA is dat het opstapmodel nucleosoom. Daar worden twee dimeren H2A H2B aan toegevoegd. Vooral de histonen H2A en H3 blinken uit in het beschikbaar hebben van meerdere varianten, waar natuurlijk weer een bepaalde functionaliteit aan is gekoppeld. Zo'n variant kan er bijvoorbeeld voor zorgen dat het nucleosoom instabieler is, waardoor DNA makkelijker bereikbaar is voor transcriptie. In de kiembaan wordt daar dankbaar gebruik van gemaakt. Daar bovenop zit een nog veel fijnmaziger net van chemische toevoegingen (H1), die variëren van simpele methyl (CH₃) en acetyl (C₂H₃O) groepen (tabel 1) tot kleine eiwitten (ubiquitineren, sumoyleren, H1) tot in het geval van DNA schade hele kerstbomen van ribose suikermoleculen. Bij het zoeken naar manieren om de boodschap van deze zogenaamde post translationele modificaties (**PTMs**) te duiden, zijn onderzoekers op wetmatigheden gestuit.

In 2001 verscheen er in Science een publicatie van Thomas Jenuwein en David Allis met als titel "Translating the Histone Code". Alle ingrediënten van de code waren toen nog niet bekend, maar al wel daagde, dat je door te kijken naar moleculaire veranderingen in de naar buiten stekende histonstaarten (zie fig 8 en tabel 1) iets over de toestand van het chromatine ter plekke kan zeggen. H3 is het histon type met de meeste "toestand-van-het-chromatine" indicatoren. Ook de staart van H4 laat zich niet onbetuigd. Zowel voor het ultra kleinschalige moleculaire onderzoek aan chromatine (denk aan de promotor van een **gen**) als bij het op microscopisch niveau kijken

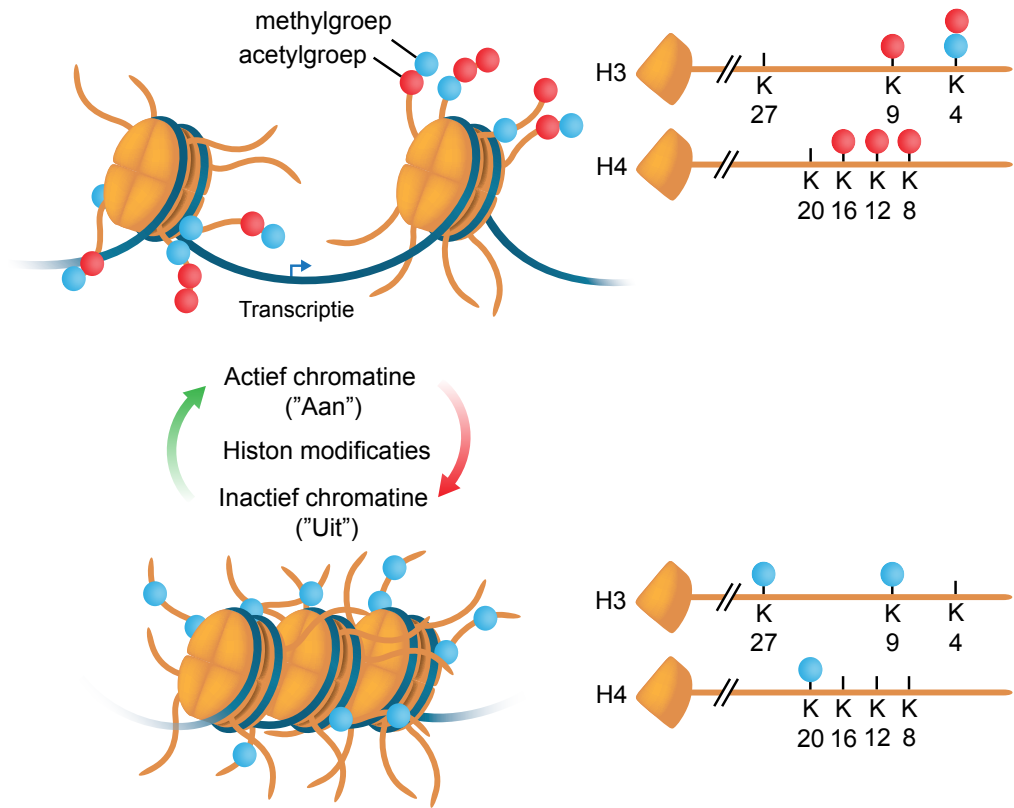


FIG 8

Wanneer de **nucleosomen** geassembleerd worden, blijven er staarten van gekoppelde aminozuren uit steken. Op specifieke plaatsen in deze staarten kan door het aanbrengen van een klein chemisch molecuul (of het verwijderen ervan) een cascade van reacties gestart worden. Dit hele proces vindt ook plaats bij naburige nucleosomen. De meest bestudeerde van deze kleine chemische groepen (deze figuur en tabel 1) worden gezet op het **aminozuur** lysine (K) dat daarvoor een geschikte structuur heeft. Afhankelijk van het soort molecuul (methyl, acetyl) en welke lysine het betreft, is het uiteindelijke resultaat open en actief **chromatine** (groene pijl) of dicht en inactief chromatine (rode pijl). Ook in de gevouwen delen van de **histon** eiwitten (hier H3 en H4), waaruit de nucleosomen bestaan, treden deze modificaties op. Het centrale thema in de genregulatie is de bereikbaarheid van **DNA**. Open chromatine faciliteert DNA **transcriptie** en dicht chromatine remt het. Uiteindelijk bepalen meerdere elkaar beïnvloedende chromatine veranderingen de fijnmazigheid en het “fine tunen” van het aan of uit zetten van een **gen** op lokaal niveau.

naar chromatine in ieder celtype inclusief die van de kiembaan, is een set antilichamen die histon PTMs herkennen, een noodzakelijkheid. Dat die antilichamen zo ongelofelijk specifiek zijn en de kleinste verschillen detecteren, heeft me als niet moleculair bioloog/immunoloog altijd verbaasd. Voor het aanbrengen van de genoemde modificaties zijn enzymen nodig en deze zijn inderdaad door de jaren heen ontdekt en staan beschreven in duizenden wetenschappelijke publicaties. Andere enzymen halen ze er weer af.

Door dit soort enzymen uit te schakelen of juist harder te laten werken ligt er nu een zee van experimenten in het vooruitzicht om achter de biologische betekenis van dit alles te komen. In hoofdstuk 15 zien we daar een voorbeeld van. Deze enzymen, de regulators van de “histon-regulators”, worden ook weer gereguleerd, en zo weer verder. Zo’n regulering door zulke cascades is redelijk duizelingwekkend (zie ook H1).

Hoe brengen deze histon PTMs hun boodschap over? De op dit moment nog in het verschiet liggende figuur 24 geeft een idee van de indrukwekkende complexiteit van de regulatie van chromatine. De enzymen die de PTMs plaatsen staan bekend als “chromatin writers”. De eiwitten die binden aan de PTM en de mate van activiteit van het DNA helpen bepalen (bij transcriptie, transcriptiefactoren) staan bekend als de “chromatin readers”. Er zijn “chromatin erasers”, die

Tabel 1 Een eenvoudige indruk van de betekenis van de meest voorkomende **histon PTMs**.

Histon type	H3	H3	H3	H3	H4	H4	H4	H4	H4	H2AX	H3
Aminozuur, positie K = lysine, S = serine	K4	K9	K27	K36	K8	K12	K16	K20	S139	S10	
Geacetyleerd 1,	actief	actief			actief	actief	actief				
Gemethyleerd, 1,2,3 in oplopen de sterkte	actief	constitutief hetero- chromatine, inactief	facultatief hetero- chromatine, inactief	actief				inactief			
Gefosforyleerd									Vooraf dubbel- strengs DNA breuken	Gecontraheerd chromatine in mitose en meiose	

Constitutief **heterochromatine** zoals rond de **centromeren** gelegen is altijd rijk aan H3K9me3. De inactieve X van lichaamscellen (box 4) is gemarkeerd door H3K27me3, net zoals veel **chromatine** domeinen in **autosomen** die in het betreffende celtype niet aan de **transcriptie** doen. Dit chromatine kan zowel actief als inactief zijn, de inactieve staat is facultatief. Transcriptioneel actief chromatine heeft dan bijvoorbeeld een acetyl groep op H3K9, twee of drie methyl groepen op H3K4 en op H3K36. H2AX is een belangrijk lid van de H2A familie. De betrokkenheid van dit histon eiwit bij DNA herstelprocessen (vooral van dubbelstrengs breuken), zichtbaar door de fosforylatie op serine 139, is door de beschikbaarheid van goede antilichamen van groot belang voor het onderzoek.

de lokale toestand van het chromatine weer in een andere staat brengen. En dan zijn er nog “chromatin remodelling complexes” die nucleosomen over het DNA kunnen verschuiven, “histon chaperones” die behulpzaam zijn bij een verandering binnen een histonklasse zoals het meest frequent gebeurt voor H2A en H3 en daar bovenop bemoeien ook niet coderende **RNA** moleculen zich met het chromatinelandschap. Dit is allemaal nodig om de hoofdfuncties van het chromatine: transcriptie, replicatie, reparatie en **recombinatie** waar te maken.

Onderzoekers denken dat we over een niet al te lange tijd dat wat er lokaal in en op het chromatine gebeurt in 3D, en misschien wel in 4D kunnen waarnemen. Tenslotte zal het nu duidelijk zijn dat de term euchromatine een verzamelbegrip is, daarbinnen is de variatie nog steeds enorm.

Wanneer een cel in mitose gaat erft het chromatinelandschap mee, dat is met het DNA meegekopieerd en op die manier vererft de genexpressie die hoort bij het celtype. De details hiervan zijn vooralsnog grotendeels onbekend. Het begrijpen van dit “bookmarken” van het chromatine voor de volgende celgeneraties en welke PTMs precies verantwoordelijk zijn voor het behoud van het geheugen is de grote uitdaging. Alles wat hieronder valt, valt ook onder de term **epigenetica**, de overerfbaarheid, voor kortere of langere tijd, van de functionele status van het DNA.

Box 1 Centrale dogma van de moleculaire biologie

Eiwitten bestaan uit polymere ketens van verschillende typen **aminozuren** waarvan we er 20 kennen. Ieder soort eiwit heeft zijn eigen aminozuursamenstelling en lengte, bepaald door het aantal en de volgorde van de daarin voorkomende typen aminozuren. Het totale bestand aan eiwitten van een cel wordt aangeduid met het woord **proteoom**. Een cel van de mens bevat rond de 2×10^9 eiwitmoleculen. Schattingen van het aantal echt verschillende eiwitten binnen het proteoom lopen voor de mens uiteen van 40.000 tot 80.000 (zie ook hieronder). De meeste soorten eiwit zijn per cel in aantallen van ongeveer 1000 tot 10.000 moleculen aanwezig, maar sommigen zijn veel zeldzamer. Het **DNA** van iedere cel bevat de complete receptuur, de **genetische code** voor de vorming van alle verschillende soorten eiwit. Genen vormen daarin de eenheid van informatie. Deze informatie ligt besloten in de **nucleotidenvolgorde** van het DNA van ieder **gen**. Wanneer het **gen** geactiveerd wordt en tot expressie komt, wordt het DNA eerst gekopieerd in de lineaire enkelstrengs nucleotidenvolgorde van **RNA**, het primaire transcript (pre **messenger RNA**, fig 9). Dit proces wordt aangeduid met de term **transcriptie**. Voor de totale populatie van alle soorten RNAs die binnen één cel worden gevormd, gebruikt men vaak het woord **transcriptoom**. Meestal bedoelt men daarmee het RNA dat vertaald wordt in eiwit, dus het bestand aan rijpe "**messenger**" RNAs (mRNA, $\sim 3 \times 10^5 - 10^6$ moleculen per cel). Dit is het RNA dat in de kern na rijping van het primaire transcript ontstaat (fig 9). Daarnaast bestaan er vele niet voor eiwit coderende typen RNA. Dat deze betekenis hebben voor de bouw van bestanddelen (b.v. ribosomen, fig 2), in vervoer (b.v. van aminozuren, fig 9) of in regulatie van cellulaire processen is al langer bekend. De functies hiervan worden momenteel intensief bestudeerd en het begrip gen is ook van toepassing op deze functionele RNA moleculen. Uiteindelijk kan de genetische code die via transcriptie van DNA is overgedragen op RNA, vertaald worden in de karakteristieke aminozuurvolgorde van een eiwit (fig 9). Dit proces heet **translatie**. Tijdens de translatie

codeert iedere opeenvolgende set van drie nucleotiden (één **triplet** of codon), in de daarvoor bestemde delen van het mRNA (de **exonen**) voor één aminozuur (fig 9). Met een keus uit 4 nucleotiden per positie zijn er $4 \times 4 \times 4 = 64$ codon mogelijkheden (in DNA taal de basen A, G, C en T; in RNA taal de basen A, G, C en U; fig 5, 7). Het totale overzicht van relaties tussen de codons en de corresponderende vertaling in aminozuren, staat bekend als de **genetische code**. Meestal gebruikt men voor de weergave hiervan de nucleotide aanduiding van RNA. Een viertal tripletten, namelijk het startcodon AUG en de stopcodons UGA/UAG/UAA geven aan waar de translatie van RNA in eiwit begint en eindigt. Het startcodon codeert voor methionine. Daarom begint vrijwel ieder eiwit met dit aminozuur; AUG is een unieke code. Op de stopcodons wordt het verlengen van de keten van aminozuren beëindigd, ze coderen niet voor een aminozuur. Dan zijn er nog $64 - 4 = 60$ verschillende codons beschikbaar om de overige 19 types aminozuren in te kunnen bouwen. Dit verschijnsel staat bekend als het “gedegenereerd zijn van de code” en zorgt er voor dat, wanneer in het gen DNA (en dus ook in de RNA kopie daarvan) er in de laatste letter van het codon een base verandering (een **mutatie**) optreedt, dit vaak geen ander aminozuur in de eiwitketen oplevert. Mutaties op de 1^e of 2^e positie in een codon leiden meestal wel tot verandering. Wanneer het mutante codon niet tot een ander aminozuur leidt spreekt men van een “synonymous” mutatie en wanneer dat wel het geval is van een “missense” of “non-synonymous” mutatie. Is door de base verandering het codon in een stopcodon veranderd dan wordt dit een “nonsense” mutatie genoemd. Is er wel sprake van een ander aminozuur maar zijn er geen consequenties merkbaar, dan spreekt men ook wel van een “silent” (“synonymous”) mutatie. Niet elke verandering op DNA niveau binnen een gen hoeft dus tot een probleem in het functioneren van het eiwit te leiden, maar de meesten doen dat wel. Wanneer een gen niet langer codeert voor een functioneel eiwit wordt dat met de term “loss of function” aangeduid. Dat kan worden veroorzaakt door een “missense” of “nonsense” mutatie. Ook kan insertie of deletie van een of een paar basen (een **indel**) het leesraam van de codons verschuiven, waardoor die

niet meer kloppen. De plaats waar deze typen mutaties in het gen optreden en zo in de daarvan gekopieerde mRNA keten overgenomen worden, is uiteindelijk medebepalend voor verlies of behoud van functie van een eiwit.

Omdat het begrip gen van oudsher samen viel met het begrip eiwit, werd lange tijd gedacht dat het totale aantal genen in ons **genoom** ook het totale aantal verschillende eiwitten bepaalt, maar dat is niet zo. We weten nu dat veruit de meeste eiwit-coderende genen zijn opgebouwd uit segmenten, de **exonen** en **intronen** (fig 9). Het pre messenger RNA van het gen bevat nog de lineaire volgorde van beide (fig 9). Zoals hiervoor genoemd zijn na rijping de intronen verwijderd, waarna de exonen heel nauwkeurig gekoppeld terug te vinden zijn in de mRNAs (fig 9). Door de afwisseling van intronen en exonen is er in de rijpingsfase variatie mogelijk, exonen kunnen worden overgeslagen. Zo wordt uit meer dan de helft van de gevormde pre mRNAs niet de hele uitgangssset van exonen gebruikt. Het aan- of afwezig zijn van exonvolgordes in mRNAs wordt tijdens hun rijping bepaald door een proces dat in de vakliteratuur wordt aangeduid met "alternative splicing". Dit proces kan zowel spontaan als celtype afhankelijk zijn en na translatie leiden tot de aan- of afwezigheid van domeinen in het eiwit (waarbij één exon codeert voor één domein). Het spreekt haast vanzelf dat kleine mutaties ook kunnen interfereren met het proces van de exon selectie en zo ook een bron kunnen zijn van pathologische gebeurtenissen in een gen.

De ongeveer 20.000 bekende eiwitgenen coderen naar men nu aanneemt dus niet voor precies eenzelfde aantal verschillende eiwitten. In cellen en weefsels van de mens en andere zoogdieren wordt de hoeveelheid echt van elkaar verschillende eiwitsoorten nu geschat op 40.000-80.000. De totale hoeveelheid aan genetische informatie in rijpe mRNA moleculen van een celtype, eventueel een weefsel of orgaan, wordt aangeduid met de term **exoom**.

Zoals hiervoor en ook in hoofdstuk 1 al is aangegeven is er een groeiende aandacht voor genen die niet voor eiwitten coderen, maar waarvan het primaire product geen

mRNA maar een ander type RNA is. Al heel lang bekend zijn het ribosomale RNA (dat via het kernlichaampje, de **nucleolus**, opgenomen wordt in ribosomen, H1, fig 2) en de tRNAs die een rol hebben in het aandragen van aminozuren tijdens de translatie in eiwit (fig 9). Van recentere datum zijn de ontdekkingen van vele andere niet coderende (nc) types RNA, zoals "short non coding" (snc) RNAs, "long non-coding" (lnc) RNAs en zelfs circulaire RNAs met vaak nog onbegrepen rollen in de sturing van de genexpressie of andere cellulaire processen (zie ook H1). Onderzoek naar de betekenis van deze RNAs, waaraan numeriek de lncRNAs veruit de grootste bijdrage leveren en die samen zeker wel 5 keer zo veel voorkomen als de 20.000 voor eiwit coderende genen, is ook voor de **kiembaan** een groeiend aandachtsgebied.

Regulatie van de transcriptie, een binnen de moleculaire biologie al lang bestudeerd thema, is een bijzonder aansprekende illustratie van de moleculaire complexiteit van het functioneren van cellen. Het startpunt hiervoor is de herkenning van motieven in de DNA volgorde rond en/of in ieder gen door grote eiwitcomplexen, gevormd uit zogenaamde **transcriptiefactoren** en daaraan gebonden activator- en/of repressor-eiwitten. De hierbij betrokken complexe moleculaire interacties zorgen er voor dat RNA polymerases (fig 9) op de correcte locatie beginnen met de transcriptie. Ook regelen ze hoe vaak en hoe lang dit plaatsvindt, waardoor de transcriptieactiviteit van een gen pulserend verloopt. Het startplaatsbepalende regelmotief, de **promotor** genoemd, ligt daarbij vaak vlak bij de plaats waar de transcriptie begint. DNA motieven die de frequentie van transcriptie bepalen kunnen over een veel groter gebied in of rond het gen liggen. Hoe de veelheid aan factoren uiteindelijk bepaalt hoeveel RNA van een gen in een bepaalde cel wordt geproduceerd, is deels nog onbegrepen en een proces waarvan de details buiten de strekking van dit boek vallen.

Uit het bovenstaande is duidelijk dat de genetische informatie van DNA via RNA naar eiwit wordt overgebracht. Dit concept staat bekend als het centrale dogma van de

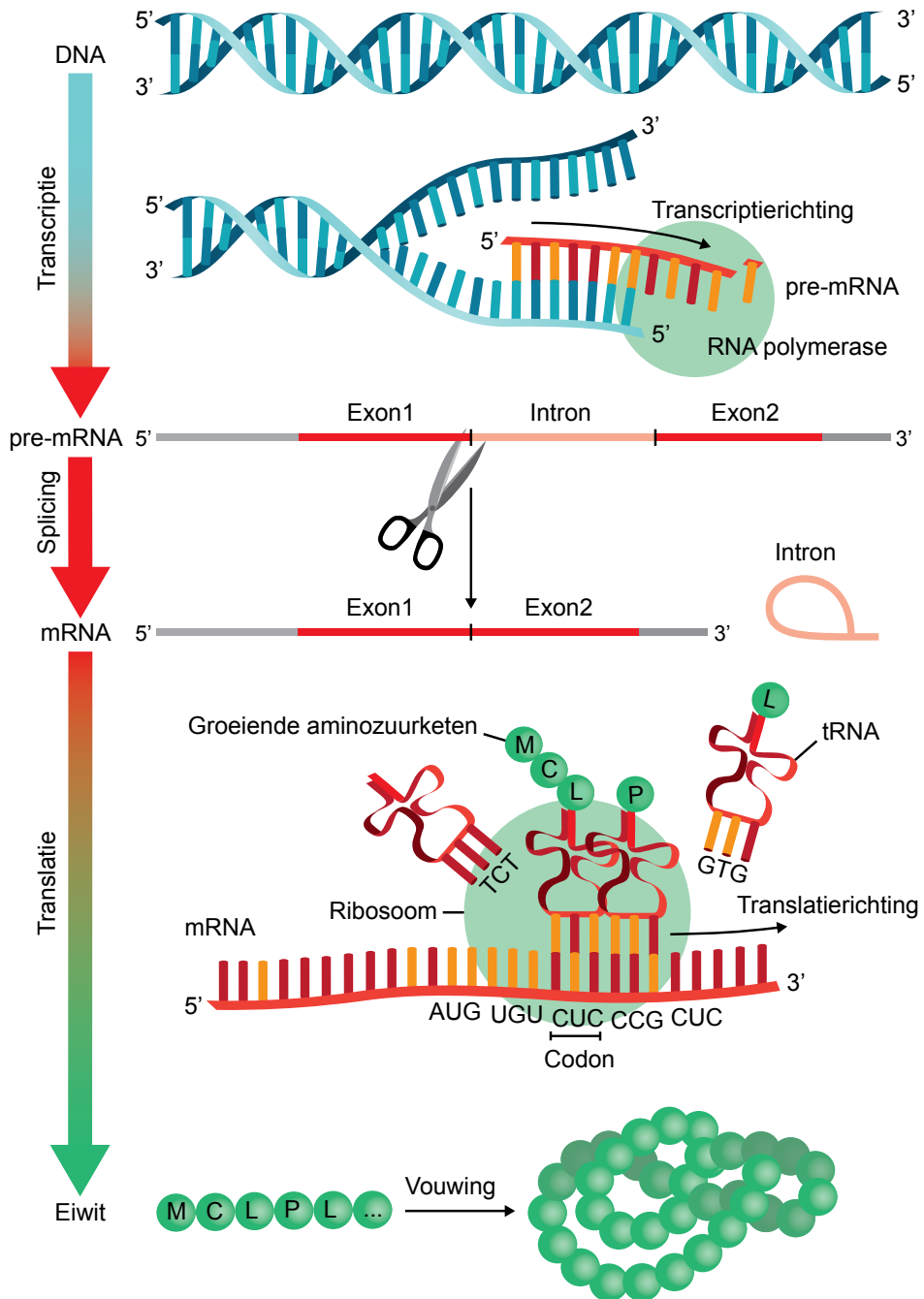


FIG 9

De route van **DNA** via **RNA** naar eiwit (box 1). Bij de transcriptie verlengt het RNA polymerase het primaire (pre messenger) **RNA** aan het 3'einde. In de kern wordt dit pre messenger RNA verwerkt door de niet voor aminozuren coderende delen, de intronen eruit te verwijderen. Exonen blijven over en het rijpe mRNA ontstaat. Het proces staat bekend als "splicing". Het mRNA verhuist na dit rijpingsproces van de kern naar het cytoplasma van de cel. Hier worden de via transfer (t)RNA moleculen aangedragen aminozuren bij de **translatie** van de **genetische code** aaneengeregend. Bepalend daarvoor is de "anti codon" code van het tRNA die via basenparing het codon (van de **triplet** code) voor dit bepaald **aminozuur** in het rijpe mRNA herkent. De genetische code staat in RNA taal geschreven, met een U op iedere plaats waar in de DNA volgorde een T staat. Elk aminozuur heeft zijn eigen letter in het alfabet. Een eiwit begint altijd met het aminozuur methionine (M). De C van het kleine stukje pas gevormd eiwit staat voor het zwavelhoudende cysteine, de L voor leucine en de P voor proline.

moleculaire biologie, voor het eerst in 1958 geformuleerd door Francis Crick (samen met James Watson de ontdekkers van de dubbel helix structuur van DNA). In 1970 werden details betreffende dit dogma door hem aangevuld in een Nature publicatie, waarna het een belangrijke rol heeft gespeeld in ontwikkelingen binnen de moleculaire levenswetenschappen. Toch moest er over de tijd behoorlijk aan de allesomvattende toepasbaarheid van het centrale dogma worden gesleuteld. Hierna zullen we namelijk zien dat in de kiembaan, maar ook bij bijvoorbeeld processen die optreden als gevolg van virale infecties, de genetische informatie ook wel eens "omgekeerd" kan stromen, van RNA naar DNA.

2.3.3 Soorten DNA

In het aantal en de volgorde van de **nucleotiden**/basen A, T, C en G ligt de totale genetische informatie van de soort besloten. Deze omvangrijke en karakteristieke set van per chromosoom gekoppelde basen noemen we het genoom van de soort en de wetenschap die hier de biologisch relevante informatie uit probeert te halen **genomica**, "**genomics**". Het woord genoom slaat eigenlijk op de haploïde situatie, maar genomica wordt vooral bedreven in de diploïde toestand, als aanduiding voor de complete genetische informatie van een cel of organisme. Door de technische doorbraken om tegen relatief geringe kosten de basenvolgorde per soort en per individu af te lezen ("**next generation sequencing**", **NGS**), groeit deze tak van de genetica enorm, hetgeen zonder bijna onbegrensde computercapaciteit niet mogelijk zou zijn. In engere zin is de genomica vooral geïnteresseerd in de rond de 20.000 voor eiwit coderende genen (H1, box 1). De **exonen** (box 1) daarvan beslaan maar 1,5% van het genoom.

Wanneer je je aandacht richt op het complete genoom, is het meest opzienbarende gegeven dat ongeveer de helft (tabel 2) van alle DNA bestaat uit basenvolgorde met motieven die in vele kopieën voorkomen: in tandem, als wagons van een goederentrein achter elkaar, of verspreid over het hele genoom. De lengte van zo'n basiselement kan behoorlijk verschillen en de aantallen daarvan ook. De microsatellieten (tabel 2), herhalingen van een eenvoudig motief van 2-6 basen, die op meerdere plaatsen in het genoom voorkomen, muteren gemakkelijk in aantal kopieën van het basismotief, omdat DNA polymerase niet houdt van eentonigheid en wel eens de tel kwijt raakt bij de DNA replicatie (fig 5).

Minisatellieten zijn een stukje groter, zie tabel 2. Ook deze motieven muteren makkelijk naar een ander aantal naast elkaar gelegen kopieën, maar door een ander mechanisme, dat met de **meiose** te maken heeft (**genconversie**, wordt in H5.1 aangestipt). Reden om er hier over te schrijven is, dat het begrip **DNA fingerprinting** hierop gebaseerd is. In 1985 ontdekte Alec Jeffreys, nu Sir Alec, van de afdeling genetica van de universiteit van Leicester de grote genetisch variatie als gevolg van variabele minisatellieten met een basis DNA motief van tussen de 10 en 100 basen. Een jaar ervoor publiceerde hij de DNA basenvolgorde van een dergelijke sequentie van 33 basenparen (bp), gevonden in een **intron** van het humane myoglobine gen. Myoglobine is een zuurstof bindend eiwit in de spier. Deze "repeat" is variabel in lengte (aantal kopieën) en komt op meerdere plaatsen in het genoom voor. DNA fingerprinting maakt gebruik van deze variatie en is jaren lang de techniek geweest waarmee iedereen van een genetisch barcode kon worden voorzien. Dat was een hele doorbraak in het bewijzen van ouderschap en in de foren-

sische persoonsherkenning waar het nog steeds wordt gebruikt. De lijst van wetenschappelijke onderscheidingen die Alec Jeffreys ten deel is gevallen is dan ook indrukwekkend.

Aan het begin van deze eeuw waren we op bezoek bij een van zijn medewerkers, Yuri Dubrova, oorspronkelijk afkomstig uit Oekraïne, en al eerder afgekomen op de reputatie van Sir Alec. We zagen een kleine, niet erg opvallende gestalte met een labjas aan, diep over een -80°C vriezer gebogen, zo te zien op zoek naar DNA monsters. Dat contrast tussen de dagelijkse bezigheden, het plezier dat je eraan kunt ontlenen, en dan die ontdekking die de poort opent naar veel inzicht en een groot toepassingsgebied in de maatschappij, het blijft fascinerend.

Simpele of grotere DNA basenvolgorde-motieven maar dan in vele kopieën in tandem geschakeld, spelen een grote rol in gespecialiseerde functies van het chromosoom. Zo bestaat het constitutieve heterochromatine rond de centromeren (H2.3.2, fig 3, 12) uit een aantal sterk verwante motieven. De basis hiervoor wordt gevormd door een repeat van bij de mens 171 basenparen lang (tabel 2). Bij onze soort spreekt men van alpha satelliet DNA (tabel 2) en bij muis van de "major" en "minor" satellieten, allemaal historisch gegroeide termen. In de 2022 versie van het humane genoom (H4.2) is de structuur van de verschillende repeats voor de humane centromeergebieden opgelost en de aangetroffen variatie is opvallend. Ze repliceren hun DNA laat in de S-fase (fig 4). Bij mens zijn deze gebieden 250 tot 5000 kilobasen (kb) groot. Laat repliceren, sterk kleurbaar (muis) en compact chromatine, dat duidt niet op transcriptie. Toen in 2002 in een artikel van een beroemde Franse groep de hint verscheen dat niet voor eiwit coderend (nc) RNA (H1, box 1) met de vorming van heterochromatine op de plaats van transcriptie van doen had, moest ik behoorlijk aan dat idee wennen.

We zijn nu een kleine 20 jaar verder en weten nu veel meer van satelliet DNA. In het centrum van het heterochromatische centromeergebied, daar waar de verbinding met de spoelfiguur ontstaat (fig 3) verandert de structuur van het chromatine (fig 7) zodat satelliet DNA wordt afgelezen. Satelliet RNA is ter plekke nodig voor een volgende chromatine verandering, waarbij lokaal de nucleosomen (fig 7, 8) worden gesloopt en opnieuw worden opgebouwd, maar nu met een ander soort histon 3 aan boord, dat nodig is voor het transport van de gekopieerde chromosomen naar de dochtercellen. Een mooi voorbeeld van hoe delicaat het gedrag van de chromosomen is en met hoeveel detail dat is omgeven.

Een heel bekend, zich vele malen herhalend motief, TTAGGG, zit aan de twee einden van ieder chromosoom, de **telomeren**. Het beslaat zo'n 5 tot 10 kb aan DNA, gelijk aan 800-1700 repeats (tabel 2). Bij de muis met hetzelfde basismotief zijn ze 5-10 x zo lang. Je kunt deze repeat zien als een oplossing voor het zogenaamde eindreplicatie probleem.

Tabel 2 De bijdrage van de verschillende soorten in vele herhalingen optredende **DNA** motieven aan het **genoom**. De herhalingen kunnen overwegend in lange reeksen plaats vinden (in tandem) of verspreid. De totale invloed van "repeat" DNA motieven in het genoom is groot. Onderzoekers benadrukken dat de schatting van rond de 50% waarschijnlijk aan de lage kant is, 2/3^e wordt ook vaak genoemd.

Type repeat	Grootte in basen	Tandem	Verspreid	N kopieën	% genoom
Microsatellieten	2-6	ja	ja	> 10 ⁶	weinig
Minisatellieten	15-100	Ja locus 1-5 kb	ja		weinig
Telomere basen- volgorde	6	ja	aan chromo- soomeinden	800-1700 per chromo- soom eind	Ong 0,01%
Centromere alpha satellieten	171	ja	constitutief hetero- chromatine In en rond ieder centromeer	± 10 ⁶	5%
<i>Transposons</i>					
DNA transposons	Tot 3 kb		ja	500.000	3%
<i>Retrotransposons</i>					
SINE, SINE- Alu, waarvan ± 1000 actief	100- 300		ja	1.800.000	13%
LINE waarvan ± 100 actief (6 kb)	1-5 kb		ja	950.000	20%
LTR, ERV, mens niet meer actief, muis wel	Tot 4 kb		Ja	650.000	8%
SVA waarvan ± 50 actief	2 kb		ja	5.500	0,4%

Uitleg van de afkortingen. LINE “long interspersed nuclear element”. SINE “short interspersed nuclear element”. Bij de mens hebben de meeste SINEs een herkennings-site voor het DNA knipenzym Alu. Dit herkenningsmotief komt alleen bij primaten voor (halfapen, apen waaronder de mens). LTR “long terminal repeat”.

Retrotransposons die dit motief aan de einden hebben worden ERVs “endogenous retroviruses” genoemd. SVA is een afkorting van SINE, VNTR, Alu, het bevat deze motieven. Actieve in RNA afgelezen retrotransposons kunnen via de actieve LINEs worden gereïntegreerd en dragen zo bij aan variatie in het DNA. Microsatellieten zijn ook bekend onder de afkorting STR (“short tandem repeats”). Minisatellieten verschijnen ook wel onder de term VNTR, “variable number of tandem repeats”. Daarop is “**DNA fingerprinting**” gebaseerd.

Normaal worden chromosomen per celdeling en dus bij het ouder worden een klein beetje korter. Dat heeft te maken met eigenschappen van het DNA polymerase, het laatste stukje DNA kopieert niet zo makkelijk meer. Zonder verder op de moleculaire details in te gaan, het enzym telomerase, dat eigenschappen heeft van een “**reverse transcriptase**”, kan met RNA als matrijs een enkelstrengs DNA molecule verlengen. Het daarvoor gebruikte stukje RNA is complementair aan de telomere repeat.

Cellen moeten het eind van een chromosoom natuurlijk niet als een dubbel strengs DNA breuk (fig 33) zien, want dan komt het surveillance systeem in actie, als eerste stap in het herstellen van de schade (H2.2.1, fig 4). De oplossing bestaat uit het in een lus terug leggen van het laatste stukje enkelstrengs telomeer DNA. Vervolgens wordt het geheel door een complex van 6 eiwitten met de toepasselijke naam “shelterin” onzichtbaar gemaakt voor de dubbelstrengs breuk opsporingsdienst.

Weer een voorbeeld van een situatie waarin een enkel eiwit niet veel doet, maar door samen te werken met een aantal andere des te meer. Telomeren hebben erg tot de verbeelding gesproken en de ontdekkers van de DNA structuur ervan, Elizabeth Blackburn, Carol Greider en Jack Szostak, hebben er in 2009 de Nobelprijs voor gekregen. Voor hen die naar het eeuwige leven verlangen zit hier misschien nog wat in. Maar het eeuwige leven, het uitsterven van soorten daargelaten, zit in de kiembaan.

Veruit de grootste bijdrage van repeat DNA structuren aan de genomen van vele levensvormen en ook aan ons genoom wordt gevormd door zogenaamde **transposable elements**.

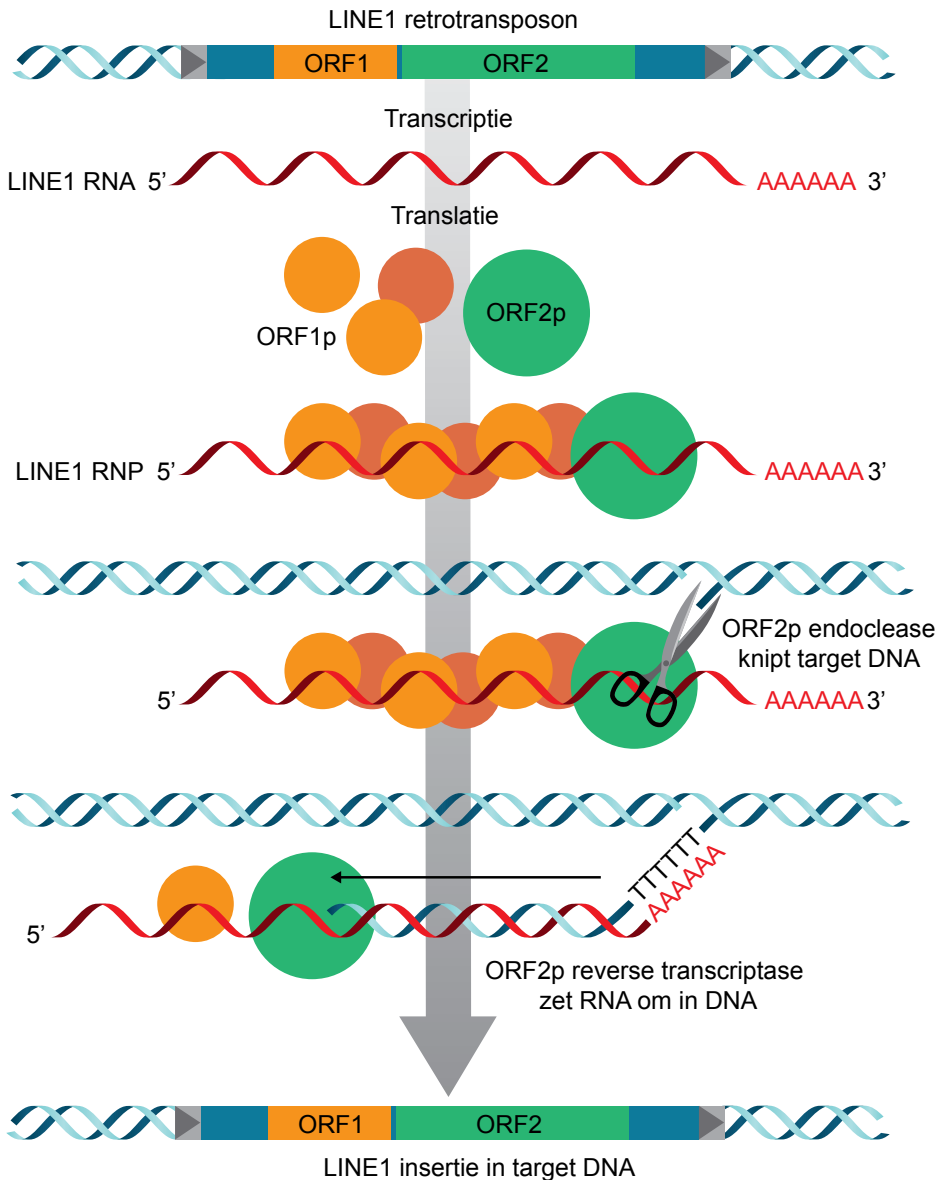


FIG 10

Schematische voorstelling van de manier waarop actieve LINE I **retrotransposons** zichzelf in het **genoom** kunnen vermeerderen (tabel 2). Nog maar een kleine minderheid van deze retrotransposons is actief, dat wil zeggen dat ze kunnen worden afgelezen (**transcriptie**) en via het **RNA** intermediair weer in een AT rijke regio in het **genoom** kunnen worden opgenomen. Om een LINE te mobiliseren en weer als een **DNA** kopie te laten landen, zijn beide eiwitten ORF1p en ORF2p nodig.

ORF1p heeft allerlei hulpfuncties, ORF2p kan zowel DNA knippen (het heeft endonuclease activiteit) als RNA in DNA kopiëren (het heeft **reverse transcriptase** activiteit). Deze activiteit kan ook aangewend worden ten dienste van andere RNA soorten, bijvoorbeeld die van een actieve SINE (tabel 2). De afkorting RNP staat voor “ribonucleoprotein particle”, het complex van RNA met eraan bindende eiwitten, in dit geval allemaal afstammend van de actieve LINE.

Dit zijn elementen die zich als parasieten in het genoom hebben vermenigvuldigd. Dat kan door DNA te kopiëren (het resultaat is een **transposon**), maar het kan ook via het enzym “reverse transcriptase” dat van RNA weer DNA maakt, wat resulteert in **retrotransposons** (fig 10). De oorspronkelijke moederkopie (of kopieën), denk daarbij aan een ontstaansgeschiedenis van zo'n 100 miljoenen jaren geleden, is dan een RNA virus. Bij zoogdieren is deze route het meest actief, en levert zo de grootste bijdrage aan het genoom (tabel 2). Kenmerkend voor deze repeats is dat ze ogenschijnlijk bij toeval over het genoom zijn uitgestrooid. Het proces is ook bij de mens nog steeds gaande. De aanjagers ervan zijn zo'n 80-100 actieve kopieën van de LINE familie (tabel 2). Een intacte LINE1 van 6 kb bevat 2 genen, die afgelezen kunnen worden en een ervan produceert een eiwit, dat zowel reverse transcriptase en **endonuclease** activiteit bezit (fig 10). SINEs (tabel 2) vind je in de meeste zoogdier genomen. De afkomst van het kleine motief van 300 bp is bekend (heeft te maken met een niet voor eiwit coderend RNA in de ribosomen (fig 2), dat een rol speelt bij de eiwitsynthese). Om zich te kunnen vermenigvuldigen gebruikt het reverse transcriptase/endonuclease van de actieve LINES.

Gevolg is dat bij één op de 20 baby's er een SINE kopie is bijgekomen en bij 1 op de 100-200 een nieuwe LINE kopie. Komen deze nieuwe stukjes DNA volledig bij toeval ergens in het genoom terecht? SINEs landen altijd in stukken die eerder in de S-fase worden gekopieerd en LINES in de grote stukken DNA, die later worden gekopieerd (fig 4). Onderzoekers zien de

retrotransposons als een soort van chromosomale kapstok ten behoeve van het ordelijk tot expressie brengen van het genoom en het functioneren van de cel. Dat er heel wat voor nodig is om de hele winkel van verspreid voorkomende retrotransposons zonder ongewenste bijeffecten door de mannelijke en de vrouwelijke kiembaan te krijgen wordt duidelijker in deel II.

Met een combinatie van een oude techniek om korte stukken DNA fysiek te scheiden en “next generation sequencing” om de DNA basenvolgorde per fractie vast te stellen, is het een onderzoeker uit Napels, Giorgio Bernardi gelukt om van de organisatie van chromosomen een te vertellen verhaal te maken. In 1968 begonnen met chromosoomonderzoek, heeft hij dit gebied nooit verlaten en is heel lang actief gebleven. Een manier om naar stukjes DNA van zo rond de 100 kb te kijken is vast te stellen wat de verhouding is tussen de aantallen AT en CG basenparen. De fracties die Giorgio isoleerde verschillen oplopend in het % CG basenparen. Nu blijkt, dat delen van lussen en hele lussen (fig 7) met een op elkaar lijkend percentage CG in het DNA, vaak naast elkaar liggen. In lussen met een wat hoger CG aandeel (van 46% tot 59%, de hoogste waarde) zit een groep genen, zo'n 20 tot 30% van het totaal, die in iedere cel tot expressie komt. Je zou ze kunnen zien als de genen voor “het celgebouw” (structuren als membranen, cytoskelet, kernskelet en alle basale metabole processen). We hebben het hier over het “oude genoom”, niet betrokken bij de talloze specifieke functies van cellen in een meercellig organisme met veel specialisatie. Deze genen worden ook wel “huishoudgenen” genoemd. Dit lus DNA wordt bij een aanstaande celdeling als eerste gekopieerd (H2.2.1). Het gaat om ongeveer 14% van het totaal. In het CG rijke DNA is de dichtheid aan genen hoger. De CGs zijn vooral opvallend aanwezig in het stukje DNA dat aan de eiwitcode vooraf gaat, de promotor (box 1), die mede regelt of het gen ook gebruikt gaat worden (zie fig 11). Toen dit door Adrian Bird werd ontdekt, zo rond 1985, werd voor dit type promotor de term “CG eiland” geïntroduceerd. Dit “oude genoom” zit meer in het centrum van de kern (fig 2, 7). Dat deel van het genoom dat meer met differentiatie binnen individuen en tussen soorten te maken heeft, en gen armer is, zit dan meer perifeer (fig 2, 7). Elk chromosoom heeft stukken van het “oude genoom” en stukken van het evolutionair actievere nieuwere genoom (respectievelijk de lichte en donkere banden van fig 12). Zoals we net zagen bevat het oude vroeg replicerend genoom de SINEs en het nieuwere later replicerende genoom de LINEs, vandaar de gedachte dat deze elementen structuur aan de chromosomen geven en iets met genactiviteit te maken hebben. Naast dit alles hebben chromosomen hun eigen domein in de kern (fig 7) maar erg strikt geregeld kan dat nooit zijn. En zo draagt alles bij aan het beeld van een niet te bevatten complexiteit, zoals in hoofdstuk 1 weergegeven.

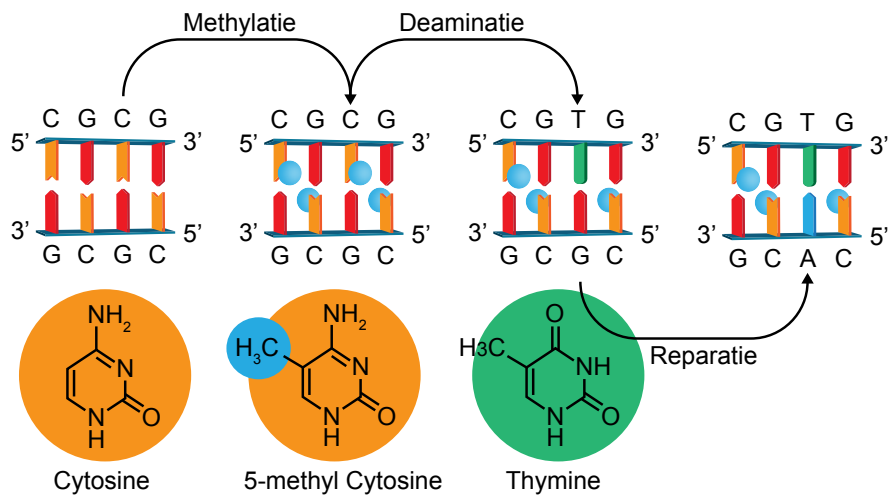


FIG 11

CpG methylerie en de C > T **mutatie**. Het aantal CGs in het humane **genoom** wordt geschat op 29 miljoen. In **somatische** cellen is het merendeel hiervan gemethyleerd en in de mannelijke **kiembaan** ook (fig 23). De hoofdfunctie ervan is om de inactivatie van lokale elementen zoals **retrotransposons** te bevestigen. Het verschijnsel komt in de hoofdstukken 9, 10 15 en 16 en in box 4 nog ruimschoots aan bod. De “CG eilanden” van vele (>60%) voor eiwit coderende genen waaronder de huishoudgenen (H2.3.3) zijn ongemethyleerd, maar CG methylerie lijkt daar geen leidende rol te spelen bij het via de **promotor** reguleren van genactiviteit. Het begrijpen van het **methyloom** is een grote wetenschappelijke uitdaging. De voordelen van CpG methylerie voor genoomregulatie moeten hebben opgewogen tegen het nadeel van een verhoogde kans op de C>T mutatie. Sommige eukaryoten kunnen functioneren zonder dit systeem (het aaltje *Caenorhabditis elegans*).

Genetische variatie

3.1 Inleiding

Wanneer we ons zo halverwege de studie veeteelt eind jaren 60 afvroegen waar de genetica nu eigenlijk om draaide, wat de kern was van het vak, kwamen er twee woorden boven water: **mutatie** en **recombinatie**. Beide dragen bij aan het begrip genetische variatie. Mutatie komt hier aan bod en recombinatie in hoofdstuk 5.

De genetica werd in de begintijd “bedreven” op basis van een selectie van uiterlijke kenmerken. De verschillende manifestaties van zo'n kenmerk (de **fenotypen**, denk bijvoorbeeld aan de kleur van de vacht) konden worden verklaard uit de patronen van overerving met als aanname het bestaan van een enkel **gen**, verantwoordelijk voor het kenmerk. Een voorwaarde voor de vele kruisingsproeven die zijn uitgevoerd is genetische variatie van dat gen, *i.e.* het beschikbaar zijn van tenminste twee door een mutatie veroorzaakte **allelen** (H5, fig 13). Besef wel dat de structurele eigenschappen van **DNA** tot het einde van de Tweede Wereldoorlog volledig onbekend waren. Een groter verschil met de huidige situatie is niet denkbaar. Mutaties worden nu simpelweg vastgesteld door het bepalen van de DNA basenvolgorde (“sequenzen”). Ging het aanvankelijk, zo vanaf het 2^e decennium van deze eeuw vooral om het **exoom** (box 1), de verzameling voor eiwit coderende basenvolgorde (“**whole exome sequencing**”, **WES**), nu rukt het sequenzen van het hele DNA op (“**whole genome sequencing**”, **WGS**). Deze benaderingen, die samengevat worden onder de afkorting **NGS** (“**next generation sequencing**”) leiden tot een ongeëvenaard inzicht in de genetisch variatie bij mens en dier. Waar het om niet-coderend DNA gaat is er dikwijls nog weinig begrip over de samenhang tussen variatie en functie. Waarschijnlijk

heeft een aanzienlijk deel ervan geen directe functie en is het “neutraal”, d.w.z. niet onderhevig aan enige vorm van selectiedruk. Ons beeld van de variatie in het totale bestand aan DNA van mens en dier is weliswaar nog niet compleet maar de contouren van de zich alsmaar uitbreidende kennis hiervan doemen op. Er zijn twee dominante ontwikkelingen. Ten eerste het uitbreiden van het aantal individuen uit de wereldbevolking dat met WES/WGS is gesequenced tot in de miljoenen. Ten tweede de voortdurende progressie in de techniek, waardoor steeds grotere DNA fragmenten in een enkele analysestap door het apparaat worden afgelezen. De tabellen 3 en 4 zijn pogingen om genetische variatie op verschillende niveaus, van een enkele DNA base tot aan hele **chromosomen** toe, samen te vatten. De indeling in typen van genetische variatie berust sterk op de omvang (in basenparen) van het veranderde gebied. Veruit de meeste variatie vindt plaats op het niveau van een enkele base, die dan verandert in één van de drie andere basen (bijvoorbeeld van C naar T, wat het meeste voor komt).

Missende of extra basen worden, wanneer het aantal beperkt is, aangeduid met de verzamelterm **indel** (tabel 3). Veranderingen met een basiseenheid groter dan 50 **nucleotiden** worden samengevat onder de noemer structurele varianten (tabel 3, 4). Binnen de structurele varianten is er een type indeling gemaakt die gedeeltelijk stamt uit de tijd dat chromosomen alleen in mitotische cellen door de lichtmicroscop bestudeerd konden worden (de basis van tabel 4). Tenslotte dragen ook onrustige **retrotransposons** en het verschijnsel “**copy number variation**” bij aan de genetische variatie (tabel 3).

3.2 Variatie op en rond de base

Zoals hiervoor vermeld is sequencen op populatie niveau de aanvoerlijn voor het verkrijgen van inzicht in de genetische variatie bij de mens. In de Nature van 28 mei 2020 geeft het genome aggregation database consortium (gnomAD) een overzicht van de progressie. In hun database zit op die datum de DNA volgorde, meestal exomen (WES) maar ook hele genomen (WGS), van meer dan 140.000 mensen, samen goed voor 270 miljoen varianten, van grotendeels basenpaar veranderingen tot kleine “indels” tot een selectie van structurele varianten met een maximale grootte rond de 10 megabasen (10 miljoen, 10 mb). Een jaar eerder rapporteerde TOPMed, een geheel Amerikaans human **genoom** initiatief gericht op de pathologie van hart, longen, bloed en slaap, de eerste WGS analyse van het DNA van bijna 54.000 mensen met een herkomst van overal over de wereld. Met een beetje rekenen kom je er zo achter dat over de hele groep gerekend, er per 8 basen eentje zit waarop of waaromheen variatie is gevonden. Deze variatie heeft

zich over vele vele generaties opgebouwd en steeds uitgebreid. Het toeval speelt een grote rol bij het ontstaan ervan. De mechanismen om DNA te repareren zijn niet foutloos (denk bijvoorbeeld aan de fouten bij DNA replicatie, H2.2.2) en schade in DNA treedt voortdurend op onder de druk van het zuurstof metabolisme (H14, fig 33) en andere milieu invloeden.

De meeste basenpaar variaties zijn heel zeldzaam. In grote overzichten wordt een kleine 50% van alle verschillende mutaties maar in een enkel persoon gevonden. In ieder genetisch leerboek zul je vinden dat de meeste mutaties nadelig zijn, maar dat geldt natuurlijk niet voor regio's die geen speciale functie hebben. Daarom kun je kennelijk functieloze stukken in het genoom herkennen aan het feit dat de fractie gemuteerde basen daar hoger is. Omgekeerd kun je in de grote databestanden ontdekken dat er door de eeuwen heen selectiedruk is geweest op mutaties die zouden leiden tot een ander aminozuur (box 1). Je ziet dit type mutaties zeldzamer worden.

De analyse van de genetische variatie op base niveau is natuurlijk buitengewoon boeiend omdat het laat zien waarop tijdens onze geschiedenis selectie heeft aangegrepen. Het is een ware goudmijn voor de diverse subdisciplines van de genetica. Ook zullen er analyses verschijnen over het verloop van het ontstaan van genetische variatie over de eeuwen omdat elke gang van het genetisch materiaal door de kiembaan weer tot nieuwe mutaties leidt (tabel 3, 4). Door in combinaties van ouders en kinderen WES/WGS toe te passen ("trio sequencing") hebben we nu een redelijk goed inzicht in het tempo waarin de mutaties ontstaan (aanwezig bij het kind maar afwezig bij de ouders, tabel 3).

Voor basenpaar veranderingen zijn dat er voor ouders van rond de 30 zo'n 60 per generatie (tabel 3).

Tabel 3 Deze tabel geeft een indruk van de genetische variatie in de humane populatie, zoals gebaseerd op **next generation sequencing** van een groeiende steekproef van vele duizenden, zoals in 2019 en 2020 gepubliceerd (zie de lijst van referenties). Deze schattingen zullen bij uitbreiden van de steekproef steeds nauwkeuriger worden, er is nu nog teveel onderrepresentatie van Afrika en delen van Azië. Is nu "short read sequencen" nog dominerend, de bijdrage van "long read sequencen" aan ons inzicht in genetische variatie zal in de komende jaren groeien. Dat geldt vooral voor afwijkingen die groter zijn dan 50 basen. Men praat dan over een structurele varianten/afwijkingen. Een deletie spreekt voor zichzelf. Bij een duplicatie heeft een chromosoomsegment zich ter plekke verdubbeld. Bij een insertie is deze verdubbeling ergens anders in het **genoom** terecht gekomen. *De novo* structurele chromosoomafwijkingen/-varianten ontstaan over het algemeen veel vaker in de mannelijke kiembaan.

Type mutatie	Individuele incidentie	Totale populatie incidentie	De novo mutatie-frequentie	Via vader	Via moeder
Base verandering	1 op 800 basen	1 op 8 basen	1,88 x 10 ⁸ per base per jaar: 56 (beide ouders 30)	1,5 x 10 ⁸ per base op lft 30: totaal 45	0,37 x 10 ⁸ per base op lft 30: totaal 11
Indel	1 op 15.000 basen	1 op 100			
SINE insertie polymorfisme	?	50.000	1 op 20 baby's		
LINE SVA insertie polymorfisme	?	4.000 SVA 4.000 LINE	1 op 100-200 baby's		
Structurele varianten/ abnormaliteiten (ongebalanceerd)*	mediane waarden				
Deletie	3505	186.000			
Duplicatie	732	6000	<i>De novo</i> rate 0,3/kind		
Insertie	2612	121.000			
CNV	548	>12.000			

Voor een uitleg van SINE, LINE, SVA, zie tabel 2. Voor **CNV**, **Indel** en **SNP**, zie de verklarende woordenlijst. Het overgrote deel van de mutatiegebeurtenissen, die hier weergegeven zijn, heeft geen **fenotypische** gevolgen. De mediane waarde is het getal dat in de hele reeks van individuele waarden in het midden ligt. De publicatie van het nu bijna complete humane genoom door het T2T consortium in het voorjaar van 2022 zal een nieuwe impuls geven aan het verder ontwikkelen van ons inzicht in genetische variatie bij de mens, waarvoor een referentie genoom nodig is.

De verdubbelingstijd van de hoeveelheid paternale *de novo* SNPs bedraagt iets van 20 jaar. De maternale *de novo* SNPs nemen ook met de leeftijd toe maar veel langzamer. De toename komt vooral door een verandering van een C naar een G hetgeen duidt op de reparatie van een dubbelstrengs **DNA** breuk.

Wanneer je het tempo van base veranderingen vergelijkt tussen **somatische** cellen (H2.2.2) en de cellen van de kiembaan, moet je wel tot de conclusie komen dat de kiembaan beter beschermd is tegen *de novo* SNPs dan de somatische cellen. Om die vergelijking goed te kunnen maken is inzicht nodig in het aantal celdelingen dat de generaties scheidt. Zoals voor de mannelijke kiembaan in hoofdstuk 12.3 wordt aangegeven is dat bij de mens niet met een redelijke nauwkeurigheid mogelijk. Maar omdat bij de voorspelde 3 baseverandering per **haploïd** genoom per deling bij **somatisch** cellen (H2.2.2) er maar 15 delingen nodig zijn om met de somatische nauwkeurigheid van de DNA replicatie uit te komen op het aantal *de novo* SNPs dat bij de mens per generatie en van de vader afkomstig, wordt gevonden, moet de replicatienauwkeurigheid in de mannelijke kiembaan groter zijn, want 15 is veel te weinig. Recentelijk, in 2021, is deze redenering m.b.v. de resultaten van **NGS**, die de lage **mutatiefrequentie** (27 keer lager vergeleken met de dikke en endeldarm) bevestigen, weer tegen het licht gehouden, waarbij het aantal delingen tussen de generaties weer de onbekende is. Voor de vrouwelijke kiembaan geldt deze redenatie ook.

* Voor structurele varianten (> 50 bp) zal de ontwikkeling van de analyse techniek, inclusief “long read sequenzen” in combinatie met het onderzoeken van steeds meer ouder nakomeling trio's leiden tot een hogere schatting. Ook zullen er steeds meer populaties van over de hele wereld onderzocht worden. In 2020 wordt al een getal van >25.000 per individu genoemd. Met ongebalanceerd wordt bedoeld dat er DNA is bijgekomen of is verdwenen t.o.v. een referentiegenoom. De getallen geven het aantal verschillende SVs per individu en in de onderzoekpopulatie tot dan toe (publicatie 28 mei 2020).

Een groot deel van de variatie op een enkele base positie heeft zich veel eerder in de populatie genesteld, een gegeven dat buitengewoon gunstig is voor het zoeken naar de genetische achtergrond van kenmerken (H6). Genetici spreken over **SNPs**, "single nucleotide polymorphisms". Hoe ontdek je zo'n verandering en dan liefst voor vele posities op het genoom tegelijkertijd zonder hele genomen uit te hoeven lezen? Dit kan met de huidige chip technologie, bijvoorbeeld van de firma Illumina. De chips die gebruikt worden voor het bepalen van de SNPs, lijken op microscoopglasjes. Er zitten zo'n 12 veldjes van 9 x 9 mm op die per veldje met gemak 500.000-1000.000 SNPs uitlezen. Dat gebeurt met behulp van fluorescentielicht. De hele aanpak berust dus op een combinatie van microtechniek, automatisering, en dataverwerking. Het kernbegrip voor SNP analyse is dat een volgorde van zo rond de 20 basen al als een uniek adres fungeert: op elke positie heb je de keus tussen een A, T, C of G. Stel dat ze allemaal een kans van 1/4 hebben voor die ene positie, dan is de kans op die speciale basenvolgorde over 20 naast elkaar gelegen posities $0,25 \times 0,25$ en zo verder gelijk aan $0,25^{20}$. Wel zo klein dat daarmee deze basenvolgorde te beschouwen is als een uniek adres in de zee van 3×10^9 nucleotiden per genoom (H2.1). In werkelijkheid komen de C en G wat lager uit dan 0,25 en de A en T dus wat hoger. Om hier genetisch onderzoek mee te doen moet de SNP base die in de populatie in de minderheid is toch wel bij 1 op de 50 individuen voorkomen. Dit individu is dan zo goed als altijd **heterozygoot** (en de rest **homozygoot**). Samen hebben die 50 individuen 100 basen voor deze ene positie waarvan er nu 1 afwijkend is. Dan is de **allelfrequentie** 1%, de minimale frequentie om voor genetische analyses nuttig te zijn. Aan deze voorwaarde voldoen zo rond de 1 op de 1000 base posities. Wil die frequentie 1% zijn of hoger, wat meestal het geval is, dan kun je aannemen dat de oorspronkelijke mutatie in een heel ver verleden, wie weet voor ons vertrek uit Afrika, heeft plaatsgevonden.

Gek genoeg lees je daar weinig over. Ook moet je aannemen dat er voor dergelijke SNPs geen selectiedruk is geweest.

SNPs zijn heel nuttig om veranderingen in de populatie, zoals het vertrek uit Afrika en de verdere verspreiding van *Homo sapiens* over de wereld te volgen. Onderzoek aan beide hiervoor genoemde DNA banken heeft laten zien dat de variatie in de groep die in Afrika achter bleef groter is dan bij de groep die vertrok, omdat die in omvang kleiner was en als groep minder genetische variatie bevatte dan de achterblijvers. Een extreme illustratie van dit fenomeen vind je bij de Amish, die zich als vroege settlers in de USA zo'n 14 generaties geleden hebben afgezonderd en die nog steeds een eenvoudige stijl van leven aanhangen. Wie weet wel daarom lijkt de *de novo* mutatiefrequentie per base bij hen wat lager te zijn.

3.3 Structurele varianten

Onder structurele varianten verstaat men alle veranderingen die slaan op een DNA segment (of segmenten) groter dan 50 basen. In de klassieke cytogenetica of celgenetica, waarin het door de microscoop bestuderen van chromosomen de hoofdschotel is (H3.4), onderscheidt men gebalanceerde varianten (daar afwijkingen genoemd, geen verlies of toename van DNA) en ongebalanceerde varianten (waar dat wel het geval is). In de laatste categorie vallen segmenten die ontbreken (deleties), die dubbel zijn (duplicaties in tandem), of die (meestal in een verdubbelingsproces) ergens anders terecht zijn gekomen (inserties) (tabel 3). Stuitte je vroeger op de beperkingen in oplossend vermogen van de lichtmicroscoop, waar het met chromosoomsegmenten van 5 mb DNA wel ophoudt, nu is dit met de op de DNA basenvolgorde gebaseerde technieken, van een SNP platform tot WGS, helemaal opgeheven. Daar zit grote kenniswinst. Ongebalanceerde structurele varianten die leiden tot een andere “dosis” DNA dan de **diploïde**, blijken namelijk allesbehalve zeldzaam te zijn (zie tabel 3). Het vraagt wat meer om via sequenzen gebalanceerde chromosoomafwijkingen te ontdekken. Bij het meest frequent voorkomende type hebben twee chromosomen eindstandige stukken uitgewisseld (een reciproke translocatie, fig 12 en tabel 4). Dit komt bij de mens en ook het varken merkwaardig frequent voor, maar bij rund en muis nauwelijks, een tot nu toe onverklaard verschil. Reciproke translocaties zijn op te vatten als een ultieme poging van een cel in de kiembaan om een dubbelstrengs DNA breuk *c.q.* breuken te repareren. WGS maakt tot nu toe voornamelijk gebruik van het zogenaamde “short read sequenzen”. De stukken DNA die fysiek worden geanalyseerd, zijn zo rond de 50-250 basen lang. Daarom is het “pakken” van de overgang van de basenvolgorde van het ene chromosoom naar die van het andere niet makkelijk. Het nu nog duurder “long read sequenzen” zal daar verandering in brengen, maar hiervan zijn nog geen populatie data beschikbaar. Bij deze techniek verwerkt de apparatuur lange stukken DNA, van 10 kb tot wel 2mb aan toe, waardoor overgangen van het ene naar het ander chromosoom beter ontdekt zullen worden. In de legenda van tabel 3 wordt ingegaan op wat de toevoeging van “long read sequenzen” voor het bestuderen van de variatie in het genoom betekent.

Een speciale klasse structurele varianten wordt veroorzaakt door het nog steeds voortgaande proces van springende (inserterende) LINEs en SINEs (H2.3.3, tabel 2, 3, fig 10). Bij de mens zit in één op de 100-200 geboren baby's een nieuwe LINE insertie en in één op de 20 een nieuwe SINE insertie. Ook dit proces leidt tot genetische verschillen tussen mensen zoals weergegeven

in tabel 3. Het is dan ook niet toevallig dat dit type mutatie ook opgepikt wordt wanneer er naar de genetische achtergronden van ziekte wordt gezocht. Toch is de mobiliteit van SINEs en LINEs niet een dominante drijvende kracht achter genetische pathologie.

Een andere bron van structurele variatie is te vinden bij DNA motieven van tussen de 500 basen en een megabase lang, die in tandem in een wisselend aantal kopieën voor kunnen komen. Dit verschijnsel wordt **CNV**, copy number variation genoemd. Tabel 3 laat zien dat deze variatie niet zeldzaam is. CNV heeft vanaf 2007 nogal de aandacht getrokken vanwege de ontdekking dat dit proces een rol kan spelen bij de neuropathologie, zoals tot uiting komend bij autisme. Later werd een betrokkenheid van CNV ook vastgesteld bij schizofrenie en een verstandelijke handicap. Momenteel is er nog geen volledig inzicht in de rol van CNV aan de totale genetische variatie en in de bijdrage ervan aan de humane pathologie, maar dat het er een rol bij kan spelen staat vast. Voor de ongebalanceerde structurele varianten geldt net als voor de veranderingen op een enkele base positie, dat ongeveer de helft ervan maar bij een enkel persoon gevonden is, dus uit een unieke mutatiegebeurtenis bestaat, iets dat waarschijnlijker wordt naarmate het getroffen gebied groter is.

3.4 De geschiedenis van de cytogenetica, het in beeld krijgen van structurele chromosoomafwijkingen en afwijkingen in het aantal chromosomen

Structurele en numerieke chromosoomvarianten werden aanvankelijk bestudeerd door **cytogenetici**, de specialisten binnen de genetica die zich bezig houden met het bestuderen van de chromosomen door de lichtmicroscopie (fig 12). Door met name deze aanpak is de humane genetica na de Tweede Wereldoorlog verder tot ontwikkeling gekomen. Cytogenetica lijkt misschien een uitstervend vak, omdat de daarin gebruikte technieken worden ingehaald door de DNA analyse technieken, maar dat doet het vak tekort.

Van meet af aan bleek het niet makkelijk om de chromosomen van zoogdieren op een routinematige basis te bestuderen. De tijd die een cel erover doet om te delen is relatief kort in vergelijking met de tijd die verloopt tussen twee delingen (fig 4). Het zoeken naar delende cellen is een tijdrovende en vermoeiende klus. Gelukkig ontdekten Charles Ford en John Hamerton in 1953 de werking van colchicine als remmer van de **spoelfiguur** in de aanloop naar de metafase (fig 3, 4). Ze zagen dat bij gebruik ervan de chromosomen blijven hangen in de sterk verkorte, gespiraliseerde vorm. Colchicine is een z.g. alkaloid. Dit zijn stikstofhoudende stoffen van plant-

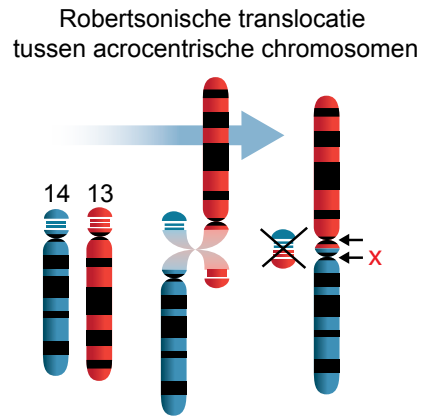
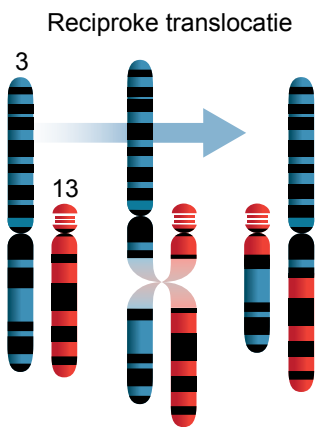
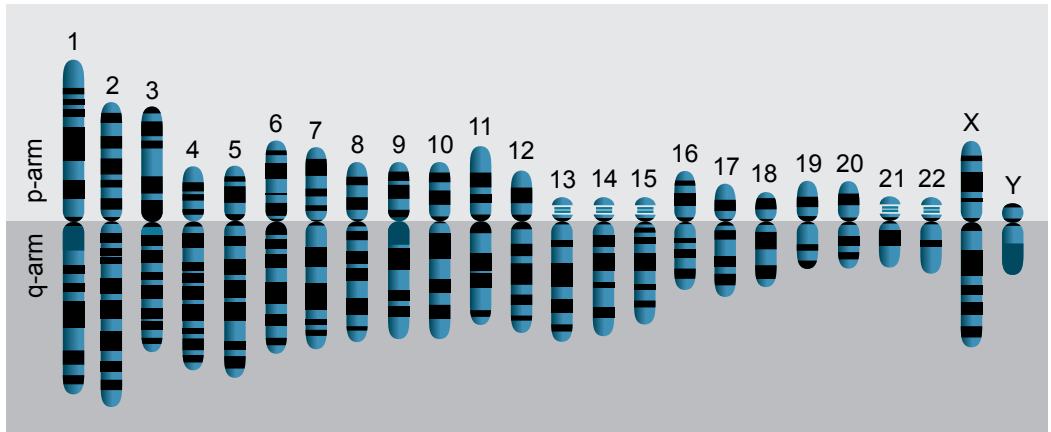


FIG 12

Een op G(iemsa) bandering gebaseerd **haploïd karyogram** van de mens. De hoge resolutie die zich hier uit in een groter aantal banden, kan alleen worden bereikt wanneer de chromosomen nog niet maximaal zijn gescaliseerd, dus op weg zijn naar de metafase (fig 3). De lichte banden representeren de gen rijke gebieden, de donkere banden de gen armere. Bij de mens zijn reciproke en Robertsonische translocaties niet zeldzaam (tabel 4). Tot de laatste categorie horen translocaties die in het **centromeer**-gebied bij het **heterochromatine** (tabel 1) plaats vinden tussen chromosomen met microscopisch een bijna eindstandig centromeer (acrocentrisch, de chromosomen 13, 14, 15, 21 en 22). De het meest voorkomende manier van ontstaan is hier weergegeven, waarbij de twee centromeren hun activiteit coördineren of er één wordt onderdrukt (het rode kruisje).

Tabel 4 De **cytogenetica** van **chromosoomafwijkingen** bij de geboorte, gebaseerd op een groot Deens bevolkingsonderzoek (n = 34910) uit 1991, zie de lijst van referenties. De schattingen van de kans op het ontstaan van een nieuwe translocatie stammen uit dezelfde periode en zijn afkomstig van 2 publicaties (bij de referenties). NB dit zijn de getallen van vóór de prenatale diagnostiek op bevolkingsniveau.

Structurele chromosoomafwijkingen gebalanceerd *	Per 1000 geboorten	De novo frequentie
Robertsonische translocaties**	1,23	$0,7 \times 10^{-4}$, $1,1 \times 10^{-4}$
Reciproke translocaties***	1,43	$2,7 \times 10^{-4}$, 5×10^{-4}
Inversies	0,34	
Structurele afwijkingen ongebalanceerd *		
Deleties, duplicaties, merkers, ringen	0,29	
Numerieke afwijkingen		
Autosomen ****	2,07	
Sex chromosomen (inclusief cytogenetische varianten) *****		
47,XXY	0,83	
47,XYY	0,60	
47,XXX	0,52	
45,X	0,26	
Totaal	7,57	

* Bij een ongebalanceerde chromosoomafwijking is er genetisch materiaal bijgekomen en/of verdwenen.

** Robertsonische translocaties ontstaan bijna allemaal in de vrouwelijke kiembaan.

*** Reciproke translocaties ontstaan bij allemaal in de mannelijke kiembaan.

**** Dit zijn bijna allemaal trisomieën 21 (Down syndroom), bij moeders onder de 30 ongeveer 1 op de 1500, boven de 40 is dat opgelopen tot 1 op de 100 geboorten. Ze zijn voor 90% van maternale oorsprong, iets dat algemeen voor trisomieën geldig is. De uitzonderingen op deze regel zijn 47,XYY (allemaal paternaal) en 47,XXY (fifty fifty paternaal en materaal).

***** Om de frequenties per geslacht te schatten kunnen de getallen worden verdubbeld. De onderzoekers vermelden 51,2% jongens.

aardige oorsprong, die gekenmerkt worden door complexe ringvormige structuren. Caffeïne en morfine behoren ook tot deze familie evenals vincristine uit de roze maagdenpalm, dat eveneens de spoelfiguur hindert. Colchicine wordt gewonnen uit de herfsttijloos, een crocusachtige exoot die in de herfst bloeit. Met de ontdekking en het gebruik van dit type stoffen was er een voorname voorwaarde vervuld om routinematig aan chromosoomonderzoek te beginnen. Een ander obstakel had te maken met de problemen die het opleverde om chromosomen die in de kern en de spoelfiguur opeengepakt zitten, wat losser van elkaar te krijgen. In de jaren 50 is bij toeval ontdekt, dat wanneer je cellen een wasbeurt geeft in een eenvoudige zwakke hypotone zoutoplossing, ze gaan zwellen. De afstand tussen de op de deling wachtende chromosomen wordt hierdoor groter. De kunst is om deze situatie door middel van een fixatief vast te leggen. Hiervoor werd en wordt routinematig een mengsel van 3 delen methanol (of ethanol) en één deel azijnzuur gebruikt. De klap op de vuurpijl bestaat uit de overdracht van een paar druppels fixatief met cellen naar het microscoopglasje, en het laten indrogen van het preparaat tot een stadium dat in de Engelse literatuur "air dry" wordt genoemd.

Rond de zonet beschreven methode hing een redelijke mate van mystiek, maar het had en heeft ook iets artistieks. Wanneer de chromosomen te veel over elkaar heen liggen is de microscopische analyse geen lolletje. Uitgaande van een populatie actief delende cellen zoals je kunt vinden in het embryonaal/foetaal weefsel, in beenmerg en in de testis, kreeg je het eenvoudigst het gewenste resultaat. Zo werd het chromosoomaantal van een diploïde cel voor de mens in 1956 bepaald op 46, in een race die door Charles Ford en John Hamerton nipt werd verloren, maar zij konden de resultaten van Tjio en Levan uit Zweden aan het eind van dat jaar bevestigen. Daarna begon de eerste oogst van genetische diagnoses bij de mens. Alleen al in 1959 werd het volgende ontdekt: voor de **autosomen**: Down syndroom is een chromosoom te veel (47,XX,+21; 47,XY,+21); voor de **sex chromosomen**: Turner syndroom is een X chromosoom te weinig (45,X) en Klinefelter syndroom is een X chromosoom te veel (47,XXY). Bij de diagnose van Turner syndroom won Charles Ford de race.

Omdat ik bij het afstudeeronderzoek in Wageningen had ontdekt dat, wanneer je aan iets nieuws begint en niet goed wordt ingewerkt, je eeuwig achter de feiten aan loopt, was bij aanstelling (in 1971) aan de afdeling Erfelijkheidsleer van de toenmalige Landbouwniversiteit besloten dat ik op stage zou gaan naar het Verenigd Koninkrijk dat in die jaren al vooraanstaand, zo niet leidend was in de voortplantingsgenetica. De cytogenetica bloeide en de beoefenaren hielden internationale congressen waar over alles werd verteld, van plant tot sprinkhaan tot fruitvlieg tot zoogdieren inclusief de mens. Via mijn baas in Wageningen, lector Jaap Sybenga liep er

een bruggetje naar de Sir William Dunn school of Pathology, South Parks Road, Oxford, waar Dr C.E. Ford als MRC radiobiology unit “external staff member” kantoor en laboratorium hield. De hele wereld kwam daar langs om zich te bekwamen in het maken van chromosoompreparaten van voornamelijk de muis. Relatief gemakkelijk werk zoals de analyse van de bloedvormende cellen uit beenmerg of de cellen van het hoornvlies van het oog (die in de morgen delen), maar ook moeilijker, zoals het maken van chromosoompreparaten van de embryonale vliezen, **embryo's** en **foetussen** na de implantatie en embryo's vanaf de samensmelting van zaadcel en eicel tot aan de implantatie (fig 43). Eicellen tijdens de **meiotische delingen** (fig 13, 14, 39, 42) en de hele **spermatogenese** met **mitotische** delingen van de spermatogonia en de meiotische delingen van de spermatocyten (fig 31) kwamen natuurlijk ook aan bod.

Elke vrijdag 3 maanden lang kreeg ik les van Dr Ted Evans, een tot de muis bekeerde plantencytogeneticus, met wie Charles Ford een soort van gouden duo vormde. Van elke publicatie werden, alvorens het in te dienen bij een tijdschrift en nadat het al diverse malen herschreven was, alle referenties nog eens nauwkeurig gecheckt. Charles was in alle opzichten “a good sport”, de originele observatie werd geciteerd, zodat degene die de eer toekwam die ook zou krijgen. Er is in dit opzicht wel wat veranderd. Charles Ford was een bijzondere man, eeuwig gedreven, scherp, wat excentriek en ontzettend aardig.

Om van een veldje van met methanol en azijnzuur gefixeerde chromosomen een analyse te kunnen doen moest je ze vóór het computertijdperk fotograferen, afdrukken, uitknippen en dan als **homologe** paren bij elkaar zoeken. Zo maak je een **karyogram**, het systematisch rangschikken van de identieke chromosomen in homologe paren. Soms zijn de vormverschillen zo groot, dat je met zekerheid de exemplaren van beide ouders naast elkaar kunt plakken (maar je weet natuurlijk niet welk chromosoom van welke ouder is). Alleen voor de geslachtschromosomen van een mannelijke cel weet je dat vaak wel omdat het Y chromosoom meestal relatief makkelijk te herkennen is.

Afhankelijk van de soort was een kleiner of groter deel van de chromosomen niet eenduidig te identificeren. Die eerste karyogrammen stelden dus niet zo veel voor.

In 1970 publiceerde Torbjorn Caspersson van het Karolinska Instituut in Stockholm het resultaat van een kleuring van de chromosomen met het **fluorochroom** quinacrine mosterd. Elk chromosoom bleek in de daarvoor geschikte microscoop zo zijn eigen fluorescentie opdruk te hebben. Voor geoefende patroonherkenners was het niet meer moeilijk om een karyogram te leggen dat wel klopt. Een jaar later werd ontdekt dat je met de ouderwetse kernkleurstof Giemsa (een mengsel uit 1904, genoemd naar de Duitse bacterioloog en chemicus Gustav Giemsa) een

nog duidelijker bandenpatroon kan krijgen dat in de gewone lichtmicroscopie te zien is (fig 12). Quinacrine bindt beter aan stukken DNA die rijker zijn in AT/TA basenparen. Een van de ontdekkingen uit die jaren was dat een deel van de lange arm van de humane Y (fig 38), het deel dat geen genen bevat, **heterochromatisch** is en nogal in lengte kan variëren, het felst fluoresceert van alles en ook in zaadcellen oplicht. Zo kun je zaadcellen dus seksen, maar bruikbaar zijn ze dan niet meer.

De analysemethode m.b.v. Giemsa bandjes heeft het dus gewonnen. Hoe langer de chromosomen, hoe beter de resultaten maar hoe moeilijker de chromosomen op het glas naast elkaar te krijgen zijn. Op het menselijke gebied verscheen er een Amerikaanse publicatie met wel 2000 banden, nog steeds $1,5 \times 10^6$ (1,5 mb) per band. Wel kon je zo zien hoe de donkere banden werden samengevoegd bij het korter worden van de chromosomen. Al snel werd duidelijk dat de donkere banden hun DNA later in de S fase (fig 4) repliceren dan de lichtere banden. De LINEs (H2.3.3) liggen in de donkere banden, de SINEs in de lichtere. De CG rijke segmenten van Giorgio Bernardi in de lichte en de AT rijke in de donkere (H2.3.3). Zo werd er jaren geleden al volop gespeculeerd over het “compartimentaliseren” van het genoom. Het verschijnen van de bandjes voedde de discussie natuurlijk, die nu, met het ontdekken van de TAD's en hoe die in hogere orde structuren kunnen aggregeren (H2.3, fig 7, 12) weer nieuw leven in wordt geblazen.

Om routinematig naar de chromosomen van mens en muis te kijken heb je een celsysteem nodig waar je makkelijk aan kan komen. In bloed zitten witte bloedlichaampjes maar die delen niet. Het stofje PHA (phytohemagglutinine, een extract uit de boon *Phaseolus*) stimuleert een deel van de bloedcellen tot deling, een ontdekking van rond 1960. Zo lag de weg naar cytogenetisch onderzoek bij patiënten open: vanaf 1978 werd het vaststellen van een chromosoomportret meegenomen in de algemene bekostiging van medische verrichtingen.

3.4.1 De microscopie van structurele chromosoomafwijkingen

De cytogenetica heeft ons een eerste inzicht in structurele chromosoomafwijkingen verschaft, zeker nadat chromosombanding voor het maken van een karyogram standaard werd. Nu waren uitwisselingen van chromosoomsegmenten tussen verschillende chromosomen, de oorsprong van een reciproke translocatie, beter te ontdekken (fig 12). Bij het leggen van het karyogram hield je dan 4 chromosomen over, de twee oorspronkelijke en de twee met de uitgewisselde segmenten. Bij de mens komt dit eigenlijk merkwaardig frequent voor (tabel 4). Meestal is er aan een drager uiterlijk niets te zien. Bij IVF stellen waarbij de reden voor verwijzing bij de

man ligt kom je ze vaker tegen (H12.12.1, tabel 6). Ook andere type translocatie, de Robertsonische translocatie, is niet zeldzaam (tabel 4, voor een uitleg zie fig 12). Translocaties moeten een rol hebben gespeeld in de evolutie, anders waren de karyogrammen van de verschillende zoogdiersoorten niet zo verschillend geweest. Wil je met chromosombandingen een reciproke translocatie zien, dan moeten de chromosoomsegmenten die twee niet homologe chromosomen hebben uitgewisseld (fig 12) best groot zijn, minimaal in de orde van ettelijke megabasen.

Een enkele keer vestigt zo'n structurele chromosoomafwijking zich in de populatie. Bij de mens is zo'n 2% drager van een inversie in chromosoom 9 (fig 12). Het omgedraaide chromosoomsegment is heterochromatisch en bevat het centromeer. Dit geeft bij het passeren van de meiose geen problemen. Cytogenetici spreken van een neutrale variant.

De reciproke translocaties bij de muis, waar ze spontaan nauwelijks voorkomen, zijn vooral ontstaan na het bestralen (met ioniserende straling) van de testis. Draggers van een reciproke translocatie bij muis, varken en hond hebben een sterk verkleinde worpgrootte. Als gevolg van de homologe chromosoomparing tijdens de eerste meiotische deling zoeken de 4 betrokken chromosomen elkaar op (H5.1, fig 12, 14). Dit leidt tijdens de daarop volgende meiotische reductiedelingen tot de productie van gameten die voor de helft tot meer dan de helft tegelijkertijd chromosoomsegmenten missen en dubbel hebben (fig 26). Dit leidt na de bevruchting, zo rond de periode van de implantatie, weer tot embryonale sterfte. Bij de mens verwacht je een verlengde tijd tussen opvolgende geboorten, wat echter in de huidige tijd in de meeste samenlevingen niet op valt. De helft van de kinderen vererft de reciproke translocatie, de andere helft is chromosomaal normaal. Elke reciproke translocatie is weer anders, er moeten er zijn die zich generaties lang schuil kunnen houden in de populatie, en niet bekend is hoe vaak dit voorkomt. Er zijn er ook met een vergrote kans op een kind met een aangeboren afwijking. Dat komt door het missen en drievoudig aanwezig zijn van de uitgewisselde chromosoomsegmenten, waarbij het genoom niet voldoende uit balans was om tot prenatale sterfte te leiden.

3.4.2 De microscopie van afwijkingen in het aantal chromosomen

Hoe frequent afwijkingen in het aantal chromosomen bij de mens rond de conceptie kunnen ontstaan, was al een beetje duidelijk door de welbekende relatie tussen de leeftijd van de moeder en de kans op een kind met Down syndroom (waarover meer in H11.4.1). Door het werk van een Frans echtpaar in de jaren 70 kwam hier een nieuw licht op te schijnen. J en A Boué deden systematisch cytogenetisch onderzoek aan celmateriaal van spontane abortussen bij de mens,

die bijna allemaal in de eerst drie maanden van de zwangerschap plaats vinden. In rond 60% van deze serie van 1498 afgestorven vruchten klopte het chromosoomaantal niet, waardoor ze niet levensvatbaar waren. Meestal zagen ze een **aneuploidie**, een chromosoom te veel (54% van de abnormale karyotypen), veel minder vaak een chromosoom te weinig (altijd een 45,X Turner syndroom, 15%). In 26% van de chromosomaal afwijkende vruchten was er sprake van een **polyploidie** (triploidie en soms een tetraploidie). Later onderzoek waarbij alle chromosomen onderscheiden konden worden bevestigde dat trisomie 21 (Down syndroom) bij een spontane abortus geen zeldzaamheid is (toch zeker 10% van de trisomieën). Voor die tijd was dit een opzienbarende ontdekking. Het werk werd gepubliceerd in een boek over verouderende eicellen en zaadcellen en kwam zo in de vergetelheid terecht, ondanks het feit dat de Boués de eersten waren die op zo grote schaal aantonden, dat het bij het bepalen van het juiste chromosoomaantal voorafgaand en bij de conceptie (en in mindere mate vlak daarna) betrekkelijk vaak mis gaat. De data uit hun werk kom je in de huidige overzichten over dit thema niet meer tegen. Bij wijze van eerherstel heeft het tijdschrift Birth Defects Research hun publicatie als een classic paper in 2013 herdrukt.

Vanaf de 70-er jaren van de vorige eeuw werd het bij de muis mogelijk om embryo's te verkrijgen die voor elk van de 19 autosomen een chromosoom teveel of te weinig hadden. De embryo's met een chromosoom te weinig gaan allemaal zo rond de innesteling of iets erna te gronde. De overleving van de embryo's met een chromosoom teveel is veel variabelere, maar geen overleeft het tot na de geboorte, ook niet voor het kleinste muizenchromosoom. Te weinig genproduct is dus aanzienlijk erger dan een teveel ervan. Dit verschijnsel staat bekend onder de naam **gendosis effecten**, waaronder ook **haplo-insufficiëntie** valt. Zonder uitzondering werken eiwitten op allerlei manieren met elkaar samen en in die samenwerking tellen de verhoudingen (H1). Dat bij de mens trisomieën voor chromosoom 21, alhoewel ze veel gevoeliger zijn voor prenatale sterfte dan chromosomaal normale embryo's, toch nog relatief vaak de hele zwangerschap kunnen doormaken en geboren worden, wordt wel toegeschreven aan het feit dat dit chromosoom relatief weinig eiwit coderende genen huisvest.

Voor de **sex chromosomen** ligt het anders. Per cel wordt ieder X chromosoom boven het getal van 1 geïnactiveerd (H2.3.2, box 4). Wanneer dit perfect verliep zouden vrouwen met 3 X chromosomen op geen enkele manier op kunnen vallen maar dat is niet zo: X chromosoom inactivatie is niet volledig (box 4). Hoe interessant dat op zichzelf is, je komt het maar zelden tegen in de vele publieke journalistieke onderzoeken naar het verschil tussen mannen en vrouwen. Ook bij Klinefelters (XXY, tabel 4) speelt die incomplete X chromosoom inactivatie een rol. Het

verklaart ook dat er een syndroom, het Turner syndroom, gekoppeld is aan het 45,X **karyotype**. Tenslotte worden twee Y chromosomen verdragen (tabel 4), de Y is **gen arm** (H12.12.2, fig 38).

In de winter van 1976 op 1977 werkte ik op de Medical Reserch Council clinical and population cytogenetics unit naast het Western General Hospital in Edinburgh. In Schotland wordt bijna iedere baby in het ziekenhuis geboren. Omdat het lab gespecialiseerd was in het maken van chromosoomportretten, begon men daar aan het karyotyperen van meer dan 10.000 opeenvolgende ziekenhuisgeboorten. Natuurlijk werden er baby's met afwijkende karyogrammen gevonden, ook voor de 4 geslachtschromosomen (tabel 4). Shirley Ratcliffe werkte als kinderarts aan follow up onderzoek van deze baby's. Toen speelde al wat je de ouders kon of zou vertellen over de genetische make up van het kind, wanneer die make up niet meteen in het fenotype zichtbaar is en een deterministische interpretatie van de genetische diagnose ongewenst. Over een jongetje met een extra X of Y chromosoom vertelde zij de ouders niets, maar wel wilde ze vervolgonderzoek doen. Bij Klinefelters (XXY) is de spermatogenese gestoord, dat komt hierna nog aan bod (H12.12.1). Met niet heel heldere redenen omkleed, werden de kinderen voor controle naar het ziekenhuis gelokt. Op haar broekrok met Schotse ruit motief zaten twee diepe zakken. In een ervan een kralensnoer met kralen van langzaam oplopende grootte (een orchidometer). De kunst was nu om tegelijkertijd een testikel te palperen en met de andere hand de in grootte vergelijkbare kraal te vinden, onze tastzin is goed ontwikkeld! Over de XYY jongetjes vertelde ze dat deze wat vaker een ongelukje hadden door onhandig gedrag. In 1999 kwam de publicatie hierover uit, haar laatste gerelateerd aan die vermeende agressiviteit van mannen met een extra Y chromosoom. De conclusie, gebaseerd op 16 XYY jongens gevonden in de 34.380 gekarotypeerde baby's tussen 1967 en 1979, was voorzichtig. Ja, er was iets meer antisociaal gedrag en ook wel met een toefje criminaliteit, maar dat was voornamelijk toe te schrijven aan een verminderde intelligentie. Verder was zelfs deze studie statistisch nog wat aan de magere kant, schreef ze.

In het volgende hoofdstuk (4) zal ik proberen zoveel als mogelijk de biologische relevantie van de genetische variatie als basis van het verklaren van het fenotype aan bod te laten komen, waarna in deel II de rol van de kiembaan als aanjager (en/of bedwinger?) van de genetische variatie wordt beschreven.

Van genotype naar fenotype

4.1 Genetische dissectie

Hoe uit genetische variatie zich nu in wat we zien aan een ander, hoe we er zelf uitzien en hoe we functioneren, kortom hoe vertaalt het **genotype** zich in het **fenotype**? Dit is een soort van heilige graal en onderwerp van ontelbare studies. De meeste aandacht gaat uit naar de betrokkenheid van genetische variatie bij ziekte en gezondheid, maar de genetische basis van intelligentie, karakter, BMI, het komt allemaal langs in de vak- en in de populaire literatuur. Een toch wel grote groep van **genen** is verantwoordelijk voor **recessief** overervende aandoeningen (“monogen”), de meeste zijn extreem zeldzaam. Afwijkingen aan genen, die **dominant** overerven zijn er in verhouding minder (H18.1). Niet voor elk **gen** geldt dat wanneer het maar in een enkele kopie functioneel aanwezig is, er een fenotype vast te stellen is. Wanneer dat wel zo is spreekt men van **haplo-insufficiëntie**, het schadelijk zijn van een enkele gendosis, wat zich kan uiten als dominant overervend.

Toen de techniek om genen met behulp van **homologe recombinatie** in embryonale stamcellen uit te schakelen er eind jaren 80 bij de muis eenmaal was (box 2, 3, fig 19), brak er een rijke tijd aan. Je gebruikt genetisch gereedschap voor het oplossen van een celbiologische of algemeen fysiologische puzzel en legt zo de link met het fenotype. Het maakt niet uit waar dat gen tot expressie komt, bijvoorbeeld in de voortplantingsorganen of in het jonge **embryo**. Deze aanpak van onderzoek staat bekend als **genetische dissectie**. Aldus kon je als promovendus beginnen aan een project dat berust op het uitschakelen van een belangrijk geacht gen dat bijvoorbeeld betrokken is bij de energiehuishouding van de cel; het zag er veelbelovend uit, anders was het niet door de wetenschappelijke wereld goedgekeurd. Wanneer de langverwachte

knockout muizen (box 3, fig 19) er eenmaal waren, was er regelmatig op het eerst gezicht niets te zien, maar wie weet wanneer je met nauwkeuriger methoden het fenotype ging bepalen wel. In het vak wordt dit fenomeen gevangen met de term “**genetic redundancy**”.

Meerdere wegen leiden naar Rome en de cellen waarin dit gen tot expressie komt zijn niet voor een gat te vangen. Maar het omgekeerde komt ook voor, iets vinden waar je helemaal niet naar op zoek was. De knockout homozygoten van je lievelingsgen blijken dan bijvoorbeeld onverwachts mannelijk steriel te zijn. De bevinding dat embryo's die zowel van de vader als van de moeder een defecte genkopie hebben gekregen (en dus **homozygoot -/-**) niet levensvatbaar zijn was een andere verrassing. Zo is ook ontdekt dat knockouts voor genen die betrokken zijn bij het repareren van een dubbelstrengs breuk in het **DNA** (fig 33) heel vaak embryo's opleveren die rond de implantatie afsterven. Wanneer het embryo in de fase van snelle celdelingen en groei komt, zo net na de innesteling in de baarmoederwand, gaat het mis. De gereedschapskist van de genenmanipulators was in 1994 al zo uitgebreid, dat hier een mouw aan te passen was. Je zou het effect van de knockout willen beperken tot het proces dat je wilt bestuderen, bijvoorbeeld de **spermatogenese**. In box 3 en figuur 20 wordt uitgelegd hoe dat werkt. Zo kun je met behulp van homologe recombinatie in stamcellen (box 2) het gen van keuze in principe in ieder gewenst celtype veranderen, maar de ingewikkeldheid en kostbaarheid van de methode blijft. De CRISPR-Cas technologie (box 3) heeft genetische manipulatie vele malen eenvoudiger gemaakt, maar dat betekent niet dat nu alles tegen lage kosten weefsel of celtype specifiek mogelijk is.

Van veel genen weten we wat de functie ervan is, maar van nog meer is dat nog niet bekend. De wetenschappelijke gemeenschap streeft natuurlijk naar een zo volledig mogelijk inzicht. Uit de DNA code van het gen is al veel af te leiden. In een volgende stap wil je weten in welke cellen en weefsels het gen tot expressie komt en ook daarvoor bestaan er databases. Maar het meer definitieve inzicht krijg je wanneer het gen door een **mutatie** wordt uitgeschakeld (box 3). De internationale muizengemeenschap heeft nu de ambitie dit voor elk gen te doen. Het Jackson laboratorium (Bar Harbor, Maine en heel groot in de genetica van de muis), is daar een drijvende kracht in. Dit mondiale initiatief staat bekend onder de naam International Mouse Phenotyping Consortium (IMPC). In totaal 19 instellingen van over de hele wereld doen er aan mee met een nadruk op Noord Amerika, Europa (waaronder de MRC unit in Harwell, H2.3.2) en China maar er zijn ook labs in India en in Zuid Afrika (Nederland niet). Essentieel is dat de manier van fenotyperen volgens een vast protocol gebeurt. Tot oktober 2021 zijn er 7824 genen op deze manier bestudeerd. Daarvan hadden er 871 te maken met de reproductie waarvan 200 met de geslachtsbepaling. Voor 308 genen leidde het tot een aantasting van de vruchtbaarheid.

Bob Braun, een met het Jackson lab verbonden wetenschapper die sterk bij het IMPC betrokken is, voorspelde dat we eind 2021 op de helft van de ongeveer 20.000 genen zullen zitten. Inderdaad zijn er inmiddels (het is nu 19-07-2022) 8267 onderzocht. De stap van het fenotype van de knockout naar de precieze functie van het gen is toch nog een grote.

Eiwitten kunnen ongekend veelzijdig zijn en zelfs voor het product van een uit en te na bestudeerd gen als *p53* (H2.2.1) met meer dan 50.000 publicaties in de database worden er nog steeds nieuwe aspecten in kaart gebracht. Een veilige aanname is dat we van de helft van de voor eiwit coderende genen nog geen goed idee hebben van de functie en van de overige is dat idee vaak nog niet compleet.

Bob Braun kwam ik ooit tegen op een Gordon conferentie. Gordon conferenties, een Amerikaans initiatief dat er al jaren is, vormen een laagdrempelig podium voor de drijvende onderzoekers en hun jonge aanwas in een gespecialiseerd wetenschapsgebied. In de morgen zijn er voordrachten en wat er zoal meer is, in de middag is men vrij. Afhankelijk van de congreslocatie gaat een deel van de mensen golfen terwijl anderen gaan zwemmen in een mooi door naaldhout omzoomd meer met schoon water. Na het avondeten zijn er weer voordrachten en daarna onderuitgezakt tot (zeer) laat door. Dit soort bijeenkomsten zijn altijd competitief, maar tegelijkertijd heel informeel, een goede kant van het Amerikaanse wetenschapssysteem.

Kijkend naar de fysiologische rol van genfuncties valt op dat de essentiële genen veel met ontwikkeling en embryologie te maken hebben en vaak belangrijk zijn in eiwitnetwerken. Dit zijn ook genen waarop “genetic redundancy” niet van toepassing is. Er zijn dus geen reserve kopieën om beschadigingen op te vangen. Deze reserve kopieën vallen onder het begrip **paralogen**, een logisch gevolg van het gegeven dat verdubbelingen van het genetisch materiaal tijdens de evolutie een rol heeft gespeeld (Susumu Ohno, H2.3.2). Ons genoom is tegelijkertijd heel robuust, flexibiliteit in het DNA wordt getolereerd, en heel kwetsbaar, een enkele verkeerde base kan al dramatische consequenties hebben.

4.2 Genetische dissectie bij de mens

In 2000 werd de eerste versie van de basensamenstelling van het humane genoom gepubliceerd. Op een bekende foto zie je een trotse president Clinton naast Graig Venter van Celera Genomics staan, het bedrijf dat hij had opgericht om het tempo van het Human Genome project van de 90-er jaren op te voeren. Aan de andere kant van Clinton staat Francis Collins als representant van het publieke geld van de NIH.

Sinds 2000 zijn er verschillende edities van de DNA basencompositie, onze genetische identiteit, verschenen. De versie van voorjaar 2022 is geproduceerd door het T2T consortium waarin T staat voor **telomeer**. De combinatie van “long read sequenzen” met de meer traditionele aanpak van de DNA basenvolgordebepaling heeft geleid tot het vullen van de gaten waarin de repeat structuur (zie bijvoorbeeld tabel 2) van het genoom spelbreker was, zoals aan de chromosoomenden, in en rond de **centromeren** en in de korte armen van de acrocentrische chromosomen 13, 14, 15, 21, en 22 (fig 12). Het humane genoom is nu zo goed als volledig in kaart gebracht en de gepubliceerde 2022 (vrouwelijke) versie kan als referentie voor de notatie van varianten functioneren (tabel 3).

Geholpen door de al maar toenemende omvang van de menselijke aanwezigheid op aarde, door het voortschrijden van de combi “medische wetenschap-genetica” en het internationale karakter van het bedrijven van wetenschap, doen we op grote schaal zelf aan genetisch onderzoek. En dat allemaal door het nooit ophoudende proces van spontane mutatie in de **kiembaan** (H3, tabel 3). Voor het opsporen van op een enkel gen berustende (monofactoriële, “monogene”) genetische aandoeningen werkt het ziekenhuis, de combinatie van specialisten en klinisch genetici (en aangejaagd door de technologische progressie in de analyse van DNA) als een zeef. En omdat het aantal geboorten in landen met goede medische zorg over de wereld in omvang hoog is (van 6-20 per 1000 inwoners per jaar) blijven op deze zeef biologisch uiterst interessante, maar in de persoonlijke sfeer soms zeer ingrijpende fenotypen liggen. Wat er tussen de jaren 70 en nu technologisch op het gebied van het genotyperen is gebeurd, culminerend in de toepassing van **WES** en **WGS**, zie je terug in het aantal genetische diagnoses in Nederland, van minder dan 1000 voor het jaar 1978 tot 125.000 in 2018. Je vraagt je af of er een eind aan deze ontwikkeling komt.

In de jaren 70 begon Victor McKusick van de Johns Hopkins Universiteit in Baltimore met het catalogiseren van genetische aandoeningen bij de mens, waarvan de oorzaak is gelegen in een defect aan een enkel gen. Ook vermeldde hij de manier van overerven, recessief, dominant of intermediair. We verbleven nog in de tijd van de kaartenbak en in de vroege uren van de morgen werkte hij hieraan, buiten zijn normale werk als cardioloog om. De lijst stond bekend als “McKusick’s list” en ik herinner me dat die toen, rond 1980, zo’n 400 genetische defecten lang was. Maart 2021 bevat deze database een lijst van meer dan 4000 monogene aandoeningen. Elke zomer toog de professor naar Bar Harbor, Mount Desert Island in Maine, voor wetenschap op hoog niveau in de adembenemende entourage van Acadia nationaal park. Op dit eiland, eigenlijk een schiereiland, dat met een brug verbonden is met het vaste land, en in de 30-er jaren

speelparadijs was van rijke families zoals de Rockefellers, werd in het jaar 1929 het Jackson laboratorium gesticht. Dit laboratorium herbergt, levend en/of in **cryo** vaten met vloeibare stikstof als embryo ingevroren, de grootste collectie muizen met een genetische afwijking ter wereld naast de talloze muis inteeltlijnen en combinaties van deze inteeltlijnen. Ook de data opslag van genetische kennis van de muis is voornamelijk in handen van het Jackson lab.

Toendertijd, het was eind jaren 70, was er elk week “mouse clinic”. De onderzoekers werden uitgenodigd om te komen kijken naar wat de diervverzorgers bij het op een leeftijd van drie weken scheiden van de jonge muizen van hun moeders, er op basis van een eigenaardig fenotype uit hadden gepikt. Ik heb wel eens gedacht dat het gehalte aan radioactief radon gas in het drinkwater ter plekke de reden was van deze jonge muizenkliniek. Of het ook te maken kan hebben met het feit dat zo goed als alle muizen behoorden tot één van de diverse inteeltlijnen waar de muis onderzoekers zich in meerderheid van bedienen weten we niet. In ieder geval wordt de keuze voor foklijnen bij de muis sterk beïnvloed door statistici die meer houden van genetische standaardisatie dan van genetische variatie.

“Mc Kusick’s list” heet nu OMIM, Online Mendelian Inheritance in Man, An Online Catalog of Human Genes and Genetic Disorders. Het heeft rond de 25.000 gecatalogiseerde “entrees” of nummers, waaruit af te leiden is dat a) de genetisch medische literatuur, die zich bezig houdt met afwijkingen aan een enkel gen groot is, en b) dat vele bijdragen moeten gaan om hetzelfde gen van de collectie: het aantal genen dat in deze database door mutatie een ziektebeeld oproept overschrijdt zoals hiervoor vermeld nu de 4000 (op 31-07-2022 4668, zie ook H18.1). De verwachting is dat doordat de analyse van de basensamenstelling van het humane genoom nu zo goed als compleet is, dit aantal nog verder zal toenemen.

Een voorbeeld: “entree 176670” is Hutchinson-Gilford progeria syndroom (HGPS), een dramatische verouderingsziekte die heel zeldzaam is en in veruit de meeste gevallen spontaan optreedt. Men zegt dan dat de ziekte dominant overerft en dat de mutatie is ontstaan in de kiembaan van of de vader of de moeder. Het komt in 1 op de 4-8 miljoen geboorten voor. Heel zeldzaam dus maar wel toevallig aanwezig in de peuterzaal van een van onze kinderen. Kinderen met deze vorm van progeria werden meestal niet ouder dan een jaar of 12, maar daar komt nu door het medisch bestrijden van de symptomen langzaam verandering in. Een leeftijd van 20 jaar is geen uitzondering meer. De kinderen zijn geestelijk normaal en bijzonder, maar de aftakeling begint eigenlijk al in het eerste levensjaar. Lotgenoten zijn verspreid over de hele wereld. Eerst waren de bijeenkomsten waar families en kinderen elkaar ontmoeten alleen in de USA, maar sinds 1997 is er ook een Europese progeria family circle die probeert jaarlijks

de Europese kinderen en hun families bij elkaar te krijgen. Bij alle slechte vooruitzichten en dagelijkse problemen ben je op zo'n samenkomst in verschijnen en activiteiten getuige van een sprookjeswereld, zeker wanneer het plaats vindt op de Efteling. Progeria kinderen zijn vertederend en het vinden van het gen in 2003 heeft de hoop voor een behandeling doen opleven. Dit gen dat verantwoordelijk is voor de voortijdige veroudering is een publiciteitstrekker, en intuïtief gelinkt aan een langer leven. Twee groepen kwamen ongeveer gelijktijdig met de uitkomst naar buiten. Er was een aanwijzing dat het gen voor deze vorm van progeria op chromosoom 1 ligt (fig 12). Via de bekende moeizame procedures uit die dagen, waarbij polymorfismen voor microsatellieten (H2.3.2, tabel 2) een grote rol speelden, kwam een Amerikaanse groep tot de conclusie dat het hier om een gen uit de familie van de lamines ging en wel om het gen coderend voor lamine A. Het resultaat werd gepubliceerd in Nature. De Europese route naar de oplossing van deze genetische puzzel verliep heel anders. In Marseille viel het een slimme arts op dat de kaaklijn van de progeria kinderen leek op iets wat hij kende van de zogenaamde laminopathieën. Er zijn drie soorten van lamine genen en het gendefect kan minder erg zijn, zodat er wel een fenotype is maar geen opvallend vroeg verouderingspatroon. De onderzoekers zijn toen gelijk bij de progeria kinderen gaan zoeken naar mutaties in de lamine genen en kwamen tot eenzelfde resultaat als de Amerikanen. Publicatie volgde in hetzelfde jaar in Science, in de wetenschappelijke wereld even hoogstaand geacht als Nature. Dit is toch wel een mooi geval van "serendipity", dat in het Nederlands onvertaalbare woord (herkennen wanneer je het ontmoet). Het eiwit lamine A speelt een rol bij het contact tussen het **chromatine** en de kernmembraan (fig 2, 7) en dat contact is buitengewoon belangrijk voor de stabiliteit van het DNA. Het afwijkende eiwit progerin, dat het gevolg is van de meest voorkomende mutatie ontregelt de cel op allerlei manieren waarvan DNA herstel een belangrijk aspect is. Er zijn nu muizenmodellen om gentherapie voor de meest aangedane weefsels op te testen, en begin 2021 was er een doorbraak die een eerste stap kan betekenen op weg naar therapie.

Momenteel worden de bevindingen van de grootschalige genomonderzoeken die ons een inzicht geven in de variatie van DNA (H3) samengevoegd met informatie uit alle andere bronnen, waarvan er twee bij respectievelijk muis en mens zojuist voorbij kwamen.

Ik kom hier nog even terug op de begrippen haplo-insufficiëntie en "genetic redundancy". Een maat voor de onmisbaarheid van een gen is of er bij verlies van functie van een enkel **allel** haplo-insufficiëntie optreedt zich uitend in een fenotype. In 2018 is Venter co-auteur van een veel geciteerd artikel waarin de vraag wordt gesteld van hoeveel van onze 20.000 genen we een

van de twee kopieën echt niet kunnen missen. Die vraag is niet zomaar te beantwoorden, en zoals net bleek ook nog niet bij de muis als het genetische model voor zoogdieren. Het aantal genen met deze gevoeligheid wordt geschat op 3000. De aanwezigheid van een defecte genkopie wordt aangeduid met het begrip “loss of function”. Daar wordt in de humane genetica en ook bij landbouwhuisdieren natuurlijk naar gezocht. Het getal 100 lijkt een schatting te zijn van het aantal “loss of function” varianten per individu.

Het aantal daarvan dat in homozygoot recessieve toestand leidt tot het niet doorgeven ervan (door sterfte en onvruchtbaarheid) wordt geschat op 0,6. Een maat voor de misbaarheid (“genetic redundancy”) is het aanwezig zijn van een of twee defecte genkopieën zonder een fenotype. Een andere aanwijzing voor een minder belang is de afwezigheid van selectie, te zien aan meer allelen met mutaties voor dat bepaalde gen en genetische variatie er omheen in de populatie. Als die hoger is, is de selectiedruk minder. Van deze genen heeft 50% van de mensen er minstens één die homozygoot is voor “loss of function”. Voor genen met een veel hogere selectiedruk is dat rond de 5%. Het aantal genen dat tolerant is voor homozygote inactivatie door mutatie wordt geschat op iets als 1800.

De relaties tussen het genoom en het fenotype kun je zien als het oplossen van een oneindig gecompliceerde puzzel, waarvan het echte aantal stukjes en hun interacties niet in beeld is. Maar werkende weg en sterk gestimuleerd door de technologie om de DNA basenvolgorde te bepalen en daaraan gekoppeld, de manieren om structurele varianten beter in beeld te krijgen, zal het inzicht gestaag toenemen.

NB: een al sinds de opkomst van de DNA technologie in de jaren 80 gebruikte benadering (die steeds fijnmaziger is geworden), om de relatie tussen het genotype en het fenotype vast te stellen komt in hoofdstuk 6 kort onder de afkorting **GWAS** (“**genome wide association study**”) aan bod.

De meiotische delingen

De verandering van een **diploïd** naar een **haploïd** stadium en vervolgens weer terug naar het diploïde stadium, is onlosmakelijk verbonden met het begrip generatiewisseling. De tijdsduur van het diploïde versus het haploïde stadium blijkt extreem te kunnen verschillen tussen de vele organismen die zich seksueel voortplanten. Wanneer je de term generatiewisseling in bijvoorbeeld Wikipedia opzoekt, kom je in een ingewikkelde wereld van classificaties terecht. Mossen zijn een voorbeeld van een levensvorm die voornamelijk haploïd door het leven gaat.

Voor planten, ongewervelde en gewervelde dieren is de diploïde fase in het leven verreweg het langst (een beetje een open deur). Om van het diploïde in het haploïde stadium te komen maken de cellen in de **kiembaan** de meiotische- of reductiedelingen door (de **meiose**, fig 13). Het hele proces duurt vergeleken met een **mitotische** deling lang, en kan in een bepaald stadium nog weer worden “bevroren” om aan andere processen voorrang te geven, zoals tijdens de meiotische profase van de **oogenese**. Voor de meiotische profase van de **spermatogenese** geldt dat ook, zij het minder extreem. In dit hoofdstuk gaat het echter om de basisprincipes die voor beide geslachten gelijk zijn.

5.1 De paring van de homologe chromosomen

Wanneer de **homologen** op een ordelijke manier afscheid van elkaar moeten nemen is enige voorbereiding op zijn plaats. Dat gebeurt allemaal in de profase (fig 14) van de eerste meiotische deling, die ook daarom behoorlijk lang duurt. Cytologen en cytogenetici hebben de profase van de meiose in stadia verdeeld, gebaseerd op het gedrag van de chromosomen. Tijdens de colleges erfelijkheidsleer was het zo'n leerrijtje, dat snel weer vergeten werd (fig 14). Het proces

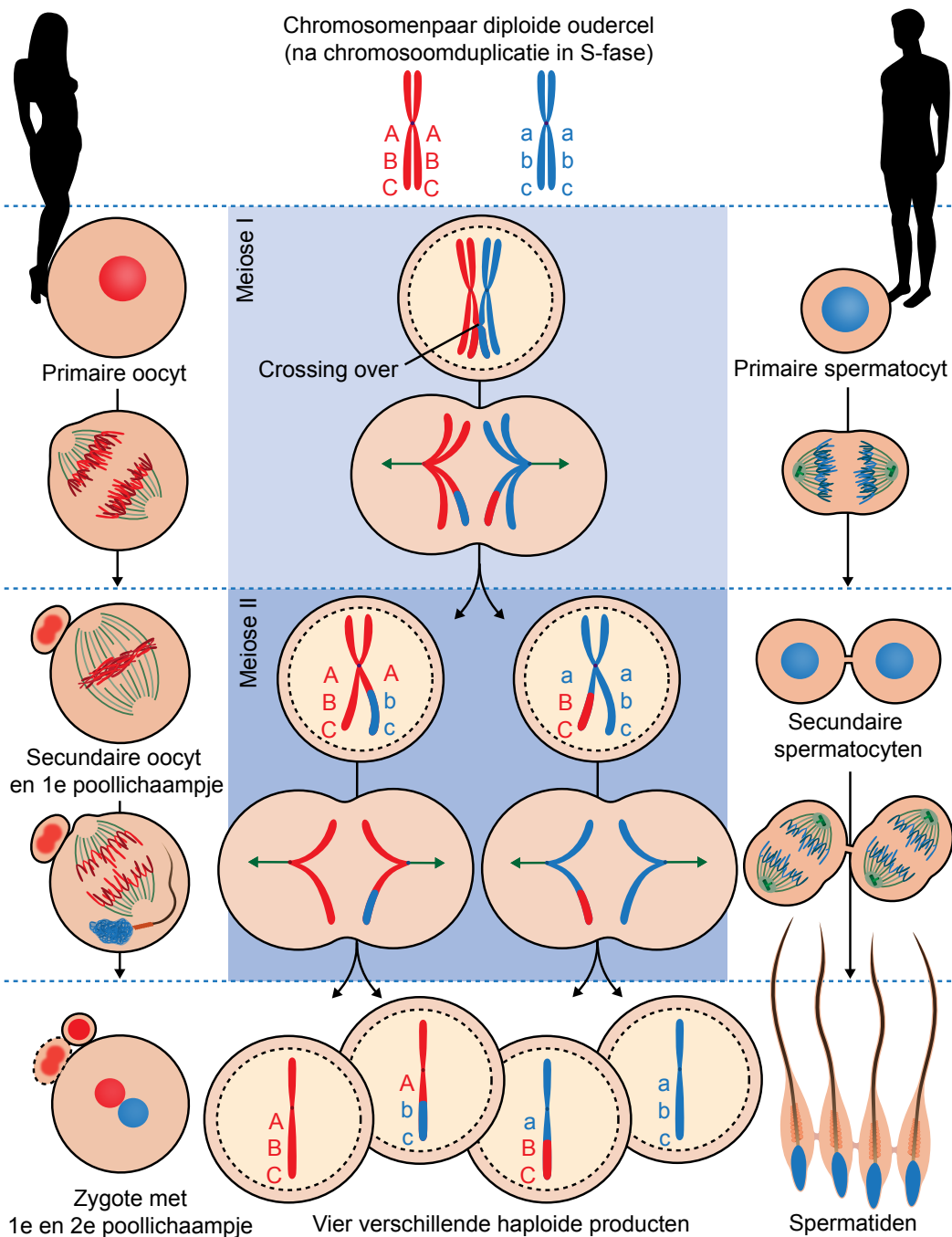


FIG 13

Samenvatting van de **meiotische** chromosoomparing, die **crossing over** mogelijk maakt en de twee meiotische delingen voor een enkele **bivalent**. De meiotische stadia van **oogenese** en **spermatogenese** worden oocyt en spermatocyt genoemd, met het voorvoegsel primair voor de eerste meiotische deling en secundair voor de tweede meiotische deling. Voor de eenvoud van het plaatje wordt er maar een enkele cross over tussen de **loci** A/a en B/b getoond (met de **allelen** A,a; B,b). Dat leidt tot **recombinatie** binnen het chromosoom, weergegeven m.b.v. een kleurverschil tussen de **homologen** (rood voor maternaal, blauw voor paternaal). De eerste en tweede meiotische deling bevinden zich aan het begin van de anafase (zie fig 3). De figuur is ook een illustratie van de eerste wet van Mendel. Omdat de oriëntatie in de **spoelfiguur** van een bivalent in de eerste meiotische metafase en van een chromosoom in de tweede meiotische metafase willekeurig is, komen de 4 meiotische producten voor iedere bivalent ook vanuit de eicel met een gelijke kans in de **zygote** terecht (de tweede meiotische deling wordt afgemaakt nadat de secundaire oocyt is geactiveerd door de zaadcel en er een zygote is gevormd, zie H13.5.1 en fig 42). De mannelijke **kiembaan** is weergegeven tot het stadium van de elongerende spermatiden (fig 31), die ieder met een gelijke kans uit één spermatocyt ontstaan. Die kansgelijkheid blijft tot de bevruchting intact (maar zie H12.3).

begint met het korter worden van de chromosomen die, omdat er chromosoomverdubbeling heeft plaatsgevonden, net als bij de mitose uit 2 **chromatiden** bestaan. Het vinden van de juiste partner wordt in de literatuur aangeduid met de term “homology search”. Dit is een van de meest intrigerende en volledig wonderbaarlijke processen die zich in de kiembaan afspelen. De kernen zijn dan merkwaardig klein. Je zou zeggen dat een beetje ruimte de zoektocht vergemakkelijkt, maar dat is kennelijk niet zo. Ergens aan het begin van die tocht zoeken de chromosoom-einden, de **telomeren** (H2.3.3) elkaar op. Om verder de drukte nog wat te verhogen hebben ze de neiging zich allemaal in een sector van de kernwand op te hopen, net alsof je de eindjes van een kluwen met touwtjes van verschillende lengte bij elkaar pakt. Dit zijn ontdekkingen uit het begin van de 90-er jaren, toen antilichamen tegen eiwitten die betrokken zijn bij het reguleren van de telomeren beschikbaar kwamen en gebruikt konden worden om het begin van de paring van de homologe chromosomen microscopisch zichtbaar te maken. Nu is de **DNA** code voor telomeren

Profase I Meiose

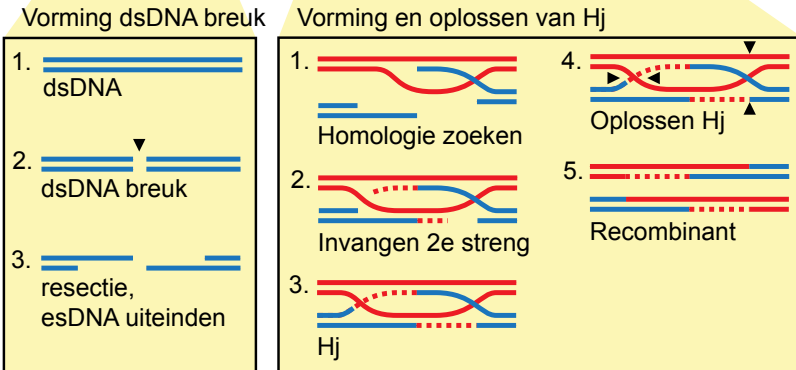
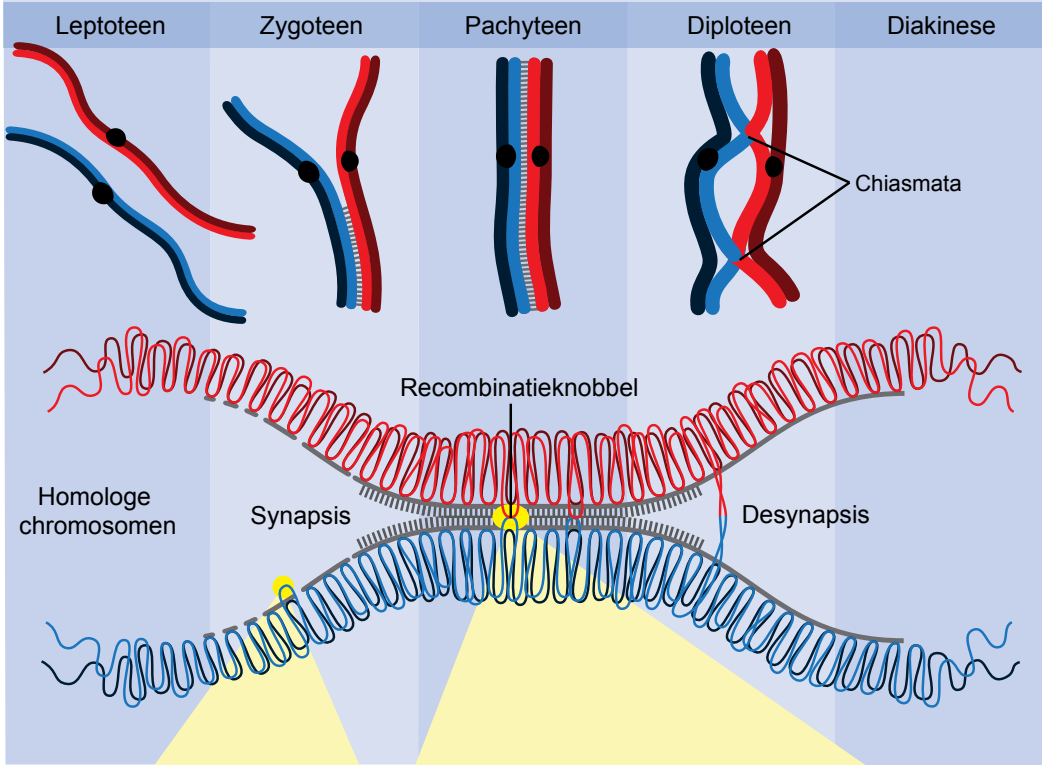


FIG 14

Gecomprimeerde weergave van de klassieke profase stadia van de eerste **meiotische** deling. De twee **chromatiden** van de ouderlijke **chromosomen** zijn met een subtiel kleurverschil weergegeven. De chromosoomparing (synapsis) wordt vormgegeven door het **synaptonemaal complex**. De **recombinatieknobbels** kunnen met een antilichaam tegen het mismatch repair eiwit MLH1/Mlh1 (resp. mens muis) aangekleurd worden, wat een manier is om de verdeling van recombinatiegebeurtenissen over de verschillende **bivalenten** vast te stellen (zie fig 15). De afspraak is dat bij de mens **gen** en eiwit in hoofdletters worden geschreven, waarbij wanneer men het gen bedoelt het cursief geschreven staat (en dat geldt ook voor de muis). De gele boxen bieden een eenvoudige weergave van het geaccepteerde moleculaire **crossing over** model waarbij de zogenaamde “Holiday junctions” het kernbegrip zijn. Essentieel is het hengelen naar **homologie** van het enkelstrengs (es) **DNA** filament in het rechter paneel. Met pijlpunten wordt aangegeven waar het DNA geknipt moet worden en de keten hersteld moet worden om de twee dubbelstrengs (ds) DNA moleculen weer door te laten lopen. DNA synthese is een integraal onderdeel van crossing over. Door spiraliseren van de bivalenten wordt in het diploteen crossing over zichtbaar als een **chiasma**. Op de weg naar het eindstadium van de spiraliseren, de metafase (fig 3, 30) onderscheidt men nog de diakinese.

voor elk chromosoomende hetzelfde (H2.3.3), dus daar vind je het homologe chromosoom niet mee. En dat klopt weer met het inzicht uit 2014, dat voordat die beweging van de telomeren plaats vindt, de homologen al aan elkaar snuffelen en dat het **cohesine complex** (fig 6, H2.2.2, H2.3.1, belangrijk voor de structuur van het chromosoom), daar een rol bij speelt.

In de volgende fase van dit raadselachtige proces worden er een groot aantal dubbelstrengs DNA breuken gemaakt die verdeeld zijn over het hele **genoom** maar niet zomaar willekeurig. Om te begrijpen hoe die breuken gebruikt worden om de contacten met het homologe chromosoom verder aan te halen is figuur 14 een aanrader. Met wat hulp en op daartoe voorbereide plekken zorgt het enzym Spo11 in samenwerking met een ander eiwit voor een knip in de dubbelstrengs helix. Je zou dan denken dat die breuken gerepareerd worden met behulp van de

homologe DNA basenvolgorde van het intacte zuster chromatide, dat in de buurt is, maar die weg wordt echter geblokkeerd.

Voordat de breuk kan worden aangebracht moet het chromatine lokaal in een geschikte open toestand worden gevouwen. Daar zijn enzymen bij betrokken die Histon 3 methyleren op de Lysine (K) op onder meer positie 4 (tabel 1, fig 8). Toen Japanse onderzoekers in 2005 een steriele muis publiceerden met een **gen knockout** voor het meiose-specifieke eiwit met deze enzymatische activiteit, was dat een lastige vinding om op college uit te leggen. Het verband tussen een DNA knippend enzym en een enzym dat een **histon** aanpast (tabel 1, fig 8), was immers nog nooit gelegd.

Het werd allemaal wat helderder toen bekend werd dat dit eiwit niet alleen de gewenste H3K3 methyltransferase activiteit bezit, maar ook een domein, aangeduid met het woord “zinc finger” dat kan binden aan stukjes DNA met een beperkte variatie in de basenvolgorde. Met andere woorden, “zinc fingers” binden aan een bepaald soort DNA motieven. Dit meiose actieve histon methyltransferase met deze extra zoekfunctie voor DNA motieven is nu bekend als Prdm9 en is onderdeel van de theorie van soortvorming geworden (het is een eiwit dat snel evolueert, zoals meer eiwitten die betrokken zijn bij de voortplanting). Nu zou je denken dat een enzym dat zo centraal staat in de vorming van de **gameten** niet gemist kan worden. Het is evolutionair geconserveerd en lijkt voor *Homo sapiens* dus net zo belangrijk als voor *Mus musculus*, het ons zo vertrouwde knaagdier. Dat is ook zo maar soms stuit je toch op raadsels.

In 2016 werd een genetische studie van 3222 volwassenen, ontstaan uit neef nicht huwelijken, gepubliceerd in Science. De onderzoekers hadden zich gericht op in het Verenigd Koninkrijk wonende Pakistaanse families met een moslim achtergrond. De reden is natuurlijk dat binnen deze gemeenschap vaak huwelijken worden aangegaan binnen de familie en dat de hieruit geboren kinderen hierdoor een deel van hun genoom gemeen hebben. Zit er op die segmenten nu toevallig een genmutatie die verhindert dat het eiwit werkt, dan kan het defect van beide ouders komen (+/- x +/-, een kwart volgens de eerste wet van Mendel). Zo kun je vaststellen of het eiwit gemist kan worden of niet. Tot stomme verbazing van de onderzoekers vonden ze een vrouw die **homozygoot** was voor een knockout mutatie van Prdm9 en toch was deze vrouw vruchtbaar.

Hond en vogel doen het overigens ook zonder dit enzym, zij hebben dus een andere oplossing gevonden voor het bepalen van de DNA breukplaatsen. De natuur is blijkaar ook voor zoiets essentieels als een kernproces in de meiose nog steeds onvoorspelbaar.

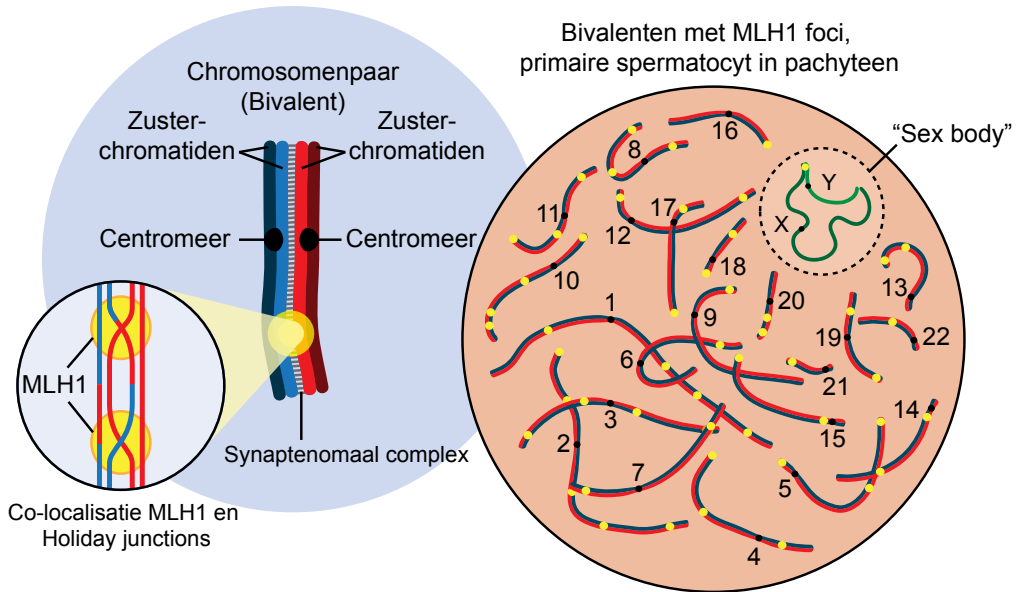


FIG 15

Impressie van het bepalen van **crossing over** aantallen en posities per **bivalent** in het pachyteen (fig 14) van de eerste **meiotische** deling in primaire spermatocyten (fig 13) van de mens. De crossing over aantallen voorspellen het aantal **chiasmata** die zichtbaar worden wanneer de bivalenten spiraliseren (fig 14). De posities van crossing over zijn zichtbaar gemaakt met behulp van **immunofluorescentie** met als indicator eiwit MLH1, hier in geel. De herkenning van de bivalenten is gebaseerd op **FISH**. Het aantal MLH1 signalen per meiotische cel zit rond de 50-53 voor de mannelijke meiose. In de vrouwelijke meiose is het aantal hoger en varieert het meer (voor de meeste primaire oocyten (fig 13) zit het aantal tussen de 56 en 86).

Dubbelstrengs DNA breuken worden snel door het chromatine surveillance team gespot (H2.2.1, fig 4) en daaropvolgend wordt het chromatine rond de breuk in gereedheid gebracht voor de reparatie. Een belangrijk onderdeel van het voorbereidende werk is af te lezen aan een lid van de Histon2A familie (tabel 1) dat H2AX wordt genoemd. H2AX is belangrijk in de kiembaan en evolutionair ouder dan de H2A van de tekstboeken (H2.3.1). We komen zo terug op H2AX, maar

om het belang ervan te appreciëren eerst nog even dit. Een klasse eiwitten die heel belangrijk is voor het reguleren van allerlei processen in de cel wordt aangeduid met de verzamelnaam **proteïne kinasen**. Dit zijn eiwitten die als een **post translationele modificatie (PTM)** fosfaatgroepen aanbrengen op een verzameling van doeleiwitten, die zo van functie veranderen en dan bijvoorbeeld actief worden (reguleren door te fosforyleren). Twee van deze kinasen zijn heel belangrijk voor het detecteren van DNA schade. De eerste heeft de naam Ataxia Telangiectasia Mutated, kortweg *ATM*. Dit gen is verantwoordelijk voor een recessief overervende aandoening A-T, Ataxia Telangiectasia (OMIM 607585, H4.2). Patiënten met een mutatie in het *ATM* gen ontwikkelen een hele serie van gebreken en kenmerkend is de hoge gevoeligheid voor **ioniserende straling** (waar je in celkweken van de heterozygoten een reflectie van terug vindt). Het gen blijkt op allerlei manieren uit de bocht te kunnen vliegen en vele types mutaties zijn er in teruggevonden. Onder de Joodse bevolking komt een bepaalde mutatie voor, die lang geleden moet zijn ontstaan en te herleiden is tot Marokko en Tunesië. Muizen die homozygoot zijn voor het “uitgeknoekte” *ATM* gen zijn steriel. In 1996 verscheen dit bericht van twee concurrerende onderzoeksgroepen in de topliteratuur. Een ander proteïne kinase gen dat niet gemist kan worden bij het gezond houden van het DNA heeft de afkorting *ATR* gekregen (van “Ataxia Telangiectasia en rad3 gerelateerd”). De eerste knockout muizen werden in 2000 gepubliceerd: de homozygote -/- embryo's stierven zo rond de tijd van innestelen in de baarmoederwand af, bij een muis wanneer ze een dag of 5 oud zijn. Ook dit gen is te vinden in de OMIM database, onder nummer 601215. *ATM* is vooral betrokken bij het behandelen van dubbelstrengs DNA breuken en *ATR* bij enkelstrengs DNA beuken (fig 33). *ATM* en *ATR* fosforyleren als een soort van superdirigent allerlei eiwitten waaronder ook H2AX. Dat doet *ATM* met zo veel ijver dat een chromatine gebied van ongeveer 2 mb aan DNA op deze manier wordt bewerkt. En dat is met behulp van een goed antilichaam tegen gammaH2AX (H2AX met een fosfaatgroep op die bepaalde plek) aan te kleuren en door de **fluorescentie** microscoop te zien. In de verdere voorbereiding op de homologe chromosoomparing zie je op deze manier de dubbelstrengs DNA breuken al ontstaan, maar het aantal ervan bepalen lukt niet. Figuur 14 geeft een indruk van hoe er vervolgens vanuit een dubbelstrengs breuk gezocht kan worden naar een identiek stukje DNA op het homologe chromosoom, dat als matrijs dient voor de reparatie van de breuk.

Daarbij vervult het eiwit Rad51 een sleutelrol en het markeert tegelijkertijd de stukjes enkelstrengs DNA die bij het “hengelen naar homologie op het niveau van de base” worden gebruikt. Geen wonder dat het tellen van de hierbij betrokken breuken wel lukt met behulp van een antilichaam tegen Rad 51. Aan het begin van de paring zijn het er bij de mannelijke muis zo rond

de 250. Maar ook de knipplaatsen zelf zijn boven water gekomen. In een prachtige publicatie van 2016 legt Scott Keeney van het Memorial Sloan Kettering Cancer center in New York uit hoe ze dat varkentje hebben gewassen. Wanneer Spo11 knipt en voordat het afscheid neemt van het DNA (fig 14), neemt het een stukje DNA van de plaats van het misdrijf mee, stukjes van rond de 20 tot nabij de 40 basen lang. Het determineren m.b.v sequencen van die stukjes was voldoende om in een kleine 70% van de gevallen de knipplek in het genoom op te sporen. Waar dat niet lukte werd dat veroorzaakt door de grote hoeveelheid “repeats” (H2.3.3, tabel 2) die er in het genoom zitten. De nu gelokaliseerde breuken zaten voor 60% in, of dicht bij een zogenaamde “hotspot”, de plekken waar de kans op een **cross over** (fig 14) sterk vergroot is. Zestig tot 70% van alle cross overs vindt in zo'n “hotspot” van ongeveer 2 kb plaats. En dit klopt met het DNA motief van de 36 bp “zinc finger” bindingsplek van Prdm9. Nog een demonstratie van wat er momenteel moleculair biologisch technisch mogelijk is: meestal knipt Spo11 in stukjes “linker DNA” (fig 7) (dus tussen de **nucleosomen**, die waarschijnlijk even zijn verschoven door een “chromatin remodelling complex” H2.3.2). Op theoretische gronden leek dat al handiger, maar nu is vastgesteld dat het ook zo gebeurt.

Het proces van uitwisseling van genetische informatie tussen de homologe chromosomen (*i.e.* **crossing over**) wordt parallel begeleid door de vorming van eiwitassen langs de chromosomen. Ze kunnen wel wat steun gebruiken, en die is er in de vorm van een eiwitstructuur met de onuitsprekelijke naam **synaptonemaal complex**. Het synaptonemaal complex ziet er onder de elektronenmicroscop uit als een Zwitserse tandradbaan waarbij de rails de eiwitstructuren weergeven, die de homologe chromosomen stevigheid verlenen, en het getande middenstuk voorstelt hoe die twee eiwitassen elkaar een hand geven wanneer ze elkaar ontmoeten (fig 14). Het onderzoek aan de meiose kwam echt in een versnelling toen er genen geïsoleerd werden die coderen voor eiwitten van het synaptonemaal complex. In de jaren 90 gebeurde dit bijvoorbeeld door Christa Heyting op de afdeling Erfelijkheidsleer van wat nu de WUR is. De daarbij horende antilichamen waren internationaal zeer gewild en droegen zo ook bij aan de reputatie van het laboratorium. Een regel in het onderzoek luidt, dat wanneer er gereedschap zoals deze antilichamen wordt gepubliceerd, het wereldwijd voor de collega's toegankelijk is. Al snel waren vele van deze op het onderzoeken van de meiose gerichte antilichamen ook commercieel verkrijgbaar.

Wanneer de homologe chromosomen uiteindelijk helemaal aan elkaar geritst zijn praten we over **bivalenten**. Het is natuurlijk logisch dat het aantal bivalenten van een soort gelijk is aan het

haploïde chromosoomaantal: 20 voor de muis, 19 voor het gedomesticeerde varken, 30 voor het rund (en zebu en yak), 23 voor de mens en 24 voor de chimpansee, de gorilla en de orang oetan.

De hamvraag is natuurlijk wat de uitkomst is van het repareren van de dubbelstrengs DNA breuken tijdens het pachyteen stadium van de meiose (fig 14). Duidelijk is dat ze lang niet allemaal worden ingezet voor DNA uitwisseling tussen de homologe chromosomen. Bij dit proces dat bekend staat onder de term *crossing over*, wordt een stuk met **allel A** van het ene homologe (van de moeder) gekoppeld aan een stuk met **allel b** van het andere homologe (van de vader) en vice versa een stuk met **allel B** (van de moeder) aan een stuk met **allel a** (van de vader) (fig 13, 14). *Crossing over*, een moleculair proces, leidt uiteindelijk tot genetische **recombinatie** binnen het chromosoom, de uitwisseling van lineaire DNA informatie (**homologe recombinatie**).

Bij de meiose van de vadermuis worden er maar tussen de 20 en maximaal iets van 30 dubbelstrengs DNA breuken gebruikt voor *crossing over*. Bij de moedermuis zijn het er zo'n 10% meer, maar veel minder dan de schatting van 250 breuken, die de chromosoomparing vervolmaken. Bij de mens is het verschil tussen de seksen groter (H11.1). Belangrijk blijft dat er minimaal één *cross over* per bivalent nodig is om tijdens de eerste meiotische deling het chromosoomaantal te halveren (fig 13).

Nog even terug naar de "homology search", daar waar *crossing over* in beeld komt. Het met eiwitten, waaronder Rad51 beplakte enkelstrengs DNA filament (fig 14) zoekt dus naar een complementaire DNA volgorde op het homologe chromosoom. Als eerste gebeurt dat bij de chromosoom-einden. Dit zal wel het logische gevolg zijn van het begin van de chromosoomparing, het proces waarbij alle chromosoom-einden terecht komen in een deelgebied van de kernwand. De elkaar ontmoetende homologe DNA fragmenten hebben in een populatie met genetische variatie niet noodzakelijkerwijs exact dezelfde DNA basenvolgorde. Wanneer er op een basepositie in het zoekende enkelstrengs DNA segment (denk aan een lengte van 900 basen) een verschil zit, bijvoorbeeld een C ontmoet een T, spreekt men van een **mismatch**. Het reparatie proces dat daarop volgt staat bekend onder de term **mismatch repair** (H2.2.2, fig 33). Deze vorm van DNA herstel vertraagt de progressie van de meiose niet maar is er een normaal onderdeel van. Hoe is het belang van **mismatch repair** voor de meiose ontdekt?

In de eerste helft van de jaren 90 was de technologie om via embryonale stamcellen een gen uit te knocken (box 2, 3) in alle vooraanstaande muizenlabs operabel. In de USA waren labs die veel van de **gametogenese** wisten, met speciale aandacht voor de meiose, dun gezaaid. In andere labs floreerde het moleculaire onderzoek naar DNA herstel mechanismen, zo ook voor

mismatch repair. Wanneer er een functioneel gen werd geïsoleerd, hoorde het produceren van een knockout muizenstam erbij.

In Wageningen waren we in diezelfde tijd goed op weg met het ontwikkelen van een onderzoeksprotocol om kernen van cellen als een soort pannenkoekbeslag in een dun laagje uit te laten zakken op glas of ultradun “plastic” (voor de elektronenmicroscopie). Zulke protocollen bestonden al heel lang, maar waren wat onbetrouwbaar en de resultaten te variabel. Voor zowel spermatogenese als oogenese werkte de verbeterde techniek prima en is nu de standaard. In diezelfde periode kwam Terry Ashley van de afdeling humane genetica van Yale University in New Haven, Connecticut, USA, bij ons op bezoek. Ik kende Terry als een meioseonderzoeker bij vooral de muis uit haar jaren in Tennessee.

In Wageningen is het zolang ik weet normaal om in het buitenland op stage te gaan. En zo belandde afstudeervakstudent Annemieke Plug op Yale, net in de tijd dat de knockout muizen voor genen betrokken bij mismatch repair beschikbaar kwamen. Ze nam de verbeterde spreidingstechniek, waarvan AIO Antoine Peters de architect was, natuurlijk mee. De eerste knockout liet inderdaad zien dat mismatch repair betrokken was bij de “homology search”. Dat leidde meteen tot een publicatie in het toptijdschrift *Cell* met een plaatje, gemaakt met onze techniek op het omslag. Op dat plaatje kan je zien dat het met de meiotische chromosoomparing niet opschiet wanneer dit bepaalde mismatch repair eiwit afwezig is.

Succes trekt altijd belangstelling aan en zo werd het lab op de afdeling “human genetics” van Yale bezocht door een oudere collega met een goede reputatie. Ondertussen waren we in Wageningen begonnen met het als “short communication” voor een wetenschappelijk tijdschrift opschrijven van onze spreidtechniek, als bijdrage aan het proefschrift van Antoine Peters. Groot was dan ook de verbazing toen ik een voor publicatie ingestuurd manuscript ter beoordeling kreeg opgestuurd (“peer review”), dat als enige mededeling de standaardisering van het spreiden van celkernen uit de kiembaan voor microscopisch onderzoek had.

Hoofdauteur de bezoeker van Yale. Als nu niet dat manuscript naar Wageningen was gestuurd hadden wij met vrij grote kans die nu dik 600 (oktober 2021) citaties gemist, veel voor zo’n korte mededeling met voornamelijk een toepassingsgebied in het meiose onderzoek. Citeren is een sport apart, maar een vorm van eerlijkheid (H3.4), het aanhalen van de oorspronkelijke bron, wordt wel moeilijker nu er zo veel, misschien te veel geschreven wordt.

Ik weet niet of er onderzoek naar is gedaan, maar Amerikanen citeren Europeanen minder dan zou kunnen, en mogelijk omgekeerd ook.

Wanneer schrijfruimte beperkt is, kun je als in Amerika werkend onderzoeker beter je Amerikaanse collega noemen, want er is een kans, dat die je volgende subsidieaanvraag beoordeelt, of je volgende artikel in het zo geprezen “peer review” systeem onder ogen krijgt. Dit is een bijzonder aspect van het wetenschapsbedrijf, dat je je vindingen als eerste laat zien aan de collega’s die door het financieringssysteem ook weer concurrenten kunnen zijn. Hoe het anders zou moeten is ook niet duidelijk. De andere kant van “het systeem” (en hopelijk belangrijker) is dat je samen aan het inzicht van meestal verbazingwekkend ingewikkelde kwesties werkt, wat kan leiden tot enerverende contacten en grote collegialiteit.

Aan een nog sterker bewijs dat mismatch repair een centrale rol speelt bij het elkaar vinden van de homologe chromosomen, is bijgedragen vanuit het NKI (Nederlands Kanker Instituut). Omdat bij een aantal vormen van kanker afwijkingen van het mismatch repair systeem een rol spelen, werkte de groep van Hein te Riele aan dit onderwerp. In de eiwitfamilie die de “mismatch” opspoorde zitten twee leden die alleen in de kiembaan te vinden zijn (voor de liefhebbers, Msh4 en Msh5). Na die publicatie uit Yale lag het behoorlijk voor de hand om knockout muizen te maken waarin de genen voor deze eiwitten niet meer functioneel zijn. In een vliegtuig naar Athene, op weg naar een vanuit de EU geïnitieerde wetenschappelijke bijeenkomst over de invloed van mutagene stoffen in het milieu, bepaalde het lot dat ik naast Hein zat, die ik daarvoor nauwelijks kende. Je weet dat beider werkgebied een raakvlak heeft en er worden wat oppervlakkigheden uitgewisseld. Nog in Griekenland vertelde hij me dat ze in Amsterdam een homozygote (-/-) knockout voor één van die twee meiose specifieke mismatch repair **genen** (*Msh5*) hebben en dat deze muizen, zowel de mannetjes als de vrouwtjes, steriel zijn. We kwamen er snel uit en niet veel later gingen we naar het NKI om spreidpreparaten te maken van de meiotische cellen van -/- muizen, bij de mannetjes uit de testis en bij de vrouwtjes uit de jonge foeten in de baarmoeder (H11.1, fig 14). Terug in Wageningen keken we ernaar door de fluorescentie-microscopie en door de elektronenmicroscopie. Ook werden er nog wat testikels in fixatievloeistof gestopt om af te leveren in Utrecht op het lab van Dick de Rooij, de internationaal beroemde spermatogenese goeroe (H12). De resultaten waren nog mooier dan gerapporteerd in het 1995 Cell artikel vanuit Yale. Helemaal volgens het idee dat dit eiwit helpt om de “mismatch” te adresseren die ontstaat, doordat een sliert van rond de 1 kb enkelstrengs DNA op zoek gaat naar de plek met een zo goed als identieke basenvolgorde (fig 14), waren de resultaten veel scherper. Alle meiotische cellen, zowel in de ovaria van de foeten als in de testikels van de geslachtsrijpe mannetjes stierven na een paar dagen af, omdat ze het dichtritsen als onderdeel van de vorming van de synaptonemale complexen (fig 14) niet voor elkaar kregen. Een deel van de chromoso-

men deed het zelfs met twee partners, dus ook met een ander chromosoom (in de literatuur heet dit verschijnsel “partner exchange”).

De dubbelstrengs DNA breuken die bij het uitblijven van de (homologe) chromosoomparing niet verder worden verwerkt activeren een checkpoint (H12.5.3, fig 4), en daarna worden de primaire oocyten en spermatocyten (fig 13) opgeruimd.

In New York werkte er ook een groep aan mismatch repair bij muizen. Maar toen in het programma van de Gordon conferentie over de meiose, die zomer van 1998, er voor de avond een voordracht stond over een muis waarin “ons” mismatch repair gen was uitgeknoekt, was het toch even slikken. Wat nu? Als er zoiets gebeurt is opletten niet moeilijk meer.

Na haar praatje Paula Cohen aangesproken en verteld hoever wij waren met dit meiose specifieke mismatch repair gen. Ze schrok natuurlijk ook, waren er al bang voor. Op het ene aspect waren zij verder, op andere aspecten wij. Ik nam contact op met Amsterdam en zij met New York.

Wat er in zo'n geval nog wel eens wil gebeuren, is dat er wordt afgesproken om te proberen in hetzelfde tijdschrift “back to back” te publiceren, dat wil zeggen dat beide publicaties in samenhang worden aangeboden.

Paula wilde dat aan haar baas voorleggen en in Amsterdam zagen ze het zitten. Zo zou het echter niet lopen, de competitie speelde een te grote rol. Omdat er indicaties waren dat zij het bij Nature Genetics gingen proberen, opperde men in Amsterdam, dat dit werk goed genoeg was voor het toptijdschrift Cell, het was tenslotte een duidelijke stap vooruit vergeleken met de eerdere Yale meiose mismatch repair publicatie van 1995. Er kwam snel een briefje terug, prachtig werk natuurlijk maar dit onderwerp hadden ze al gehad, verslagen door je eigen tovenaarsleerling. Dat is nou het mooie van het NKI, zo veel ervaring met het publiceren op hoog niveau dat ze niet snel voor een gat gevangen zitten. Op naar Genes and Development, ook een erg hoge “**impact factor**” en in hun ogen “excellent visibility”. Het werk uit New York verscheen januari 1999 in Nature Genetics, het onze in maart. Het onze was wat completer, de plaatjes mooier, de interpretaties solider, kortom het geheel wat artistieker zoals je in die dagen mocht verwachten van een vergelijking tussen Europa en de USA. De Genes and Development publicatie is begin 2022 400 keer geciteerd, een mooi getal. Ook op dit gebied is er voortschrijdend inzicht. Dat van die mismatches bij het op moleculair niveau zoeken van het homologe chromosoom mag dan waar zijn, maar Msh4 en 5 stabiliseren ook de fragiele structuur met dat hengelende enkelstrengs DNA van figuur 14 en zijn nog steeds objecten van onderzoek waar het gaat om het vervolmaken van ons inzicht in crossing over.

Al heel lang is bekend dat de keuze van een DNA breuk om zichzelf te repareren met behulp van het DNA van het homologe chromosoom (via een cross over, fig 14), die route voor andere in de buurt gelegen breuken afsnijdt. Soms snuffelen die andere breuken wel aan het homologe chromosoom, nemen zelfs een stukje van de homologe basenvolgorde in het eigen DNA op, maar het komt niet tot een echte cross over. Dit leidt er dan toe dat 3 van de 4 chromatiden hetzelfde **genotype** hebben en je in de gameten een ratio van 3:1 vindt. Dit proces staat ook wel bekend onder de naam **genconversie**, komt veel voor en staat ook ten dienste van de meiotische paring. Bovendien leidt het tot meer genetische variatie. Om het nog weer complexer te maken is er op de plek van de crossing over ook sprake van genconversie en blijkt het hele proces verbazingwekkend mutageen, bij de mens gaat 4,4% gepaard met een vorm van een *de novo* mutatie en vooral in de gameten van een ouder wordende vrouw is dit opvallend (H11.3).

5.2 De meiotische delingen zelf

Figuur 13 geeft daar een schematisch overzicht van. De structuur van de bivalent weer oppakkend, gaat eerst de ritssluiting van het synaptonemaal complex open (fig 14) waardoor de homologe chromosomen elkaar loslaten, behalve op de plekken waar de cross overs als **chiasmata** zichtbaar worden (een historische naam, enkelvoud chiasma, fig 14). Je kunt ze met de microscoop tellen, lange tijd een specialistisch en bij de mens moeizaam werkje.

Eén van de mismatch repair eiwitten heeft de naam Mlh1. In 1996 verscheen er een publicatie in Nature Genetics waarin werd aangetoond, dat een antilichaam fluorescentiekleuring op gespreide pachyteen spermatocyten (fig 14, 15) een stippenpatroon op de synaptonemale complexen produceert en zo de cross overs laat zien die in aantal overeenkomen met de chiasmata. Deze Mlh1 stipjes zijn wel makkelijk te tellen, en zo opende zich een nieuw onderzoeksveld, het bepalen van de aantallen cross overs bij man en vrouw en hun verdeling binnen en tussen bivalenten. De tweede auteur van deze publicatie was Annemieke Plug, de op een na laatste Terry Ashley. Cross overs komen verspreid over de chromosomen voor maar naar de einden toe zijn het er duidelijk meer. Ook hebben ze de neiging om bij elkaar uit de buurt te blijven (fig 15). Wanneer je de verdeling van de cross overs over de bivalenten bestudeert zijn de patronen tussen man vrouw subtiel anders. Bij de vrouw zijn het er zoals hiervoor gezegd meer, en ze kunnen wat dichter bij elkaar liggen. Ook concentreren ze zich wat minder op de einden van de chromosomen.

Om de eerste meiotische deling mogelijk te maken, moeten de zusterchromatiden hun innige band (in de vorm van het cohesine complex, fig 6) opgeven, zodat de homologen (die dan tenminste één cross over hebben ondergaan) gescheiden kunnen worden. Het is belangrijk daarmee te wachten tot de bivalenten zich hebben georiënteerd in het centrum van de **spoelfiguur** (fig 3, 13). Tijdens de metafase liggen de chiasmata in de equator, in evenwicht gehouden door de trekkracht van de op de **centromeergebieden** aangrijpende spoelfiguur (fig 3). Maar bij de centromeren blijven de zusterchromatiden met elkaar verbonden. Daar moet het oplossen van het cohesine complex uitgesteld worden tot de 2^e meiotische deling. Crossing over is dus essentieel voor het halveren van het chromosoomaantal. Zoals hiervoor gezegd is er per bivalent minimaal één van nodig. Het grote belang van het cohesine complex bij de meiotische delingen van de eicel komt in hoofdstuk 11 aan bod.

5.3 De genetische gevolgen van de meiotische delingen

In de 60-er jaren werd het basisvak erfelijkheidsleer aan de toenmalige Landbouwhogeschool gekenmerkt door een grote tekstvastheid. Het hielp enorm wanneer je op het mondelinge examen de kernzinnen woordelijk kon herhalen. En deze kernzinnen waren de kapstokken waar de hoorcolleges aan waren opgehangen. De standaardformuleringen waren zeker van toepassing op de wetten van Mendel. De eerste wet houdt in dat een allelenpaar voor gen A met genotype Aa tijdens de meiotische delingen gescheiden wordt: 50% van de gameten bevat het ene allel A en 50% het andere a (kleine a in de dreun op het hoorcollege). Intuïtief denk je natuurlijk dat dat tijdens de eerste meiotische deling gebeurt, wanneer de bivalenten uit elkaar worden getrokken en als gevolg daarvan het chromosoomaantal wordt gehalveerd. Maar wanneer je naar figuur 13 kijkt is dat maar de halve waarheid of nog minder. Het geldt voor genen die liggen tussen het centromeer, waar de trekdraden van de spoelfiguur werken en de eerste cross over. Voor genen die voorbij het punt van crossing over liggen zijn de zusterchromatiden geen echte zusters meer omdat er recombinatie heeft plaatsgevonden binnen het chromosoom. Dit chromosoom, dat nu de 2^e meiotische deling in gaat, is vanaf het cross over punt **heterozygoot** voor alle genen waarvoor het individu ook heterozygoot is (fig 13). De reciproke situatie voor dit chromosoom vind je in de andere dochtercel (fig 13). Opgeteld kun je over beide dochtercellen van de eerste meiotische deling voor dit voorbeeldchromosoom 4 genetisch verschillende chromatiden zien, de chromosomen van de aanstaande gameten. Om de chromatiden in de gameten te krijgen moet de 2^e meiotische deling worden doorlopen en pas dan segregeren de allelen van de genen

die gerekend vanaf het centromeer voorbij de plek van de cross over liggen. De fase waarin de fysieke scheiding plaats vindt maakt voor het eindresultaat niets uit. De beroemde 1 op 1 segregatie van de eerste wet van Mendel blijft gelden. Bovendien is het de basis voor de stelling dat je als individu de helft van het genetisch materiaal van één ouder krijgt.

Nu de 2^e wet van Mendel, die bekend staat onder de mooie Engelse uitdrukking “independent assortment”. Die tweede wet berust erop dat de bivalenten zoals ze in de metafaseplaat (fig 3) van de eerste meiotische deling liggen, elkaar eigenlijk niet kennen. Daarmee bedoel ik dat wanneer van zeg bivalent 1 het van de moeder geërfde centromeer naar links beweegt, de van de moeder geërfde centromeren van de naburige bivalenten daar geen weet van hebben en gewoon hun eigen gang gaan. De oriëntatie van de bivalenten is volkomen willekeurig waar het gaat om de herkomst (maternaal of paternaal) van de chromosomen. Dit is de basis van de tweede wet van Mendel. Deze wet staat aan de basis van het ongekend grote aantal **gameet** genotypen dat de meiose produceert. Een vaak niet beseft gevolg van deze wet is dat je er als grootouder niet vanuit kunt gaan dat 25% van je erfelijk materiaal in het kleinkind terug te vinden is. Samen met de partner is dat 50%, maar per grootouder zit de meeste variatie tussen de 18 en 32%.

We leerden natuurlijk ook dat bij dit soort kruisingen, waar één ouder heterozygoot was voor 2 genen (AaBb x aabb), je uit het feit dat de gametentypen AB, Ab, aB en ab in gelijke frequenties in het nageslacht te vinden waren, niet automatisch kon besluiten dat die genen ook op verschillende chromosomen lagen. Wanneer er tussen twee genen op hetzelfde chromosoom altijd een cross over plaats vindt zie je in de gameten de beroemde AB, Ab, aB en ab combinaties in een gelijke frequentie verschijnen, precies de uitkomst van “independent assortment”.

Maar wanneer twee genen dicht bij elkaar liggen en daartussen lang niet in elke meiotische profase cel een cross over ontstaat, zie je de twee allelencombinaties die door recombinatie ontstaan, ieder onder het aandeel van 25% zakken. In 1911 vond een student van de bekende fruitvlieggeneticus Thomas Hunt Morgan uit hoe je de informatie van dergelijke kruisingen kon gebruiken om per chromosoom een **genenkaart** te maken, waarbij een maat voor de afstand de kans op crossing over was (hoe groter de afstand, hoe groter de kans). Wanneer van de zeg 1000 nakomelingen er 10 komen van gameten, die een voor de allelen van deze genen gerecombineerd chromosoom bezitten, is het recombinatiepercentage 1%: dit wordt 1 centiMorgan “genetische afstand” genoemd. De student die het allemaal bedacht heeft heette overigens Alfred Sturtevant en werd gelukkig later ook nog een beroemde *Drosophila* geneticus.

Voor de tijd van de “whole genome” DNA projecten was de op recombinatie door crossing over gebaseerde genenkaart het grote houvast. Je wist in welke volgorde op welk chromosoom de genen lagen (veel voor morfologische kenmerken, maar ook eiwitvarianten die je met eenvoudige technieken uit de moleculaire biologie in hun “allel gedaante” in de electroforese bak zag liggen). De uit 1996 stammende 3^e editie van de muizenbijbel “Genetic variants and strains of the laboratory mouse” bevat een tabel van 258 pagina’s met daarin per gen de recombinatiepercentages met de andere genen op dat chromosoom. In totaal geeft die tabel zo’n 12.250 geschatte afstanden. Wanneer je bedenkt dat je eerst de muizenstammen moest maken die homozygoot **recessief** en **dominant** zijn voor de genen van keuze, is goed in te zien welke astronomische aantallen muizen hiervoor zijn gebruikt. Het meeste van dit werk is gedaan in de 2^e helft van de vorige eeuw en in het eerste deel van deze periode speelde maatschappelijke verantwoording van proefdiergebruik geen grote rol. De genenvolgorde is op de DNA kaart niet veranderd, maar wel de onderlinge afstanden. Zoals hiervoor al bleek zijn de cross overs niet willekeurig over het DNA verdeeld. De cross overs vinden voor 60-70% op zogenaamde “hotspots” plaats.

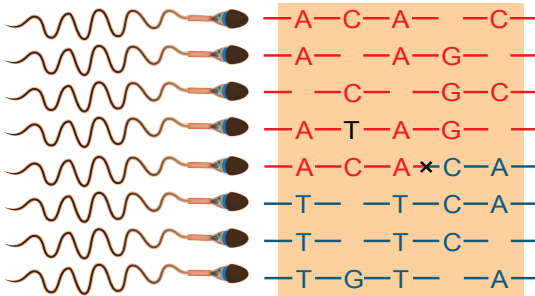
Buiten die “hotspots” (lees “hotspots” die minder “hot” zijn) zijn cross overs niet in alle regio’s van een chromosoom even dik gezaaid. Maar over vele generaties bekeken komen ze zo ongeveer overal wel een keer voor. Door crossing over neemt het aantal combinaties van allelen van de zeg 20.000 genen nog een keer (bovenop “random assortment”) enorm toe. Recombinatie tussen en binnen chromosomen wordt altijd gezien als een gunstig aspect van de seksuele reproductie, het genereert variatie en daardoor vergroot het de selectiemogelijkheden, lees, de mogelijkheid tot aanpassing aan nieuwe omstandigheden.

Wanneer er nu net naast een allel voor gen A, dat de drager alleen maar voordelen verschafft, er een nieuwe mutatie opduikt in een nabij gelegen gen B, waar het individu last van heeft, dan heb je duidelijk minder plezier van dat gunstige allel A. De meeste mutaties zijn nu eenmaal niet voordelig. Maar door recombinatie (fig 13) kom je daar weer vanaf. Zo ontstaan er “gunstige” brokken chromosoom, waar de natuurlijke selectie wat mee kan. Dat kan betekenen dat individuen met dergelijke gunstige aaneengesloten stukken genetisch materiaal (voor zo’n aaneengesloten stuk wordt het woord **haplotype** gebruikt, fig 16) meer nakomelingen krijgen en aldus een hogere “**fitness**” hebben. En fitness is de drijvende kracht achter de evolutie. Ook heeft sex voordelen, wanneer de **mutatiefrequentie** wat hoger is en de omgeving, het milieu, wat instabieler is zodat aanpassen dé weg is. Het opbouwen van resistentie tegen parasieten is zo’n aanpassingsact. Sex is dus geknipt voor de Darwiniaanse denkwijze (Charles Darwin, “On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races

1. "Ongefaseerde" SNPs



2. DNA analyse individuele spermacellen



3. Deductie "gefaseerd" haplotype per chromosoom

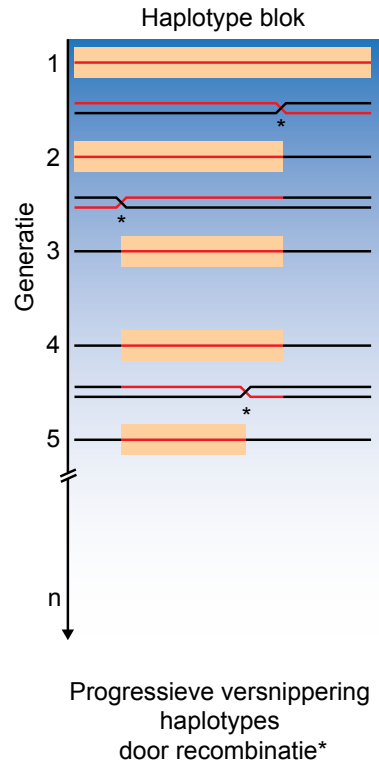
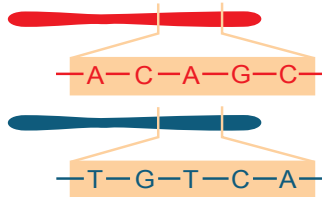


FIG 16

Wanneer er een **DNA** analyse met behulp van bijvoorbeeld **SNPs** wordt uitgevoerd zie je wel of er per positie **heterozygotie** of **homozygotie** is maar je kunt niet zien welke **allelen** bij elkaar op hetzelfde **chromosoom** liggen en zo een **haplotype** vormen. Bij een DNA analyse van individuele zaadcellen zie je dat wel. Door de patronen die de SNPs samen maken voor meerdere zaadcellen te vergelijken zie je nu ook de gevolgen van **crossing over** verschijnen. Bij de hier gegeven methode kun je nog niet besluiten welk (niet **gerecombineerd**) haplotype van de vader van de zaaddonor komt en welk van moeder.

Daarvoor is DNA onderzoek van de ouders van de donor nodig. Het proces van het toewijzen van chromosoomsegmenten aan de maternale en paternale kopie staat bekend als "phasing". In het voorbeeld hier had men al kennis van de SNP patronen van de vader en de moeder (vergelijk met fig 13). Rechts in de figuur een illustratie van het feit dat een haplotype iedere keer dat er tijdens de opeenvolging van generaties een meiose wordt doorlopen weer de kans heeft om door crossing over korter te worden. Statistici met kennis van de **allelfrequenties** van de SNPs en populatiegenetisch inzicht, hebben zich erover gebogen hoe kort een haplotype kan zijn om nog te functioneren als de merker van die ene voorouder. Dat wil zeggen dat de SNP code over dat stukje chromosoom uniek moet zijn. Omdat dit voor een klein haplotype bij verdere verwantschap niet mee valt wordt een dergelijke analyse over het hele genoom heen uitgevoerd, waarbij kleine onzekerheden per haplotype weg kunnen vallen. Het goedkoper worden van **NGS** heeft dit gebied weer een impuls gegeven en het beter worden van statistische modellen doet dat ook. NB de zwarte T is een technische fout.

in the *Struggle for Life*", 1859). Als je de goede allelen door recombinatie op een chromosoomsegment kan verenigen lukt dat in het reciproke cross over product ook met de minder goede allelen (fig 13), bijvoorbeeld leidend tot prenatale sterfte of onvruchtbaarheid, het totale verlies aan "fitness". Jaap van der Veen, hoogleraar Erfelijkheidsleer in Wageningen van het eind van de 60-er jaren tot 1988, had het bij het falen van de voortplanting over "genetische doden": het woordgebruik in de populatiegenetica is wel eens wat ruw.

5.4 De toepassingen van meiotische uitkomsten

5.4.1 Het bepalen van verwantschap

De reden om hier in zo veel detail bij stil te staan is dat er momenteel enorme hoeveelheden genetische data de maatschappij in rollen. Veel mensen sturen hun DNA naar bedrijven als 23andMe, Ancestry en MyHeritage en een uitlees in de orde van 700.000 **SNPs** (H3.2) is bij deze bedrijven voor weinig geld gedaan. Deze SNPs voldoen aan de voorwaarde dat er twee **allelen** (lees basen, bijvoorbeeld C/T) op deze positie in het **genoom** voor komen en dat de minst voorkomende nog altijd gemiddeld 1x per 50 mensen gevonden wordt, de **allelfrequentie** is minimaal 0,01. De analysemogelijkheden op populatieniveau zijn indrukwekkend. Laten we beginnen met een wat verdere verwantschap. Op het gemiddelde chromosoom zitten bij het gebruik van een 700k chip zo'n 30.000 SNPs. Doordat er genetische variatie is krijg je over een serie naast elkaar gelegen SNPs voor ieder individu een uniek patroon voor dat chromosoom, maar je kunt niet op voorhand zeggen welk allel op welk van de twee homologe chromosomen ligt. In de meiose segregeren chromosomen en chromosoomsegmenten. Stel je nu voor dat je een paar generaties meereist met een stukje chromosoom. Figuur 16 laat het idee hierachter zien: per meiose en dus per generatie wordt een cross over vrij stuk korter, omdat er nieuwe cross overs plaats vinden.

Dan wordt het haplotype ook kleiner. Zolang het groot genoeg is en er voldoende SNPs op zitten zullen ook veel kortere chromosoomsegmenten nog steeds een uniek patroon van SNP combinaties vertonen. Denk hierbij aan een barcode die het haplotype verbeeldt. Zo is in principe het hele genoom ook per chromosoomsegment te herkennen aan het allelenpatroon van de SNPs. Dat "volgen" is wel een beetje hogere wiskunde omdat, zoals hiervoor is opgemerkt, je aanvankelijk bij de gemeenschappelijke voorouder niet weet welke allelen bij elkaar op hetzelfde chromosoom liggen. Maar door het segregeren in de meiose en met enige rekenkracht kun je daar in een stamboom achter komen. Wat op hetzelfde chromosoomsegment ligt is bij elkaar gebleven. In elke meiose (dus in elke generatie) nemen de homologe segmenten weer afscheid van elkaar. Zo neemt het aantal segmenten waarmee nog overeenkomst wordt gevonden af, naarmate je dieper de stamboom in moet om via (een) gemeenschappelijke voorouder(s) een verwante te vinden. Dat aantal passages door de meiose bepaal je door in de stamboom terug te gaan naar de gemeenschappelijke voorouders, en dan weer vooruit naar de verre verwante. Met behulp van het herkennen van de allelpatronen over het hele genoom is het mogelijk om

nog met een redelijke mate van zekerheid een achter-achter-achternicht of -neef op te sporen (60%). Ga je in een rechte lijn de diepte van de stamboom in dan blijft “genetische identiteit” wat langer behouden. In het in 2018 verschenen boek “Who we are and how we got there” van de Harvard onderzoeker David Reich staat een mooie figuur die dit principe illustreert. Volgens zijn aannames wordt na 7 generaties de kans groter dat de genetische invloed van één der 128 voorouders verloren gaat. Van de 1024 voorouders 10 generaties terug in de tijd, draagt nog maar ongeveer de helft bij aan het DNA van jou.

Het vaststellen van je genetische achtergrond in termen van gebieden, landen en werelddelen werkt op basis van de kans op een allel per SNP per gebied of werelddeel. Dit geeft informatie over afkomst op basis van hoe de mensen zich over de wereld hebben verspreid. Informatie over alle SNPs wordt hierbij opgeteld. Naarmate meer mensen over de wereld hun DNA hebben opgestuurd worden deze schattingen nauwkeuriger, dan krijg je een update. Ook dit is dataverwerking, weer een combinatie van biologisch en statistisch inzicht.

In appendix 1 wordt nog ingegaan op de waarde van een SNP profiel voor het inschatten van de genetische aanleg voor een op meerdere genen berustend kenmerk, waartoe ook de meest voorkomende ziekten behoren.

5.3.2 Opsporen van een delinquent

Een evaluatie van de mogelijkheden die een database zoals die van 23andMe geeft, verscheen eind 2018 in Science. In deze publicatie worden 1,28 miljoen humane genotypen met elkaar in verband gebracht. Het DNA is hoofdzakelijk afkomstig van de nakomelingen van Europese emigranten naar de USA. De onderzoekers voorspellen dat wanneer 2% van de populatie DNA heeft afgestaan en beschikbaar heeft gesteld voor onderzoek, bijna iedereen een verre verwant kan opsporen. En dit heeft weer andere consequenties wanneer er op de plaats van het misdrijf DNA is achtergebleven (aannemende dat dit DNA met de misdaad te maken heeft). De dan op te sporen verre verwant, kan in combinatie met genealogische gegevens, geslacht, de leeftijd (beelden bewakingscamera) en plaats van het delict (de meeste misdrijven worden gepleegd binnen een straal van 160 km rond de woonplaats meldt het artikel), leiden tot een sterke inperking van het aantal verdachten. De maatschappelijke implicaties zijn natuurlijk groot, en alles kwam in 2018 prominent in het nieuws toen op basis van populatiegenetisch onderzoek in de USA, mogelijk gemaakt door een publieke database, de seriemoordenaar “Golden State Killer” na 40 jaar werd opgepakt. Een ander voorbeeld is het onderzoek naar de dader van de moord op

Marianne Vaatstra die in 1999 op 16 jarige leeftijd om het leven kwam. Een populatiegenetisch DNA onderzoek onder ongeveer 6000 mannen uit de buurt van het misdrijf in Noord Oost Friesland dat zich richtte op het Y chromosoom, leidde in 2012 tot het oplossen van dit misdrijf. Via de traag muterende **SNPs** (tabel 3), die de hele oude geschiedenis van de drager weergeven, kon uitgesloten worden dat de dader uit een nabijgelegen asielzoekerscentrum kwam.

Met behulp van de veel sneller muterende microsattelieten (tabel 3, van 10^{-4} tot 10^{-2} per gameet per generatie) op het Y chromosoom kon de analyse naar het niveau van verwantschap worden verplaatst en kwam de dader boven water. Sociaal zijn we in de eerste plaats een individu maar genetisch gewoon een onderdeel van de populatie.

5.3.3 De resten van *Homo neanderthal*

Waar komen die SNPs nu eigenlijk vandaan en hoe oud zijn ze? Daar is in hoofdstuk 3.2 en tabel 3 al aandacht aan besteed. Op een reproductieve leeftijd van 30 jaar komen er per generatie rond de 60 bij (tabel 3).

Gelukkig verandert de basencompositie van het genoom niet erg snel. Omdat op de SNP platforms alleen SNPs zitten met een minimale allelfrequentie van 1% kun je besluiten dat deze genetische varianten oud zijn. Hoe oud? Dat gaat voor hier een beetje te ver, maar om een idee te krijgen kan een blik in onze genetische historie helpen. Volgens het bovengenoemde populair wetenschappelijke boek van David Reich kun je de splitsing tussen *Homo neanderthal* en *Homo Sapiens* ergens 700.000 jaar geleden positioneren. Doordat de technieken om DNA uit paleontische resten te isoleren en op te zuiveren zoveel beter zijn geworden, een ontwikkeling die zich voornamelijk onder leiding van Svante Paabo in Leipzig heeft voltrokken, kon in 2010 het genoom van *Homo neanderthal* worden gepubliceerd. De laatste gemeenschappelijke voorouders van *Homo sapiens* en *Homo neanderthal* leefden naar schatting zo'n 770.000-550.000 jaar geleden. Het genetische verschil met *Homo neanderthal* is groot genoeg om op basis van deze SNPs (bekend is welke base, lees welk allel van *Homo neanderthal* is en welke van *Homo sapiens*) hele kleine segmenten van *Homo neanderthal* in onze genomen op te sporen. Per individu is niet meer zo heel veel *neanderthal* DNA in het genoom aanwezig, maar iedereen draagt het met zich mee. In "caucasians", zoals de samenvoeging van Europeanen en de bewoners van het nabije oosten meestal in de literatuur worden aangeduid, vinden we nog rond de 2% per individu. Over allen opgeteld is nog zo'n 30% van het *neanderthal* genoom aanwezig, we hebben niet allemaal dezelfde genetische *neanderthal* bijdrage. Sinds de periode waarin er

paringen waren tussen *Homo sapiens* en *Homo neanderthal*, zo vanaf 65.000 jaar geleden tot hun verdwijnen rond 40.000 jaar geleden, is de invloed van *Homo neanderthal* in het genoom door negatieve selectie afgenomen. In de genen die te maken hebben met keratine eiwitten (in nagels, haren en huid) zit nog een meer dan toevallige “*neanderthal*” invloed wat duidt op positieve selectie, en zo zullen er meer voorbeelden zijn. Wat deze periode van kruisbevruchting met ons heeft gedaan blijft intrigeren. Uitgaande van de verschillen in de schedel, het hellende voorhoofd van *neanderthal* en het achterhoofd van *sapiens* is ronder, kun je bijvoorbeeld kijken of je de variatie aan schedelvormen binnen *Homo sapiens* kunt correleren met een mogelijke restinvloed van nog steeds in de populatie aanwezige *neanderthal* genen. Deze herken je op basis van de *neanderthal* allelen voor SNPs. Zouden we hiermee genen die te maken hebben met de vorm van de schedel op kunnen sporen? In januari 2019 verscheen er een publicatie in het blad *Current Biology*, waarin voor dit doel alles uit de kast is gehaald. Van de 27 auteurs hadden er 4 een relatie met de Radboud Universiteit.

In 4468 individuen vonden de onderzoekers twee kleine stukjes DNA, gekarakteriseerd door 5, 6 SNPs, een haplotype met een zeer hoge kans op *neanderthal* origine, het ene ongeveer 200 kb lang op chromosoom 1 en het andere van ongeveer 500 kb op chromosoom 18. En dat allemaal door crossing over en segregatie over de vele generaties die zijn verstreken sinds de periode van seksuele contacten in de oertijd. Voor de liefhebbers, met allelfrequenties van respectievelijk 0,044 voor chromosoom 1 en 0,055 voor chromosoom 18 is het niet verwonderlijk dat *neanderthal* homozygoten voor deze stukjes erg zeldzaam zijn. De genen die zo zijn opgespoord hebben te maken met de neurogenese en met de vorming van de myelineschede rond de zenuwbanen (te vergelijken met het plastic isolatie van een elektriciteits snoer). Deze bevindingen suggereren dat de betreffende genen tijdens de ontwikkeling bijdragen aan de schedelvorm.

De discussie over de invloed van het verkeren met *Homo neanderthal* op de vruchtbaarheid komt in hoofdstuk 12.5.1 aan bod.

De overgang naar de kwantitatieve genetica

Het op zichzelf simpele inzicht dat door de wetten van Mendel in combinatie met het chromosoomgedrag tijdens de **meiotische** delingen wordt verschaft, leidt uiteindelijk tot een duizelingwekkend complex beeld. Bij een enkele **cross over**, zonder welke de stap van **diploïd** naar **haploïd** niet goed verloopt, krijg je voor het betreffende chromosoom 4 producten die qua “**allelenboeket**” voor de erop gelegen **genen** verschillend zijn (fig 13). Maar voor de andere chromosomenparen krijg je dat ook. Dan is het aantal combinaties van allelenboeketten over alle chromosomen 4 tot de macht van het aantal **bivalenten**, dus voor de **autosomen** van de mens 4^{22} . Langere **chromosomen** hebben meer **cross overs**. Deze zitten niet altijd op dezelfde plaats en het aantal mogelijke allelenboeketten (lees het **genotype**) dat een individu met een redelijke graad van **heterozygotie** over de genen kan produceren is nog vele malen groter. De complexiteit zit hem dus in het bijna oneindige aantal mogelijke combinaties tussen de allelen over het genenpakket.

Door de **SNP** technologie en **whole genome sequencing (WGS)** is genetische variatie nu op populatieniveau direct analyseerbaar geworden. En daardoor is het mogelijk om per kenmerk voor het individu voorspellingen te doen over de genetische aanleg. Zijn de analysemogelijkheden op populatieniveau al indrukwekkend, door de groei van techniek en kennis wordt de stap naar het individuele niveau gemaakt. Dit geldt ook voor de commerciële aspecten van genetische analyse van het individu.

6.1 Het begrip erfelijkheidsgraad, de h^2

Op de afdeling fokkerij en genomica van de WUR was er herfst 2018 een kleine doch significante vorm van opwinding: de nieuwe druk van het tekstboek kwantitatieve genetica met de brede titel "Evolution and selection of quantitative traits", een band van 6,5 cm dik en 1459 genummerde pagina's, stond op uitkomen. Dit boek is het levenswerk van Bruce Walsh en Michael Lynch. De laatste komt in hoofdstuk 18 nog terug.

Wanneer je het boek doorbladert, vliegen de op statistische analyse gebaseerde formules je om de oren, en ook de tekst is niet altijd even toegankelijk. Kwantitatieve genetica blijkt een superspecialisme te zijn.

De eigenschappen waarvan de overerving in de kwantitatieve genetica wordt bestudeerd, worden door vele genen beïnvloed met per gen weer meerdere allelen. Men spreekt van een **polygeen** kenmerk. Nu vanzelfsprekend waren dit aanvankelijk aannamen. Kennis van de genen die aan de basis liggen van een eigenschap en de mate van betrokkenheid van deze genen bij het bepalen van het **fenotype** is niet per se nodig, maar vanuit de **genoom** projecten komt momenteel veel kennis beschikbaar. De grote verdienste van mensen als Robert Fisher en Sewall Wright is dat ze het inzicht van Mendel voor de overerving van 1 of een paar genen met meerdere allelen, hebben gecombineerd met wiskundig statistische methoden zoals correlatieberekeningen, variantieanalyse en regressieanalyse. Van collega's hoor ik dat het oorspronkelijke werk van Ronald Fisher (UK, 1880-1962) en Sewall Wright (USA, 1889-1988) nauwelijks te lezen is. Maar het is wel opgepikt en bijvoorbeeld door de Amerikaan Jay L. Lush (1896-1982), die bekend staat als de vader van de moderne veeverbetering, voor college- en onderzoeksdoeleinden vertaald.

De **erfelijkheidsgraad** of in het Engels "heritability" (h^2) is een centraal begrip in de kwantitatieve genetica, maar wat is het eigenlijk? De theorie hierachter is erop gebaseerd dat ouders de helft van hun genetisch materiaal doorgeven aan hun kinderen en dat daarbij voor **loci**/genen met twee allelen, het ene allel in de ene **gameet** belandt en het andere allel in een ander, de eerste wet van Mendel.

De centrale vergelijking in de kwantitatieve genetica is $P = G + E$. P staat voor fenotype, G voor genotype en E voor de omgeving (fig 17). In de kwantitatieve genetica ga je uit van het gemiddelde. In deze formule geven P, G en E op populatieniveau de gehele spreiding, en de delen hiervan weer. Simpel gezegd splitst de formule de spreiding uit in een bijdrage van de genen en een bijdrage van de omgeving (fig 17). De bijdrage van de genen wordt in dit statis-

tische model voorgesteld als een optelsom van de doorgegeven allelen voor vele loci. Neem lengtegroei als voorbeeld. Sommige allelen voor sommige hierbij betrokken genen vertragen de groei, andere allelen voor dezelfde of andere genen versnellen de groei. Bij meer versnellers en minder vertragers word je groter dan het gemiddelde (fig 17) en omgekeerd word je met meer vertragers dan versnellers kleiner dan het gemiddelde. Voor het milieu geldt dezelfde redenering. Per definitie is de h^2 dat deel van de fenotypische afwijking van het gemiddelde dat door de optelsom van de genvarianten is veroorzaakt, het is dus een breuk en slaat op de populatie (zie fig 17 voor de formule). Om de h^2 te schatten heb je individuen nodig die op een bekende manier aan elkaar verwant zijn. Je gebruikt bijvoorbeeld ouder nakomeling koppels die in een spectrum van milieuomstandigheden met elkaar worden vergeleken: dit is het terrein van de bouwers van statistische modellen. Natuurlijk is hierin de eerste wet van Mendel, een individu krijgt de helft van het genetisch materiaal van iedere ouder, verwerkt. Maar eenzijdige tweelingen, die in verschillende milieus zijn opgegroeid kunnen ook worden gebruikt. Hoe meer individuen je in de familierelaties kan stoppen, hoe betrouwbaarder de schatting van de h^2 zal worden. Onder "familierelaties" valt alles wat de stamboom te bieden heeft, ook daar weten de modellen raad mee. Uit de formule volgt ook dat de schatting alleen maar geldt voor de populatie waarin je deze uitvoert en voor de milieuomstandigheden waarin de bepaling van het kenmerk heeft plaatsgevonden. Goed "fenotyperen", het vaststellen van de kenmerken, is dus erg belangrijk. In termen van dit vakgebied, een h^2 onder de 0,2 noemt men laag, tussen 0,2 en 0,4 is het gemiddeld en boven de 0,4 is hoog. Eigenschappen zoals de hoeveelheid zwart aan een zwartbonte koe hebben een hoge erfelijkheidsgraad. Dit geldt ook voor de kans op een hazenlip bij de mens en voor morfologische kenmerken die met het skelet te maken hebben zoals de lengte (mens) of de hoogtemaat (rund). Een eigenschap als BMI ("body mass index") heeft een gemiddelde h^2 , vruchtbaarheidsparameters een lage. Melkproductie in kilogrammen had vroeger een h^2 van zo'n 0,25 en wordt nu wat hoger berekend. De experts hebben niet eenduidig kunnen aangeven waardoor dat komt.

Minder meetfouten, een ander statistisch model of houden we het melkvee nu onder meer uniforme omstandigheden?

Een andere manier om een h^2 te schatten maakt gebruik van een selectie experiment. Daarvoor moet je weten in welke mate de zeg 15% "beste" (of "slechtste") voor de voortplanting geselecteerde dieren afwijken van het gemiddelde, en hoe dat zich in de volgende generatie fenotypisch manifesteert. In welke mate wijken de nakomelingen gemiddeld af? De breuk van deze twee

gemiddelde afwijkingen staat bekend als de gerealiseerde h^2 . Je ziet nu nog beter wat er in het echt gebeurt. Het standaardwerk van Walsh en Lynch geeft een aantal voorbeelden waarin de twee schattingen met elkaar worden vergeleken. Ze liggen in dezelfde orde van grootte, maar de overeenkomst is niet perfect en elke schatting heeft ook weer een betrouwbaarheidsinterval. De h^2 zou je kunnen omschrijven als het slagingsmes van de veeverbeteraar. Hoe hoger de h^2 , hoe makkelijker er op een kenmerk kan worden geselecteerd. In de praktijk gebeurt dit voor vele kenmerken tegelijkertijd. Daar zitten ook kenmerken bij met een lage h^2 zoals vruchtbaarheid. Selectie kan dan alsnog succesvol zijn, maar met de voorwaarde dat de fenotypische spreiding groot is, en dat is zo bij vruchtbaarheid.

6.2 De polygene risico score (PRS) en genoom brede associatie studies (GWAS)

Wanneer er een spuugmonster wordt opgestuurd naar 23andMe, een commerciële organisatie voor **DNA** onderzoek, is het in principe mogelijk om naast informatie over de afstamming ook geïnformeerd te worden over de genetische aanleg voor ziekte. Op een enkel gen berustende ziekten (monogene, H4.2) worden hier eigenlijk niet mee bedoeld. Het gaat in de context van dit hoofdstuk over polygene ziekten. Naarmate de genetische basis ervan ingewikkelder wordt, wordt een voorspelling natuurlijk moeilijker. Vele genen en hun varianten (allelen) zullen er dan bij betrokken zijn en de identificatie daarvan is een doorlopend proces.

Verder worden deze ziekten beïnvloedt door diverse omgevingsfactoren (bijvoorbeeld leefstijl). Ook dat maakt voorspellen een stuk lastiger (zie appendix 1). De uitlees hiervan staat bekend onder de afkorting **PRS**, "**polygenic risk score**". Deze houdt in dat er vanuit de SNP polymorfismen een voorspelling wordt gedaan van de risico's voor het individu. De schatting wordt gehaald uit een ongeselecteerde populatie van vele individuen die zelf hun ziektegeschiedenis hebben gedocumenteerd en die hun SNP DNA profiel laten bepalen. Wat dit verder allemaal betekent wordt uitgelegd in appendix 1. In deze appendix wordt ook verklaard waarom deze schattingen al snel problematisch worden. Maar niet principieel onmogelijk, zeker wanneer de genetische basis voor een kenmerk beter in beeld komt, zoals voor diabetes type 2.

De tegenhanger in de landbouwhuisdierwereld, van een op SNPs gebaseerde schatting van de genetische aanleg voor een kenmerk naar keuze, staat bekend als de genomische fokwaarde. Heel praktisch wordt die uitgelezen als bijvoorbeeld het aantal liters melk extra in het nageslacht van een bepaalde stier, vergeleken met een referentiepopulatie. Vee fokkers en vee-

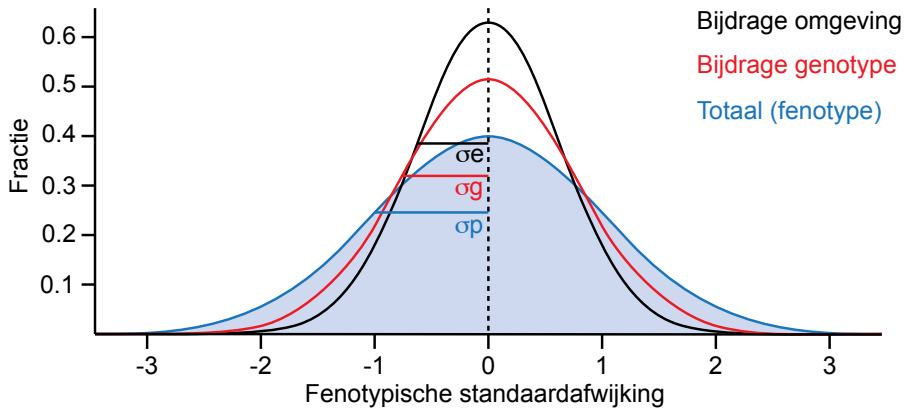


FIG 17

Gaussiaanse curven die de spreiding van een kenmerk en de opdeling ervan in componenten weergeven. De spreiding van het **fenotype** (blauw, P van “phenotype”) is opgesplitst in de bijdrage van het **genoom** (het **genotype**, rood, G van “genotype”) en de bijdrage van het milieu (zwart, E van “environment”). De eenheden op de X as geven de fenotypische standaardafwijking aan. De formule van de **erfelijkheidsgraad**, de h^2 is σ^2g/σ^2p , waarbij σ de standaardafwijking weergeeft en het kwadraat ervan de variantie. Beide zijn een maat voor de spreiding. De hier weergegeven situatie past bij een relatief hoge h^2 van 0,6. Om in dit model de fenotypische spreiding per genotype weer te geven zou je de beschikking moeten hebben over een gekloonde populatie die je als denkexperiment in een waaier van milieuomstandigheden laat functioneren, de σ_e Gausse curve blijft over. Hier zie je dat voor een denkbeeldige kloon met het gemiddelde genotype.

houders zijn hier dol op, want zo kunnen ze de KI stieren in spe per kenmerk in een volgorde zetten. De PRS en de genomische fokwaarden zijn twee verschillende vormen van presenteren vanuit dezelfde basisinformatie. Deze informatie kan in principe ook gebruikt worden om een h^2 te berekenen. Die h^2 heeft de toevoeging m van “markers” (h^2_M).

In de ontwikkeling van de wiskundige technieken voor dit alles, maar vooral in het transporteren van deze technieken naar humane populaties, heeft de nu in Australië werkzame Nederlander Peter Visscher een grote rol gespeeld. Peter Visscher deed de hogere agrarische school (de

HAS) in Dronten, studeerde daar in 1986 af, deed een masteropleiding aan de universiteit van Edinburgh en kwam daarna op de afdeling Genetica van die universiteit op West Mains Road terecht, waar hij de crème de la crème van de kwantitatieve genetica tegen kwam. Gesteund door deze inspirerende omgeving promoveerde hij in 1991 op een model om de genetische variatie voor melkproductie en melksamenstelling van de zwartbonte Holstein Friesian koeien in het UK te schatten. Zeker in die tijd was meer melk altijd beter. In zijn proefschrift worden twee boerenfamilies (de ene bij Markelo en de ander bij Rochdale in de UK) bedankt voor de eerste lessen in het fokken van vee en hoe het er op een melkveebedrijf aan toe gaat. De modellen die vanaf 1971 in Edinburgh zijn ontwikkeld om voor een kenmerk de variatie ontstaan door de genen met meerdere allelen, te scheiden van de variatie veroorzaakt door de omgeving, zijn opmerkelijk genoeg een lange tijd verborgen gebleven voor de humane genetici.

Een bijzonder verschil tussen de humane populatie en rundvee populaties is de totaal andere opbouw ervan. Het aantal individuen waarvan het hele bestand van de ongeveer 25 miljoen Holstein Friesians op de wereld afstamt, is eigenlijk maar klein. Er zijn stieren die via diepvries-sperma en kunstmatige inseminatie honderdduizenden nakomelingen hebben gekregen. Om daarmee te kunnen rekenen gebruik je het in de jaren 30 van de vorige eeuw ontwikkelde begrip **effectieve populatiegrootte (Ne)**. Voor Europeanen is een getal van 10.000 genoemd, voor Holstein Friesians 50-100.

Het getal Ne heeft er direct mee te maken hoe groot de kans is dat bij een conceptie, dus bij de vorming van de **zygote**, genoomsegmenten die qua afstamming aan elkaar gelijk zijn, elkaar in het nieuwe individu ontmoeten. Hoe kleiner dit getal, hoe groter die kans en hoe hoger de inteelt.

Er is nog een manier om in te zien dat we meer aan elkaar verwant zijn dan je met enige kennis van de stamboom zou vermoeden. Iedere generatie terug verdubbelt het aantal voorouders in de stamboom.

Twintig generaties terug zijn dat er over een miljoen en 25 generaties terug 33+ miljoen. Stel dat de ouders van alle kinderen gemiddeld 25 jaar oud waren op het moment van hun geboorte (het **generatie interval**), dan schuiven 25 generaties je iets meer dan 600 jaar terug in de tijd. Het is dan rond 1400 n. Chr., in de periode dat de Europese bevolking van een eerdere piek van 75 miljoen kan zijn gehalveerd. Rond 650 n. Chr. wordt de Europese bevolking geschat op 18 miljoen. Het kan niet anders dan dat velen van ons ver in de tijd gemeenschappelijke voorouders hebben.

Het verschil in populatieopbouw maakt uit voor het doen van voorspellingen van het fenotype op basis van het genoom. Terugkerend naar figuur 16 is er in de geschiedenis van de mens veel vaker een cross over opgetreden in de buurt van een gen dat bijdraagt aan het te bestuderen kenmerk, dan bij het rund. Het gevolg daarvan is dat er veel meer SNPs per genoom nodig zijn om er zeker van te zijn, dat er eentje is die absoluut gekoppeld is aan een gen dat kan bijdragen aan het fenotype en ook nog eens heterozygoot is. Het bepalen van de bijdrage (als variatie op het gemiddelde) van in principe ieder chromosoomsegmentje aan dat fenotype, staat bekend onder de naam **genoom brede associatie studie (genome wide association study, GWAS)**. Hoe groter de studiepopulatie, bijvoorbeeld de populatie die beschikbaar is in de UK biobank, hoe nauwkeuriger deze schatting zal zijn. Heb je bij de mens al gauw een half tot een miljoen SNPs nodig, bij het rund is 10% daarvan voldoende. Het aantal plekken op het genoom, dat voor een polygeen kenmerk kan worden geassocieerd met dat kenmerk, is verbluffend groot. Denk, om de aantallen enigszins te benaderen, bij de mens aan 50.000 en bij het rund aan 5.000 posities.

Dat is 5-10% van het aantal SNPs die meegenomen worden op een chip. Bepaal je een grenswaarde voor significantie, dan is uit het materiaal van de UK biobank te schatten dat er 850 locaties op het genoom zijn die zorgen voor variatie in lengtegroei, en 160 die betrekking hebben op de variatie in BMI.

Nu het vaststellen van de basenvolgorde van het hele genoom betaalbaar is geworden, kun je je natuurlijk afvragen of het dan niet beter is om meteen maar “whole genome sequencing” (WGS) te gebruiken. De gedachte die daarachter zit is dat je op deze manier vroeg of laat de (delen van) genen die echt bijdragen aan de variatie op een kenmerk in beeld gaat krijgen en hopelijk ook de DNA veranderingen, die een allel tot een allel maken. De literatuur heeft het over het bepalen van de “**genetic architecture**” van een kenmerk. Daaronder verstaat men dat de genen, die betrokken zijn bij het ontstaan van het kenmerk tijdens de ontwikkeling, het onderhouden van het kenmerk en de graad van variatie per gen, bekend zijn.

Een ander argument om nu maar het hele genoom op genetische variatie te screenen, komt van het concept “missing heritability”. Dit is het verschil tussen “overerving in de praktijk”, het op de klassieke manier bepalen van de erfelijkheidsgraad (h^2) via verwanten en statistische methoden, en het bepalen van een erfelijkheidsgraad door een SNP analyse bij verwanten, de h^2 van hiervoor. Deze werd in de begintijd van de introductie van DNA merkers gevonden maar verdwijnt wanneer het DNA nauwkeuriger in grotere populaties wordt geanalyseerd.

Een consortium onder leiding van Peter Visscher maakte gebruik van DNA basenvolgorde data van hele genomen (WGS) van 21.620 Amerikanen van Europese komaf, wier DNA was geanalyseerd in het kader van het Amerikaanse onderzoeksprogramma TOPMed. Dit program is opgezet om tot een persoonlijke behandeling van een aantal aandoeningen met een chronisch karakter te komen (hart, longen, bloed en slaapgedrag).

Het grote verschil met het eerdere werk is dat nu een redelijk grote meerderheid van de $3,1 \times 10^9$ baseposities per genoom werd meegenomen. Na analyse bleek de “missing heritability” er niet meer te zijn. Nu klopte de op de genetische polymorfismen gebaseerde schatting (h^2 van hiervoor) met de schatting die gebaseerd is op de verwantschapsstudies: een h^2 van 0,8 voor lengte.

Helpt het voorgaande, een tendens tot het uitbreiden van de genetische analyse over het hele genoom met implicatie van steeds meer individuen, bij het voorspellen van een risico op ziekte? “Een mens lijdt het meest om het lijden dat het vreest” is een bekende uitspraak. Laten we nog even teruggaan naar de “polygenic risk scores” (PRS) op basis van een SNP profiel. Voor een kenmerk met een hoge h^2 als lengte is de geschatte genetische variatie, gebaseerd op 700.000 individuen maar 20%. In eenzelfde analyse is dat 7% voor schizofrenie. Deze schatting was gebaseerd op 37.000 patiënten en een controlegroep van 113.000 mensen. Om informatieve DNA **mutaties** op het spoor te komen moeten er dus erg veel mensen in de DNA analyse worden betrokken. Er is nog een belangrijke reden, waarom die “polygenic risk scores”, een individuele score, nog niet veel voorstellen. Bij iedere schatting van een bijdrage aan de totale variantie hoort ook een indicatie van de mate van nauwkeurigheid van die schatting. Voor een beeld hiervan zie appendix 1. Voor de meeste kenmerken, de grote meerderheid met een gemiddelde h^2 , is een betrouwbare schatting van het fenotype op basis van een commerciële analyse van SNPs nog ver weg.

Zoals hiervoor gesteld is de kwantitatieve genetica een gebied voor specialisten. Een gegeven uit dit vakgebied dat helpt om de waarde van genetische schattingen van een te verwachten fenotype te beoordelen is ook op een andere manier te illustreren: door te kijken naar de grote genetische variatie die ook binnen families zit. Statistisch is deze de helft van de totale genetische variatie. Grote verschillen in het nageslacht zijn dus heel normaal. Daarom ook kan een ziektebeeld met een sterke genetische component zoals hart en vaatzieken zomaar zonder een familiehistorie van drie generaties opduiken. En dat komt door de al die generaties lang segregerende genetische variatie tijdens de meiose op weg naar het haploïde niveau, en het ontstaan van variatie op diploïd niveau bij de bevruchting. De grote “binnen familie” genetische variatie

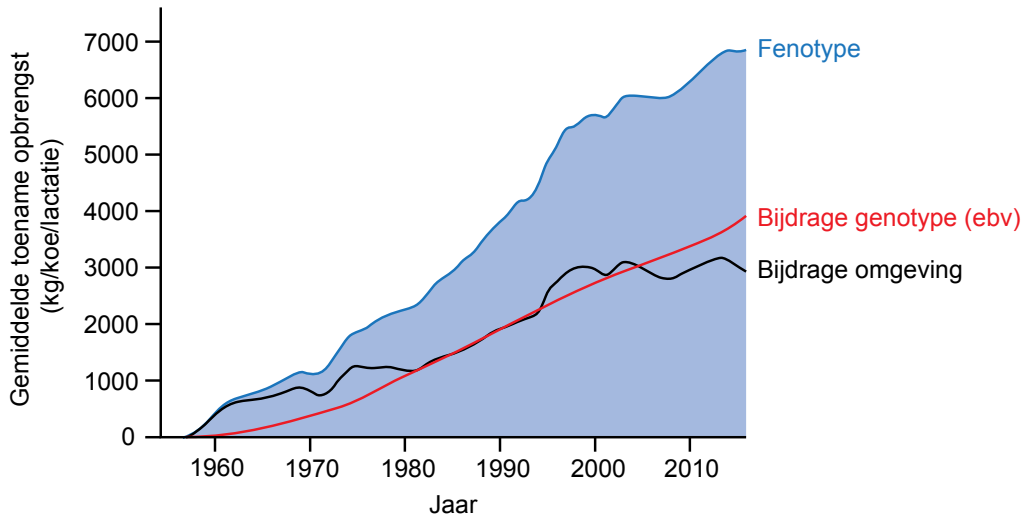


FIG 18

De selectierespons op melkproductie tussen 1957 en 2015 van Holstein Friesians in de USA. In de fokkerij wordt deze uitgedrukt als de “estimated breeding value” (ebv). Deze draagt voor ongeveer de helft bij aan de totale stijging van de productie. De andere helft wordt veroorzaakt door betere verzorging, inclusief de voeding. Hoe lang kan deze stijging fysiologisch door gaan en wat zijn de gevolgen voor het milieu lokaal en elders? Melken is tenslotte voeren.

geldt ook nog voor de Holstein Friesian melkvee populatie. Zelfs bij een lage effectieve populatie omvang blijft die hoog. Anders was de respons op selectie zoals weergegeven in figuur 18 niet mogelijk geweest. Op naar deel II, de **kiembaan**.

DEEL II
DE KIEMBAAN

Het ontstaan van de primordiale kiemcellen in het jonge embryo

De cellen die er voor zullen zorgen dat er nageslacht kan worden geproduceerd noemen we **kiemcellen**, vanaf hun eerste ontstaan in het vroege **embryo** tot aan de vorming van eicellen en zaadcellen, die gereed zijn voor de bevruchting. In hun eerste verschijningsvorm spreken we over **primordiale kiemcellen**.

Embryologen hebben zich natuurlijk al heel vroeg afgevraagd wanneer in de embryonale ontwikkeling van zoogdieren, kiemcellen voor het eerst te onderscheiden zijn. Het meeste, eerst beschrijvend en later experimentele onderzoek op dit gebied is uitgevoerd op muizen. Voor de muis hebben we geen complete atlas van de embryonale ontwikkeling vanaf de bevruchting, zoals die bestaat voor het aaltje *Caenorhabditis (C) elegans* (een simpel modelorganisme). Dus geen atlas waarin het lot van elke cel en de nakomelingen van die cel wordt beschreven. Toch komt ook voor de muis uit veel publicaties een steeds completer beeld naar voren van wat de embryonale cellen drijft in de vorming van het bouwplan, dat het eind van de embryonale periode markeert: alle organen zijn dan in aanleg aanwezig. Vanaf dat moment praten we over **foeten** en over de foetale periode die tot aan de geboorte zal duren. Net na de innesteling worden de zogenaamde **kiembladen** gevormd en wordt de lengteas van het embryo zichtbaar. De vroegste ontwikkelingsstadia rond en vlak na de innesteling in de baarmoederwand zijn experimenteel het moeilijkst te benaderen. Laten deze nu juist het interessantste zijn voor het verschijnen van de primordiale kiemcellen.

Al in de jaren 70 was er een sterke aanwijzing dat in de periode waarin de kiemcellen ontstaan, er maar weinig van zijn. In dat decennium werden er technieken ontwikkeld om van twee embryo's er één te maken, zo ontstaat een **chimaera**. Bij de oudste techniek laat je twee genetisch verschillende 8-cellige embryo's tegen elkaar aan groeien. Daarvoor verwijder je de

slijm laag, de **zona pelludica** (fig 39, 42) en daarna “hockey” je onder een prepareermicroscop de celklompjes net zolang naar elkaar toe totdat ze een beetje in elkaar passen en blijven “hangen”. De volgende morgen zie je dan een embryo in de vorm van een kort hondenbotje, dat je kan transplanteren naar de baarmoeder van een pseudo-drachtige moedermuis. Deze techniek stamt uit 1961. Bij de 2^e methode injecteer je cellen van de “**inner cell mass**” (ICM) van het ene embryo in de holte van een andere **blastocyst** (fig 43) waarvan het genotype verschilt. Bij de injectietechniek kun je ook **embryonale stamcellen** gebruiken waarin door genetische manipulatie een bepaald **gen** is uitgeschakeld of veranderd (boxen 2 en 3). Het woord chimaera komt uit de Griekse mythologie, waarin ze optreden als een fusie tussen een leeuwenkop, een geitenlijf en een slangenstaart. Ze hadden geen goede reputatie, en werden geacht monsters te zijn. Maar in werkelijkheid groeien de cellen van de twee embryo's al snel door elkaar heen: de mobiliteit van cellen tijdens de embryonale ontwikkeling is groot. Alle organen bevatten dan ook cellen van beide genotypen. Al snel viel op dat dit voor het nageslacht niet altijd het geval was, ook niet wanneer de analyse beperkt werd tot die fusies waarbij de bij elkaar gebrachte genotypen van hetzelfde geslacht waren (XX/XX en XY/XY).

De meest redelijke verklaring daarvoor is, dat het aantal cellen dat de **kiembaan** sticht niet groot is, en afkomstig uit een klein gebied. Dat vergroot de kans op afwezigheid van één van de twee cellijnen bij de nakomelingen. Bij de mens zijn door embryo fusie ontstane chimaera's zeldzaam, als er al een reden is om de kans te hebben ze te ontdekken. Voor de kiembaan is het nog nooit gerapporteerd.

Op het eerste moment waarop er bij de muis zekerheid ontstond over de aanwezigheid van primordiale kiemcellen, waren deze niet omringd door cellen die al zijn voorbestemd om alleen maar bij te dragen aan het zich ontwikkelende embryo. Nee, ze bleken er buiten te liggen, bij de embryonale membranen. Met een klassieke enzymkleuring uit 1954, konden ze als een groepje van rond de 40 cellen naast het zich ontwikkelende 7,5 dagen oude embryo worden aange-toond. We hebben tot 2005 moeten wachten voordat er in moleculair celbiologische zin een tipje van de sluier rond het ontstaan van de primordiale kiemcellen werd opgelicht. In dat jaar publiceerde de groep van Azim Surani en Mitinori Saitou van het Gurdon Instituut in Cambridge de betrokkenheid van het eiwit Blimp-1 bij het ontstaan van de kiembaan van de muis, kort nadat de embryo's zich hebben ingenesteld en net voordat de uitvoering van het algemene bouwplan van het embryo met de drie kiembladen van start gaat. In embryo's van 6,5 dagen oud telden ze tussen de 8 en 24 cellen in de **epiblast**, die voor dit eiwit kleurden. Blimp is de afkorting van “B-lymphocyte-induced maturation protein-1”. Dat was voor mij een eye opener, dat een eiwit dat

later onder meer een rol speelt bij de differentiatie van lymphocyten in het immuunsysteem, al eerder wordt ingezet voor het op gang brengen van de opeenvolging der generaties.

Maar wat doet Blimp-1? Ondertussen is het omgedoopt tot Prdm1, een familielid van het gen Prdm9 dat we in de meiose tegenkwamen (H5.1). We weten al dat deze familie van eiwitten een stuk (een domein) heeft, met het zogenaamde “zinc finger” motief, dat selectief kan winkelen in de grote zee van **DNA** om aan passende basenvolgorde te binden, en zo kan helpen een gezelschap van doelgenen, in dit geval nodig voor de differentiatie van de primordiale kiemcellen, aan te zetten; ze zijn te beschouwen als **transcriptiefactoren**. Surani en medewerkers “**knockten**” Prdm1 uit om tot het bewijs te komen (box 3). Ondertussen zijn er geheel naar verwachting nog een paar eiwitten/genen ontdekt die eveneens niet gemist kunnen worden bij het ontstaan van de kiembaan. Niet lang geleden (2015, 2017) publiceerde de groep uit Cambridge, dat ook voor het ontstaan van kiemcellen bij de mens PRDM1 niet gemist kan worden.

De primordiale kiemcellen van de mens ontstaan zo vanaf dag 12, dus ook na het begin van de innesteling van de blastocyst op dag 7-8 (fig 43). De specificatie van deze cellen vindt afgemeten aan het stadium van de embryonale ontwikkeling wat later plaats dan bij de muis. Dat maakt het onderzoek er vanwege ethische, morele en wettelijke beperkingen er in Europa niet makkelijker op. Het experimenteel bestuderen van de humane embryonale ontwikkeling rond de implantatie *in vivo* is ook om biologische redenen niet mogelijk. In de UK zijn de grenzen van het onderzoek van de vroege embryologie van de mens vooruit geschoven en kunnen in het IVF lab gegenereerde embryo's (H16) na een soort van *in vitro* kunstmatige implantatie tot dag 14 worden bestudeerd.

De laatste jaren is de belangstelling voor de vroege embryologie van onze eigen soort stijgende, inclusief het ontstaan van de primordiale kiemcellen. Dat heeft sterk te maken met de isolatie van embryonale **pluripotente stamcellen** uit humane blastocysten (fig 43, box 2) en de mogelijkheden voor onderzoekers om *in vitro* hieruit de celtypen waaruit het embryo rond en na de implantatie bestaat, te laten differentiëren, en daarna weer met elkaar te laten samenwerken om de embryonale ontwikkeling “na te maken” en zo beter te leren begrijpen. Dit is de route die Azim Surani en medewerkers namen om de differentiatie van de primordiale kiemcellen bij de mens te bestuderen. Ook bij onze soort wordt de epiblast, “het embryo in engere zin” (fig 43), genoemd als plaats van origine van de kiemcelvoorlopers. De membraan van het amnion is een nog sterkere kandidaat (fig 43). Bijzonderheden van de vroege embryologie van primaten kunnen dit verklaren.

Wanneer de eerste differentiatiestap tot primordiale kiemcel is genomen, en ze kleuren voor PRDM1, zitten ze aan de rand van het embryo, voordat ze al delend beginnen aan hun reis naar de zich ontwikkelende gonade. Bij de muis gebeurt dit vanaf dag 7,5 wanneer er nog maar rond de 40 zijn. Deze gonade heeft dan nog geen geslacht (H8) en ook nog niet wanneer de eerste primordiale kiemcellen daar aankomen. Die differentiatiestap vindt bij de muis plaats in embryo's vanaf 11 dagen oud, bij de mens vanaf de 8^e week van de ontwikkeling (zie H8, wanneer het *SRY* gen tot expressie begint te komen en fig 22). Zowel bij muis als bij mens zijn de eerste primordiale kiemcellen dan al bij de "gonadal ridge" (fig 22) aangekomen. Ze kunnen zelf bewegen maar worden ook voortgestuwd door celbewegingen, mede veroorzaakt worden door de groei van het embryo.

Box 2 Pluripotente stamcellen

Totipotent, daaronder versta je het vermogen van een cel om alle celtypen die na de bevruchting uit een **zygote** ontstaan, te kunnen vormen, inclusief de cellen die aan de basis staan van de embryonale vliezen en het embryonale gedeelte van de placenta. Afhankelijk van de diersoort gaat dit vermogen tijdens of vlak na de klievingsdelingen verloren; in hoofdstuk 13.6.1 wordt er wat meer over verteld. Wanneer het pre implantoire embryo in het **blastocyst** stadium een holte heeft gekregen en zich aan één kant een groepje cellen heeft verzameld dat onvertaald met “**inner cell mass**” wordt aangeduid (fig 43), is voor deze cellen de totipotentie al verleden tijd. Voor de overige omhullende cellen van de trofoblast is dit ook het geval; ze kunnen alleen nog maar bijdragen aan vliezen en placenta (fig 43). Net vóór de implantatie, in de late blastocysten, is er in de “inner cell mass” een groepje cellen te onderscheiden, die de **epiblast** vormen. Bij de muis zijn dit zo'n 10% van de ± 90 cellen die het embryo dan telt (fig 43). Op dit punt van de ontwikkeling zijn we in het stadium van de **pluripotentie** beland. Deze pluripotente cellen kunnen in het bouwplan van het embryo nog alles worden en dus bijdragen aan elk type weefsel of orgaan. Ze zijn onbevooroordeeld in hun keus, en dragen ook bij aan de **kiembaan** (H7). De epiblast cellen functioneren als de **embryonale stamcellen** *in vivo*. Dat de differentiatie in verschillende celtypen ook *in vitro* mogelijk is, is van essentieel belang voor het embryologisch, genetisch en medisch biologisch onderzoek.

De historie van deze ontdekking gaat alweer zo'n kleine 40 jaar terug, en vond ongeveer gelijktijdig in San Francisco, USA (Gail R. Martin) en in Cambridge, UK, plaats. Martin Evans en Matthew Kaufman uit Cambridge haalden er het toptijdschrift Nature mee, en de technieken die zij gebruikten zijn ook hier nog het vermelden waard. Matthew Kaufman is een expert op het gebied van de embryologie van de muis en de atlas die hij daarvan maakte is een standaardwerk voor ontwikkelingsbiologen. Toen ik contact met hem had, in de 2^e helft van de 80-er jaren, was dat zijn voornaamste preoccupatie. Evans

en Kaufman wisten dat rond de implantatie de “inner cell mass” sterk in omvang toeneemt terwijl je in weefselcoupes onder de microscoop nog geen tekenen van celdifferentiatie ziet. Omdat de implantatie onder invloed staat van de steroïd hormonen van het ovarium, besloten ze drachtige vrouwelijke muizen 2,5 dagen na het begin van de bevruchting van de ovaria te ontdoen. Dit vertraagt de implantatie zodat rijpere blastocysten ontstonden die uitgespoeld konden worden. Ze hebben een grotere “inner cell mass” en ook meer epiblast cellen. Voor deze proeven gebruikten de onderzoekers een inteeltlijn, 129 SvE. De embryonale cellen werden op een bedje van huidcellen gezet (een zogenaamde “feeder cell layer”), die door behandeling vooraf met een sterk **mutagene** stof niet meer konden delen. In de uitgroeisels van de embryo's zagen ze bolletjes ontstaan, de epiblasten, die ze konden oogsten en in grote aantallen op de laag voedingscellen verder konden kweken. De test voor pluripotentie die ze gebruikten, was een onderhuidse injectie van zo'n miljoen epiblast cellen in een muis van dezelfde inteeltlijn (de 129 SvE muizen van het Jackson laboratorium in Maine, zie ook box 3). De geïnjecteerde cellen groeiden uit tot **teratocarcinoma's**, tumoren waarin allerlei embryonale weefsels in een chaotisch samenhang zijn te herkennen.

In 1968 publiceerde Richard Gardner dat wanneer je cellen van de “inner cell mass” injecteert in de holte van een blastocyst, deze deelnemen aan de embryonale ontwikkeling (H7). Soort zoekt soort, ze hechten zich en vermengen zich al delend als cellen van de epiblast. Met behulp van genetische vlaggetjes waarin ze te onderscheiden zijn van de ontvangende blastocyst, is dan vast te stellen dat de geïnjecteerde cellen bijdragen aan alle gedifferentieerde celtypes. Er vormt zich een **chimaer** embryo. De twee genotypen dragen meestal ook bij aan de vorming van de kiembaan. Dit is *de test*, de gouden standaard voor pluripotentie. Die vlaggetjes voor het herkennen van de genetische afkomst van de cellen in chimaere muizen waren, toen genetische manipulatie (box 3) nog niet bestond, een heel probleem. Aanvankelijk werd hiervoor in 1975 een muis met een reciproke translocatie, gekenmerkt door een chromosoom met een afwijkende lengte, gebruikt (fig 12). Het onderzoek beperkte zich zo wel tot delende cellen,

waarin m.b.v. een cytogenetische methode (H3.4) het merker chromosoom herkend kon worden. De eerste analyse van dit soort werd door Richard in samenwerking met Charles Ford en Ted Evans in Oxford uitgevoerd. De injectie-chimaer-techniek heeft later de weg geëffend voor nauwkeurige genetische manipulatie. Daarbij wordt gebruik gemaakt van het vermogen van de pluripotente epiblast cellen om *in vitro* in een ongedifferentieerde staat verder gekweekt en genetisch veranderd te kunnen worden. Op de details van de kweekmethoden gaan we hier niet in. De basis van de genetische verandering komt in box 3 aan bod.

Daarnaast heeft het ontrafelen van de genexpressie patronen die met pluripotentie van doen hebben, uiteindelijk geleid tot protocollen waarmee zo ongeveer iedere in een volwassen lichaam gedifferentieerde cel kan worden terug geprogrammeerd tot een stamcel. Hiervoor wordt een cocktail van 4 genen die betrokken zijn bij de regulatie van de transcriptie van een specifieke set van doelgenen (*Oct 4*, *Sox 2*, *Klf4* en *c-Myc*, zie ook H9) verhoogd tot expressie gebracht. De via deze weg gegenereerde stamcel staat bekend als een “induced pluripotent stem cell” (iPSC). Deze iPSC’s vinden momenteel hun weg in het onderzoek (zoek op het Web op organoïden) en in de regeneratieve geneeskunde. De vraag of *in vitro* differentiatie van deze stamcel tot kiembaancel de poort is naar een gegarandeerde vruchtbaarheid voor iedereen, komt aan bod in hoofdstuk 16.7.

Tenslotte nog iets meer over de hiervoor genoemde teratocarcinoma’s. Deze waren al eerder in 1953 op het Jackson laboratorium door Leroy Stevens bij toeval ontdekt toen hij werkte aan de biologische effecten van sigarettenrook. Daarvoor gebruikte hij dezelfde muis inteeltlijn 129. Deze lijn leek bevattelijk voor het ontwikkelen van tumoren in de testis waardoor het orgaan vreselijk kon opzwellen. In deze tumoren zaten naast het resultaat van een chaotische embryonale ontwikkeling ook een soort van embryonale stamcellen, die na transplantatie opnieuw konden uitgroeien tot een tumor.

Zijn ontdekkingen, die het begrip embryonale stamcel beter definieerden, legden Leroy Stevens bij het verwerven van subsidies voor onderzoek geen windeieren. Zo konden we

met een groepje buitenlandse gasten in de zomer van 1980 op zijn lab een kleine cursus “fusie chimaere muizenembryo’s maken” (H7) volgen, omdat er genoeg prepareermicroscopen waren om met 4 buitenlanders te kunnen oefenen, en natuurlijk omdat zijn analist het kon.

Maar waar kwamen deze teratocarcinoma’s vandaan? Nu weten we dat de gonocyten in de foetale muizentestis (H8) nog dicht bij de pluripotente staat zitten: de deur naar de pluripotentie is bij wijze van spreken nog niet met een dubbel slot verzegeld en ze hebben er nog moleculaire kenmerken van. Die moleculaire kenmerken zijn dezelfde als die gevonden worden in pre-implantoire embryo’s en in de epiblast, met de karakteristieke expressie van de genen voor de **transcriptiefactoren** Oct4, Nanog en Sox2 (H9). Zo rond dag 14 van de embryonale ontwikkeling daalt in de gonocyten de expressie van deze genen en gaan de **kiemcellen** in een tijdelijke rust. De teratocarcinoma’s ontstaan dus uit een fout in het programma dat in de mannelijke kiembaan gevolgd moet worden om van een gonocyt een prespermatogonium te worden (H8). Wanneer ze dat niet goed doen, is er een kans op het ontstaan van de voorlopers van testiculaire kiemcelkanker. Hier wordt in hoofdstuk 12.10 nog op teruggekomen.

Box 3 Genetische manipulatie

Niet veel gereedschap ten dienste van genetisch onderzoek spreekt zo tot de verbeelding als genetische manipulatie, genetische modificatie of genetisch “editen”. De laatste term is opgedoken bij de introductie van CRISPR-Cas, een techniek waardoor het doelgericht veranderen van het **genoom** veel praktischer en breder inzetbaar is geworden.

In 1981 verschenen er twee artikelen in respectievelijk Nature en Science, waarin beschreven werd hoe makkelijk vreemd **DNA** wordt opgenomen in het genoom van de grotere mannelijke pronucleus van de **zygote** van de muis (H13.5, fig 42), na inspuiten met een micropipet. Het maakt voor het integratieproces niet uit of het DNA soorteigen is of niet. Voordat het qua positie vrij willekeurig ergens in het muizengenoom wordt opgenomen, worden er in de kern meestal “treintjes” gemaakt van meerdere tot vele kopieën van het geïnjecteerde DNA segment. De integratie is stabiel, komt permanent in alle somatische lichaamscellen en de kiembaan van het zich verder ontwikkelende embryo terecht en wordt uiteindelijk ook via de **gameten** aan de volgende generaties doorgegeven. Meestal komt het geïnjecteerde gen DNA tot expressie maar die kan in opvolgende generaties geleidelijk aan verloren gaan.

We hebben het hier over het genereren van **transgene** muizen, een techniek die later ook bij andere diersoorten werd toegepast. Indertijd was dit een kleine technische maar zeker ook een ethisch-morele revolutie. Zelf ervoer ik een vorm van teleurstelling omdat het mannelijk genoom zo “promiscue” was ten opzichte van “vreemd” DNA (het vrouwelijke zal niet heel anders reageren, maar zie H13.5.2). Ongetwijfeld is dit een gevolg van antropomorf denken. Het ligt voor de hand te veronderstellen dat de aanwezigheid van dubbelstrengs DNA breuken, het integratieproces sterk bevordert. Ze komen tijdens de hele celcyclus van de zygote voor, met een sterke stijging tijdens de S-fase. In de mannelijke pronucleus vinden we meer dubbelstrengs DNA breuken dan in de vrouwelijke (H13.5.2, fig 42). Het ontstaan van deze breuken wijdt men altijd aan een

replicatievork (fig 5) die, omdat er een obstakel voor het DNA polymerase opdoemt, even inhoudt en zo kwetsbaar wordt en gemakkelijk kan breken. Via bijvoorbeeld homologe recombinatie (HRR) en het slordiger “non-homologous end joining” (NHEJ) (H13.5.2, fig 33) herstelmechanisme heeft de zygote mogelijkheden deze breuken te repareren, en bij dit proces kan het “vreemde” DNA worden opgenomen in het genoom.

Velen dachten dat nu alle wegen, van gen analyse tot rappe genetische verbetering open lagen. De soortbarrière was weggevallen en een farmacologische toepassing zoals nagestreefd in de op deze manier genetisch gemanipuleerde en beroemde stier Herman genereerde durfkapitaal. In dit geval ging het om de productie van de ontstekingsremmer lactoferrine in de melk van de dochters, iets dat nooit van de grond gekomen is. In geconserveerde toestand is Herman in Naturalis te Leiden nog steeds te bezichtigen.

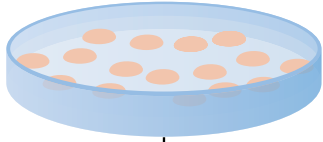
Het echte werk moest toen echter nog komen. Zoals in box 2 vermeld, vond de ontdekking van het *in vitro* houden en vermeerderen van **pluripotente stamcellen** uit de **epiblast** van vroege embryo's in dezelfde periode plaats. Vooral de vroeg-embryonale epiblast cellen van muis inteeltlijn 129 bleken daar erg geschikt voor (box 2). In 1987 werd in een publicatie vanuit de universiteit van Utah (Salt Lake City, USA) met Mario Capecchi als laatste auteur, verslag gedaan van experimenten waaruit bleek dat deze pluripotente embryonale stamcellen (ES cellen genoemd) via **homologe recombinatie** (fig 14) in een voldoende hoge frequentie een aangeboden DNA fragment kunnen “ruilen” met de eigen homologe basenvolgorde volgorde (fig 19). Voor andere celtypen was dit al eerder aangetoond door Oliver Smithies. Omdat toen al bekend was (H7, box 2) dat de *in vitro* gekweekte pluripotente stamcellen, na in de holte van een **blastocyst** te zijn gebracht, volwaardig kunnen bijdragen aan celtypen van de muis, lag de weg naar het blijvend en gecontroleerd veranderen van het genoom in de **kiembaan** open. Voor deze ontdekking heeft Mario Capecchi, samen met Martin Evans en Oliver Smithies, in 2007 de Nobelprijs ontvangen voor fysiologie en medicijnen.

Het uitwisselen van het aangeboden fragment met het chromosomale fragment is vergelijkbaar met **crossing over** met dien verstande dat twee cross overs nu wél bij elkaar in de buurt plaats kunnen vinden (H5.1, fig 15). De lengte van de basenvolgorde-identieke segmenten (fig 19) waarin dit gebeurt is belangrijk: niet te kort, dus minstens een paar kb lang en “mismatches” (base verschillen, H5.1) moeten vermeden worden. Vanwege hun geringe genetische variatie zijn de inteeltlijnen van de muis een geschikt uitgangspunt.

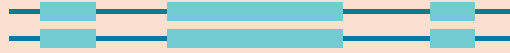
Het beschrijven van de omringende technieken en handigheidjes om de cellen met een succesvolle integratie te isoleren en te karakteriseren gaat hier wat ver. De homologe recombinatie vindt doorgaans plaats in één enkel **gen of locus**, en de stamcel is daarna dus **heterozygoot** voor de genetische verandering. Technisch kan op het niveau van het gen iedere gewenste verandering tot stand gebracht worden, van een verandering in een enkele base tot het aanbrengen van deleties of inserties (tabel 3). In het jargon zijn er twee hoofdklassen: **knockout** betekent dat het genproduct niet meer functioneel is; **knockin** dat er sprake is van een geheel veranderde of geheel nieuwe (meestal verwant, bijvoorbeeld humane) genfunctie op de plaats van keuze. Zoals eerder in hoofdstuk 4 is aangegeven zijn de meeste toepassingen gericht op genetisch analyses zoals **genetische dissectie** van een kenmerk, en het ambitieuze project om van elk gen van de muis een knockout te maken (H4). Natuurlijk buigen een dierexperimentencommissie en een commissie genetische modificatie zich over voorstellen voor dergelijke experimenten. De afweging tussen biologisch inzicht en ethiek hoeft niet makkelijk te zijn. De wetgeving hierover en zo de omgang met deze afweging verschilt echter per land.

Een verfijning van de techniek, die het mogelijk maakt de genetische modificatie, hier meestal een knockout, specifiek in een bepaald celtype aan te brengen, kan hieraan tegemoet komen: het genetische defect is niet in iedere cel aanwezig (alleen maar in het celtype dat men wil bestuderen). Voor het onderzoek aan de kiembaan is dit een mooie toevoeging. Ook wanneer de knockout in **homozygote** toestand lethaal is in de

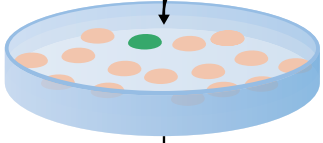
Stamcellen



Wild-type locus



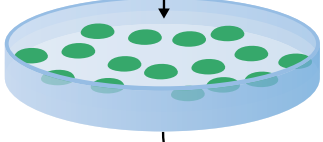
Electroporatie



Construct met selectiemarker



Selectie



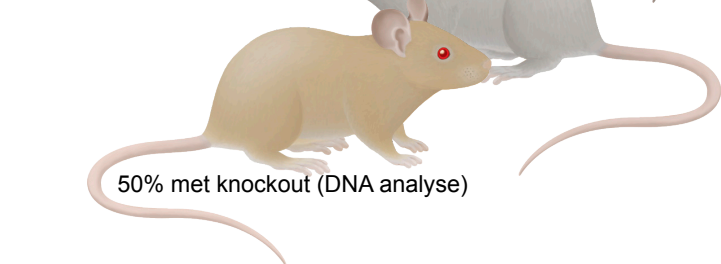
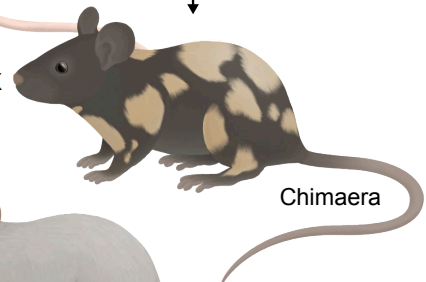
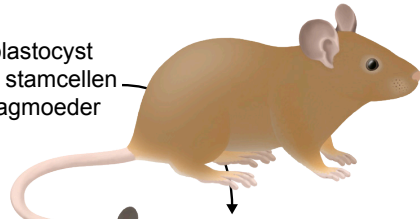
Recombinant locus (heterozygoot)



129Ola (beige)
B6 (zwart)



Implantatie blastocyst
met transgene stamcellen
in agouti draagmoeder



50% met knockout (DNA analyse)

FIG 19

Vereenvoudigde stapsgewijze voorstelling van genetische manipulatie in de **kiembaan** van de muis. Wanneer het de bedoeling is de functie van een **gen** uit te schakelen spreekt men van een **knockout**, wanneer er een wijziging wordt aangebracht met als doel het gen en zijn product nader te bestuderen, spreekt men van een **knockin**. In de te selecteren gemanipuleerde stamcel kolonies van de 129 inteeltlijn zal één allel zijn uitgeschakeld (+/-). Deze cellen worden in de holte van een C57BL6 ("black six", B6) **blastocyst** gespoten (fig 43). In principe kan iedere vrouwelijke muis draagmoeder zijn, hier is gekozen voor een dier met wildtype vachtkleur (agouti). Uit het 129 deel van de **chimaere** muis worden bij terugkruisen met 129 muizen, 129 jongen geboren waarvan 50% heterozygoot is voor de knockout of knockin (de 129 genetische gemanipuleerde stamcel is heterozygoot (+/-)). Als regel start daarna een uitkruisprogramma, bijvoorbeeld met de inteeltlijn B6.

embryonale fase, wat bijvoorbeeld bij genen die betrokken zijn bij het repareren van DNA relatief vaak voorkomt, is dit de weg.

Deze technologie, Cre/lox genoemd, is gebaseerd op gereedschap dat door een bacteriofaag (een bacterieel virus, P1 genoemd) wordt gebruikt om in een circulaire vorm te kunnen bestaan. Een gen van P1 codeert voor het recombinase Cre, dat specifiek is voor, en kan binden aan twee identieke 34 basen motieven in het DNA van de faag, loxP genoemd (fig 20). In 1994 werd de weg geplaveid voor de toepassing van Cre/lox bij genetische manipulatie van de muis. De eerste stap bestaat eruit om met behulp van stamceltechnologie (als hiervoor) het Cre gen onder controle te brengen van een celtypische specifieke **promotor**, zodat er alleen expressie van het recombinase is in dat bepaalde celtypische. In de tweede stap worden via dezelfde homologe recombinatie technologie twee loxP sequenties aangebracht in/rond het te invalideren gen. Via kruisen worden de twee

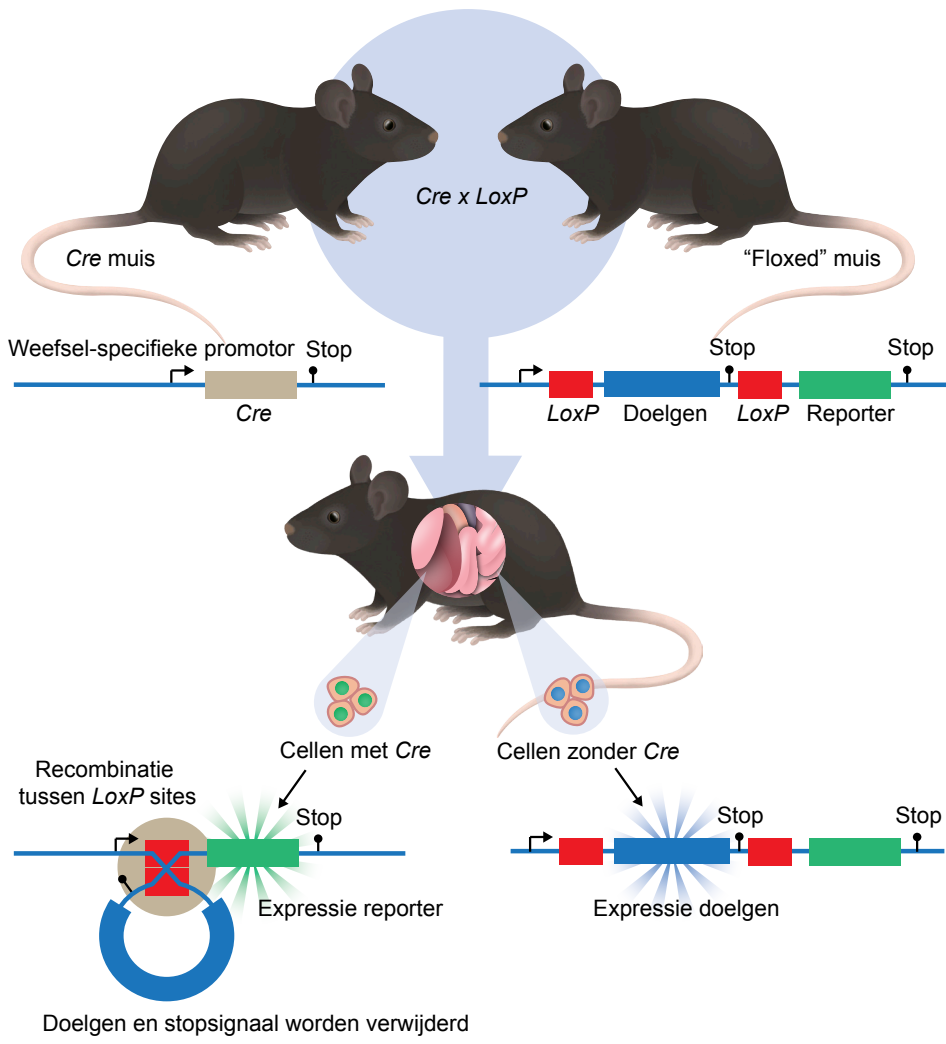


FIG 20

De beste techniek om per celtype een **gen** te inactiveren. De **promotor** van een gen dat alleen in dat type cel tot expressie komt functioneert als poortwachter. Bij een toepassing in de **kiembaan** kan men sturen op een gen dat bijvoorbeeld alleen in spermatogonia tot expressie komt, alleen in **meiotische** spermatocyten of een gen dat alleen na de meiose in de spermatiden tot expressie komt. Muizen die **transgeen** zijn voor het *Cre* gen dat gefuseerd is met die cel specifieke promotor ("*Cre/+*") worden gekruist met muizen met de twee *loxP* sequenties op strategische posities om/in het gen, meestal een invaliderend deel ervan, te deleteren. De *loxP* muis, die ook via genetische manipulatie is verkregen, moet daar wel **homozygoot** voor zijn.

genetisch gemanipuleerde genomen met elkaar in een cel gecombineerd waarbij de twee *loxP* motieven homozygoot aanwezig moeten zijn (fig 20). Het uitknocken van het gen is het gevolg van de Cre gestuurde recombinatie tussen de twee "*loxP* sites" (fig 20). Muizenlijnen met een goede celtype specifieke *Cre* insertie zijn zeer waardevolle onderzoeksinstrumenten en dus gewild.

Deze elegante meertrapstechnologie heeft begrijpelijkerwijze nooit zo massief het nieuws gehaald als CRISPR-Cas9, de techniek waarvoor de pioniers Emmanuelle Charpentier en Jennifer Doudna in 2020 werden beloond met de Nobelprijs voor de scheikunde. De ontstaansgeschiedenis van deze nieuwste loot aan de genetische modificatie stamboom staat uitgebreid beschreven in het gepopulariseerd verslag: Jennifer Doudna en Samuel Sternberg "A CRACK IN CREATION, the new power to control evolution" (2018).

Weer worden intrigerende ontdekkingen uit de microbiologie gecombineerd met de wens sneller genetisch in te kunnen grijpen dan met klassieke veredeling en fokkerijmethoden mogelijk is. Ook de Wageningse hoogleraar microbiologie John van der Oost,

die aan het begin heeft gestaan van de ontdekkingen, die de CRISPR-Cas technologie (fig 21) toepasbaar hebben gemaakt, speelt een rol in het boek van Doudna en Sternberg.

CRISPR-Cas blijkt in bacteriën te zijn ontstaan als afweermechanisme tegen virale infecties, compleet met een in het erfelijk materiaal vastgelegde geheugenbibliotheek (de zogeheten “clustered regularly interspaced short palindromic repeats” sequenties, in Utrecht en Alicante tot het acronym CRISPR ingekort). Zo kan het DNA van binnendringende bacteriofagen snel herkend en gericht stuk geknipt worden met het Cas enzym (een **RNA** gestuurd DNA endonuclease). De grote kracht van de CRISPR-Cas machine-rie is de hoge mate van locatie specificiteit waarmee een knip in DNA kan worden aan-gebracht. Maar het blijft verbazingwekkend. Die specificiteit is afhankelijk van het zoge-naamde “guide RNA” een stukje van minimaal 20 basen dat via RNA-DNA basenparing een voldoende accurate aanwijzing is voor de positiebepaling in het genoom (fig 21). Het Cas enzym knipt de dubbelstrengs DNA helix met een ongekeerde nauwkeurigheid, op een ten opzichte van het gepaarde guide RNA specifiek bepaalde plek.

Al snel, in 2014, werd duidelijk dat de zygote van de muis op deze manier heel gericht genetisch veranderd kan worden en de omweg via stamcellen niet meer nodig is. Ver-geleken met de stamceltechnieken zijn snelheid en kosten, dierenwelzijn en een breed spectrum aan mogelijkheden pluspunten. Maar zoals in een review uit 2017 vanuit het NKI duidelijk is, moet per gewenste uitkomst bekeken worden welke techniek “naar Rome leidt”. De belangrijkste reden hiervoor is, dat bij de stand van de CRISPR-Cas techniek op dat moment een dubbelstrengs DNA breuk het uitgangspunt van de genetische ver-andering is. De zygote is geen erg toegankelijk celsysteem voor onderzoek naar DNA repair, maar wel is duidelijk dat deze cel vele nog niet doorgronde bijzonderheden kent (H13.5.2): de moleculaire details van de reparatie van de breuk zijn niet volledig in beeld. Ook veranderen die tijdens de celcyclus van de zygote. Om meer sturing te krijgen en met een specifieke uitkomst van de reparatie voor ogen, wordt een enkelstrengs DNA

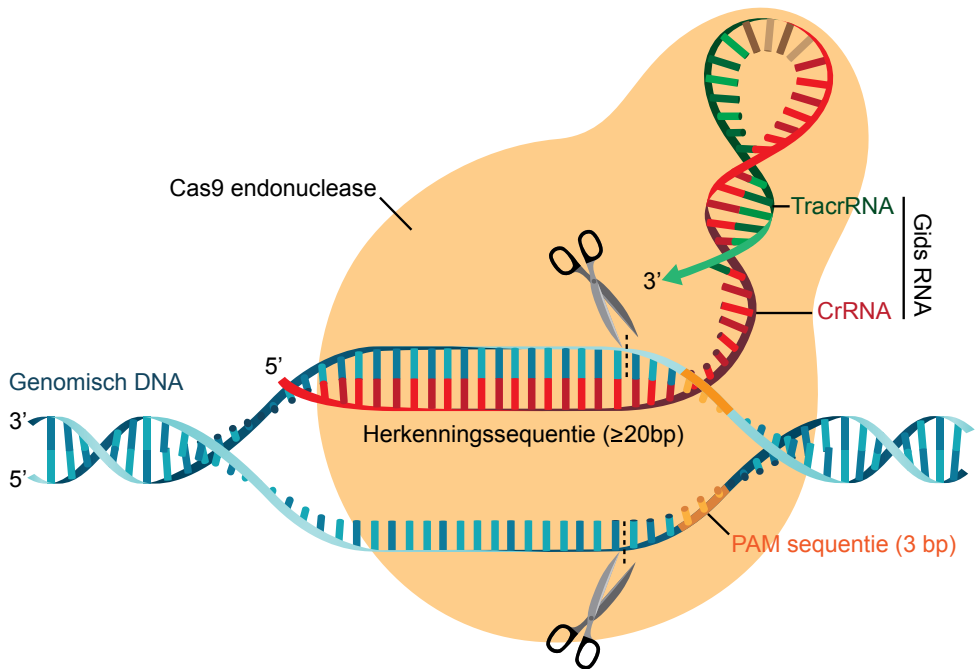


FIG 21

Illustratie van het basisprincipe van de 20 basenpaar specifieke herkenning (genoeg voor het benaderen van in wezen iedere **genomische** locatie) en de manier waarop het CasRNA complex tot op de base nauwkeurig een dubbelstrengs breuk aan kan brengen. Het Cr en TracrDNA komen uit het bacteriële systeem, de herkenningsequentie volgt basenvolgorde van het te manipuleren genoom van de “gastcel”. De PAM site, NGG is genomisch (N kan iedere base voorstellen). Deze komen ook in de buurt van de doellocatie frequent genoeg voor om een onderzoeker niet in zijn plannen te hinderen.

“template” toegevoegd met homologie tot de DNA regio waarin de breuk is aangebracht en met de gewenste basenvolgorde op de correcte positie.

Vanaf zo ongeveer 2015 verschijnen er publicaties waarin de CRISPR-Cas technologie wordt toegepast op zygoten van de mens om defecte genen te repareren. De meerderheid stamt uit Oost-Azië, en dan vooral uit China. In de regel worden de mysteries van de DNA repair in de zygote als een black box behandeld, wat weer leidt tot reacties van DNA repair specialisten uit bijvoorbeeld de USA, die aangeven dat de gevonden uitkomst biologisch eigenlijk niet mogelijk is, het mysterie verder vergrotend.

Gestimuleerd door de tot nakomelingschap leidende experimenten van Dr Jiankui He, waarvoor hij eind 2019 tot 3 jaar cel is veroordeeld, is een toekomstbeeld van door CRISPR-Cas mogelijk gemaakte kiembaanmodificatie bij de mens vanuit het Nederlandse ART veld in de kwaliteitskranten verschenen. Dat lijkt nu prematuur. Duidelijk is dat een dubbelstrengs breuk in de zygote geen risicovrij begin is van een mutatie correctie. Hier wordt nu meer onderzoek aan verricht. Onderzoekers zijn vooral geïnteresseerd in de zogenaamde “off target” effecten, hoe onfeilbaar is die postcode van 20 basen, en zijn nieuwsgierig naar de variatie in toedracht rond de DNA herstelwerkzaamheden als gevolg van de door Cas9 bewerkstelligde dubbelstrengs breuk. Beide worden gevonden. Voor de Europese ART gemeenschap heeft Benjamin Davis uit Oxford, actief onderzoeker bij de muis op dit gebied, de humane situatie geanalyseerd voor de ESHRE 2019, het jaarlijkse grote aan kunstmatige voortplantingstechnieken gewijde internationale congres in Europa. Een update van zijn samenvatting werd door hem voor de verzamelde Nederlandse IVF biologen in een redelijk duizelingwekkende voordracht begin 2020 in Zeist gepresenteerd. Al eerder en ook uit zijn proeven bij de muis bleek, dat wanneer het Cas enzym nog in tenminste het 2-cel stadium actief is, er soms muizen ontstaan die **mozaïek** zijn voor de aangebrachte mutatie. Een ander aandachtspunt is dat CRISPR-Cas het mutante te repareren **allel** en het wildtype gezonde allel vaak niet goed kan

onderscheiden. Hiervoor is nodig dat in de DNA basenvolgorde die gebruikt wordt om het “guide RNA” (fig 21) te ontwerpen, er voldoende verschil zit tussen het maternale en paternale allel om één van de twee selectief te benaderen. Wanneer dit niet mogelijk is, kan de eigenlijk overbodig aangebrachte dubbelstrengs breuk in het gezonde allel bij onnauwkeurige reparatie (H13.5.2) een defect eiwit tot gevolg hebben. De “take home message” van Benjamin Davis was: het is nog niet veilig (zie ook H18.2) maar de kans dat het dat wordt, wordt wel groter. Een dubbelstrengs DNA breuk zou bijvoorbeeld vermeden kunnen worden door gebruik te maken van het gereedschap van actieve **retrotransposons** (H2.3.3, fig 10). Wanneer het om het invoeren van een enkele baseverandering gaat bestaan er “base editors”, voor C naar T en voor A naar G. Een andere recente ontwikkeling is die van de zogenaamde “epigenome editors”. Dit zijn enzymen waarmee je de methylatiestatus van DNA (fig 11) of de PTMs van histonen (H2.3.2, tabel 1) kan veranderen en zo de **transcriptie** van een gen. Dit is (nog) niet de plek om hier verder op in te gaan. Een andere bottleneck blijft: rijpe eicellen en zygoten van goede kwaliteit zijn kostbaar, soms erg kostbaar. Steeds zal de uitkomst van de reparatie later in het pre implantatie stadium gecontroleerd moeten worden, waarbij de mogelijkheid van een mozaïek een probleem blijft. Of cureren beter is dan tegen de mutatie selecteren komt in hoofdstuk 18 verder aan bod.

De ontwikkeling van de embryonale gonade

Al in de begintijd van de **cytogenetica** bij de mens, vanaf het eind van de jaren 50 (H3.4), wees alles erop dat het Y chromosoom te maken heeft met het ontstaan van de testis. De aanwezigheid van een Y chromosoom is bepalend en het aantal X **chromosomen** doet er niet toe. Ook bij de muis zijn XXY individuen man en XO individuen vrouw.

Van meet af aan, zo in de jaren 70 en 80, is er een soort van postulaat geweest, inhoudende dat bij zoogdieren één enkel **gen** verantwoordelijk is voor het ontstaan van de testis. In de woorden van die tijd werd de ontwikkeling tot ovarium geacht een soort van autonoom proces te zijn (de “default pathway”), het basispatroon, waarvan het embryo slechts kon worden afgehouden door ingrijpen van het Y chromosoom. Zonder **foetale** gonade is de ontwikkeling vrouwelijk, zoals al in 1947 werd aangetoond. De hormonale aspecten van de ontwikkeling van de afvoergangen van de gonade en de uiterlijke geslachtskenmerken vallen buiten het bestek van dit boek

De jacht naar dit “mannelijkheidsgen” op het Y chromosoom is jaren lang “hot” geweest. Er was wel eens een kandidaat, maar om het bewijs te leveren moet het gen, wanneer het in een kern van de zygote wordt gebracht en in een chromosoom wordt opgenomen, een mannetje opleveren, ook als de zaadcel X dragend is (box 3, fig 42). **Mutaties** in dit gen kunnen leiden tot steriele XY vrouwen. Ook zeldzame mannen met twee X chromosomen, die net als Klinefelter XXY mannen (H3.4) steriel zijn, zijn dan interessant onderzoeksmateriaal. Bovendien verwacht je dat het gen in de evolutie van zoogdieren qua functie geconserveerd is; in het belangrijkste domein van het uiteindelijk het geslacht van de gonade bepalende eiwit, verschillen mens en chimpansee maar in één aminozuur. Toen de analyse van **DNA** in de jaren 80 goed op gang kwam, opende dit (door gebruik te maken van deze geslachtsdifferentiatie mutanten), bij muis en mens de weg naar het isoleren van een kandidaat gen, dat in het muizenmodel getest kon

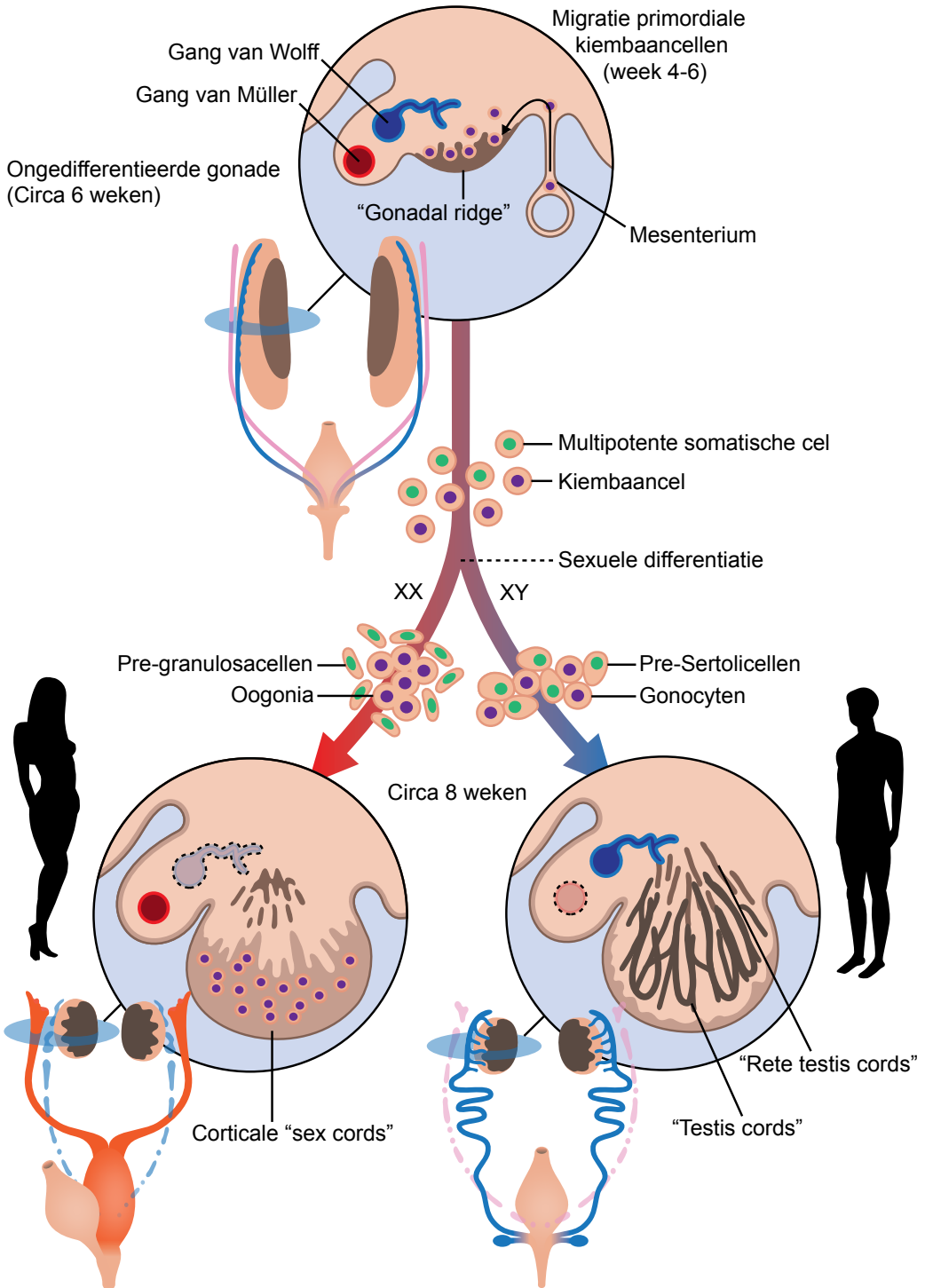


FIG 22

Schematische weergaven van de ontwikkeling van de **embryonale** gonade bij de mens met de minimale leeftijden post conceptie. De seksuele differentiatie van de gonade start na 6-7 weken als gevolg van de expressie van SRY die tijdelijk is. De eerste **primordiale kiemcellen** zijn dan al bij de “gonadal ridge” aangekomen. De aanleg van de afvoergangen is voor beide geslachten aanwezig. Na de differentiatie van de gonade moet een van de twee in regressie, voor het vrouwelijke geslacht de aanleg van de gang van Wolff en voor het mannelijke geslacht de gang van Müller. De snelle overgang van de **kiemcellen** naar de **meiose** in het ovarium vindt bij de muis veel synchroner plaats dan bij de mens. Die strakkere regie is ook in de embryonaal/**foetale** testis te bespeuren, bij de muis is er een tijdelijke **mitose** stop van de kiemcellen, die bij de mens lek is. De rete testis buisjes zijn de aanleg van het afvoerende systeem van de testis.

worden. Dit gen, *Sry* genoemd (bij mens als *SRY* geschreven), werd in 1990 vanuit Londen voor zowel mens als muis in *Nature* ten doop gehouden. De genetisch gemanipuleerde XX muis die man werd verscheen een jaar later ook in *Nature*. Het inserteren van het *Sry* gen in het DNA van de zygote ging in die dagen nog heel primitief. Het betreffende DNA fragmentje werd in een groot aantal kopieën met behulp van een micromanipulator in de mannelijke pronucleus (fig 42) van een muizenzygote gespoten. Wanneer er ergens in een chromosoom een dubbelstrengs DNA breuk optreedt, heeft zo'n stukje DNA de kans om in het genomische DNA van de cel opgenomen te worden, meeliftend op de DNA herstelsystemen van de zygote (H13.5.2, box 3).

Sry blijkt een tamelijk apart gen te zijn, het heeft een bijzonder DNA bindend motief, dat functioneel binnen de zoogdieren bewaard is gebleven. Bij de muis komt het slechts over een betrekkelijk korte periode in de zich ontwikkelende gonade (fig 22) tot expressie. Bij de muis vanaf 10,5 dagen, met een piek tussen 11 en 11,5 dagen waarna het weer verdwijnt. Bij de mens komt het 42 dagen na de bevruchting op en daalt het vanaf 53 dagen. *Sry* is een **transcriptiefactor** van een bepaalde klasse. Het echte werk voor de ontwikkeling van de testis wordt opgeknapt door een ander lid van dezelfde familie van Sox eiwitten (*Sox9*) dat door *Sry* wordt gereguleerd. *Sry* is de founding father van deze 20 koppige familie. Op zijn beurt verhoogt *Sox9* de expressie van de voor dit proces benodigde genen: *Sox9* moet “aan” blijven staan wil het met de geslachtsdifferentiatie op het niveau van de gonade in orde komen.

Een embryonale gonade die nog twee kanten op kan, wordt bipotentieel genoemd. Naast de arriverende **kiemcellen**, bestaat deze gonade uit 3 types cellijnen: a) de cellen die de kiemcellen direct gaan ondersteunen en er intiem contact mee hebben, b) de cellen die de geslachtshormonen kunnen produceren, en c) de algemene structuur gevende cellen. De cellen, die de kiemcellen direct gaan ondersteunen, bepalen door de expressie van *Sry* en *Sox9* het geslacht van de gonade. Wanneer deze in de richting van een testis differentiëren, ontstaan er eerst pre-Sertolicellen en daaruit Sertolicellen (H12.2, H12.4, fig 22). In de vrouwelijke differentiatie naar het ovarium ontwikkelen deze cellen zich tot pre- of foetale granulosa cellen en later tot de granulosa cellen, die te vinden zijn in de primordiale follikels (de **oogenese**, H11.1, fig 28). Het aanzetten van het *Sry/SRY* gen leidt dus tot de differentiatie van Sertolicellen. Dat dit over een betrekkelijk korte periode van bij de muis een halve dag of iets meer gebeurt, blijft bijzonder en maakt het tot een gevoelig proces. Bij het begin van de geslachtsdifferentiatie bij de muis, in 11 dagen oude embryo's, zijn er volgens de literatuur zo rond de 20.000 kiemcellen aanwezig. Dit soort van schattingen zijn door een ruim betrouwbaarheidsinterval omgeven. De competentie om uiteindelijk toch nog een pre-granulosa cel te kunnen worden blijft twee dagen langer bestaan. De kiemcellen, die in het vrouwelijke traject belanden delen vlijtig door en vormen de pool van oogoniën die aan de basis staat van de potentiële voorraad eicellen voor het hele leven (H11.1, fig 28). De kiemcellen, die op het pad van de spermatogenese worden gezet delen ook en krijgen de naam gonocyt.

Het eerste inzicht naar de dominante positie van de pre-Sertolicel voor de aanleg van de testis kwam uit het bestuderen van de gonade ontwikkeling van **chimaere** muizen (H7): werk van Paul Burgoyne in het laboratorium van Ann McLaren, de "grand old lady" van de vroege embryologie in Engeland, in de jaren 70-90. Wanneer je chimaere muizen maakt, ken je de **sex chromosomen** van de te fuseren embryo's niet. Statistisch krijg je 25% XX/XX, 25% XY/XY en 50% XX/XY, XY/XX. Bij het op het uiterlijk seksen van deze muizen valt op, dat er meer mannetjes dan vrouwtjes worden geboren, en dat er maar weinig muizen uiterlijk iets van een intersex hebben. Het lijkt erop dat de XY cellijn, door het vroeg aan gaan van het *Sry* gen waardoor de pre-Sertolicellen ontstaan, het lot van de embryonale gonade grotendeels bepaalt. In de chimaere XX/XY mannetjes waren de Sertolicellen in grote meerderheid XY. Tegelijkertijd wordt het moleculaire apparaat nodig voor het ontstaan van een ovarium geremd. De voorlopers van de testosteron producerende Leydigcellen kunnen zowel XX als XY zijn, en ook voor de kiemcellen is dat zo. Wanneer door de genetische achtergrond van de Y, deze tijdens de embryonale ontwikkeling laat "aan" gaat en daardoor de testisontwikkeling wordt vertraagd, *i.c.*

voor eeuwig uitgesteld, kan er een ovarium ontstaan met XY eicellen. Dit laatste gebeurt in een uitkruisprogramma van bijvoorbeeld *Mus poschiavinus* wilde muizen (uit Italië, de mannetjes) en vrouwtjes van de bekende C57BL6 (B6) inteeltlijn. Door beginnend bij de **F1** mannen terug te kruisen op B6 komt het POS Y chromosoom in deze genetische achtergrond terecht. Het komt ook omdat de Sry transcriptiefactor van *Mus poschiavinus* niet goed overweg kan met het Sox9 gen van B6, de samenwerking verloopt nogal variabel. Nu werd het mogelijk XY eicellen systematisch te bestuderen. Ik moest er aan denken toen ik in de afgelopen periode onderzoekers-hersenspinsels langs zag komen, waarin de mogelijkheid van een genetisch eigen kind voor een liefdespaar met partners van hetzelfde geslacht werd geopperd (H16.7). Wanneer de partners man zijn, zou dan een via de stamceltechnologie (box 2) verkregen XY eicel een optie zijn?

Recentelijk (2017, 2021) werd er door een Canadese groep volop onderzoek gedaan naar die XY eicellen van de muis, met een combinatie van moleculaire en microscopie technieken. De meiose en dan vooral de tweede meiotische deling verloopt niet lekker, en de vroeg embryonale ontwikkeling daarna catastrofaal. De afwezigheid van een **cross over** tussen de X en de Y, waardoor ze tijdens de eerste meiotische deling los liggen, hebben ze ook waargenomen. April 1980 keek ik op het Jackson lab (Maine) naar een XY eicel uit het *Mus poschiavinus* B6 kruisingsprogramma. De eicel bevond zich in de metafase van de eerste meiotische deling, de X en Y lagen los, maar dat was niet nieuw en in 1977 al eerder, toen de Italiaanse muizen nog helemaal niet in beeld waren, vanuit de MRC “radiobiology unit” Harwell in een zeldzaam XX/XY chimaer vrouwtje beschreven.

Hoe gaat de gonade ontwikkeling vanaf het moment van de geslachtskeuze (voor de muis vanaf 11 dagen, voor mens vanaf week 8, zie fig 22) nu verder? In de vrouwelijke route is de hoeveelheid celproliferatie van de ondersteunende pre-granulosacellen beperkt, dit in tegenstelling tot het gedrag van de mannelijke pre-Sertolicellen. De oogonia organiseren zich aan de rand van de gonade en vormen verbindingen met elkaar, die syncytia of cysten worden genoemd (fig 22). Later, bij de vorming van de primordiale follikels worden deze afgebroken (H11.1). Vanaf een leeftijd van 12,5 dag kan de meiose op geleide van vitamine A opgestart worden. Bij de muis is dit een behoorlijk synchroon proces, in tegenstelling tot de situatie bij de mens. Daar start de meiose na 12 weken maar dit proces is alles behalve nauwkeurig gesynchroniseerd (zie ook H11.1) en een groep oogonia lijkt eraan te ontsnappen.

Wanneer de pre-Sertolicellen in 11 dagen oude embryo's van de muis beginnen te domineren, beginnen er een dag later testisbuisjes te ontstaan die de kiemcellen bevatten (fig 22). Deze

gonocyten vermenigvuldigen zich tot 13,5 dagen exponentieel maar gaan een paar dagen later in delingsrust. Ze zitten in het midden van de testisbuis en gaan kort na de geboorte naar de wand. Deze verandering in locatie markeert de overgang naar de cellen, die de spermatogenese op kunnen starten, de stamcellen.

Bij de ontwikkeling van de humane testis zijn er na 11 weken volledig ontwikkelde testisbuisjes met gonocyten (fig 22) die vanaf die tijd geleidelijk naar de wand kruipen. Dan worden ze prespermatogonia genoemd en hebben dan al de neiging om na een deling elkaar vast te houden via een **cytoplasmabruggetje**: de celdeling wordt net niet helemaal afgemaakt en zo ontstaan ook hier syncytia. Dit is een eigenschap van de spermatogenese die erg belangrijk is en in hoofdstuk 12 niet wordt vergeten. Net als bij de muis zijn de kiemcellen die zich niet in de buisjes vestigen door naar de wand te gaan verloren en gaan in **apoptose**. In muizenfoeten stoppen de gonocyten na 15,5 dagen helemaal met delen en dit proces komt pas kort na de geboorte weer op gang. Bij de mens vindt deze ontwikkeling over een veel langere periode plaats en is er altijd wel een populatie van prespermatogonia die deelt.

De eerst maanden na de geboorte zijn er in het lumen van de buisjes nog steeds gonocyten te zien die dan nog steeds over kunnen gaan in prespermatogonia. Tijdens dit hele proces behouden de kiemcellen sommige kenmerken van een **pluripotente stamcel** (Box 2): het verlies van de **pluripotentie** voltrekt zich heterogeen en gaat heel geleidelijk (zie ook H12.10).

Het “resetten” van chromatine in de kiembaan

De aaneenschakeling van de generaties wordt vaak verbeeld als een ketting, een veelgebruikte metafoor voor een groot wonder. Het **embryonale** ontstaan van een nieuwe generatie **kiemcellen** kun je zien als de nauwe hals van een zandloper. Maar heel weinig cellen krijgen van hun omgeving het bericht, dat ze zich moeten ontwikkelen tot **primordiale kiemcellen** (H7).

Bij hun vorming onderscheiden de primordiale kiemcellen zich van de hun omgevende cellen, omdat de differentiatie in somatische embryonale celtypen geblokkeerd is en ze zo op tijd uit de mainstream van de **somatische** cellulaire ontwikkeling stappen. Bij zoogdieren gebeurt dit “ontsnappen” relatief laat en bij de mens net weer wat later dan bij de muis (H7, fig 43).

Na de lotsbestemming als primordiale kiemcel wordt het chromatine “gereset”. Dit proces is voltooid wanneer de primordiale kiemcellen aangekomen zijn in de embryonale gonade. Voorafgaand aan deze algehele “reset” is er een eerste reset die plaats vindt in het nog niet geïmplanterde embryo. Deze stap is nodig om van de chromatine structuren, die inherent zijn aan de vorming van eicellen en zaadcellen, over te stappen op het chromatine, dat de ontwikkeling van het pre implantatie embryo mogelijk maakt. De vroege embryonale “reset” leidt tot het bereiken van **totipotentie** en **pluripotentie** (box 2) en is in het **blastocyst** stadium voltooid (fig 43).

Nooit is er binnen een cel een groter verschil in de structuur van het chromatine te vinden dan tussen de twee kernen, de pronucleï van de **zygote** (fig 42). Dit komt uitgebreider aan bod bij de bevruchting (H13). Het “gelijker” maken van het chromatine van de chromosomen van de vader en de moeder is een ander heel belangrijk aspect van de eerste “reset” van het chromatine. Het duurt ook eventjes, tot aan het **epiblast** stadium (fig 43) voordat het maternale en paternale chromatine zo goed als “gelijkwaardig” is geworden.

De chromatine parameter CpG methylatie (fig 11) is als eerste gebruikt om het “resetten” tijdens de ontwikkeling van het pre implantoire embryo zichtbaar te maken. Dat werd mogelijk nadat er in de jaren 80 van de vorige eeuw een antilichaam tegen de gemethyleerde vorm van C(ytosine) beschikbaar kwam en tegelijkertijd de kleuring van cellen via **immunofluorescentie** methoden beter toepasbaar werd. Toen de eerste bevindingen in de 2^e helft van de jaren 80 vanuit de Medical Research Council “mammalian development unit” in Londen in de literatuur verschenen, was dat een grote eyeopener. Modernere op **NGS** gebaseerde technieken die op basenpaar niveau de CpG methylatie uitlezen, hebben later het beeld alleen maar bevestigd (fig 23). De eerste gedachte bij het zien van de grafieken van Marilyn Monk en haar mede onderzoekers was, dat tot aan dat blastocyst stadium, er vooral sprake is van het in stelling brengen van de mogelijkheden voor de embryonale ontwikkeling rond en na de implantatie. Observaties uit het op de IVF gerichte onderzoek en de praktijk ervan (H16.3.1 en H16.3.2) ondersteunen dit.

Bij de eerste “reset” verliest zowel het **DNA** van de zaadcel als dat van de eicel de methylgroep aan de C (fig 11, 23). Voor het paternale DNA is dat een actief proces, dat meteen na de **gameet**-fusie begint, één van de vele taken van de eicel. Dit proces is nog steeds met mysteries omgeven, maar wel is duidelijk dat DNA herstelsystemen er een rol bij spelen (BER, fig 33). Voor het vrouwelijke **genoom** lijkt het een kwestie van verdunnen van de methylatiegraad te zijn. Tijdens de semi-conservatieve DNA replicatie (H2.2.2, fig 5) wordt daarbij “vergeten” om wanneer een CpG en een GpC uit elkaar gaan, op de nieuw te incorporeren C's een methylgroep aan te brengen. In de blastocyst zijn de methylatie niveaus in beide genomen op een paar uitzonderingen na gelijk. Van deze uitzonderingen zijn de bij **genomische imprinting** betrokken “imprint control regions” (ICRs) de bekendste (H10, fig 27).

Deze DNA gebieden zijn “reset-resistent” en blijven gemethyleerd op de CpG. De genom-brede demethylatie heeft in het pre implantoire embryo geen vat op de ICRs: de eicel heeft hier het gereedschap voor (fig 24).

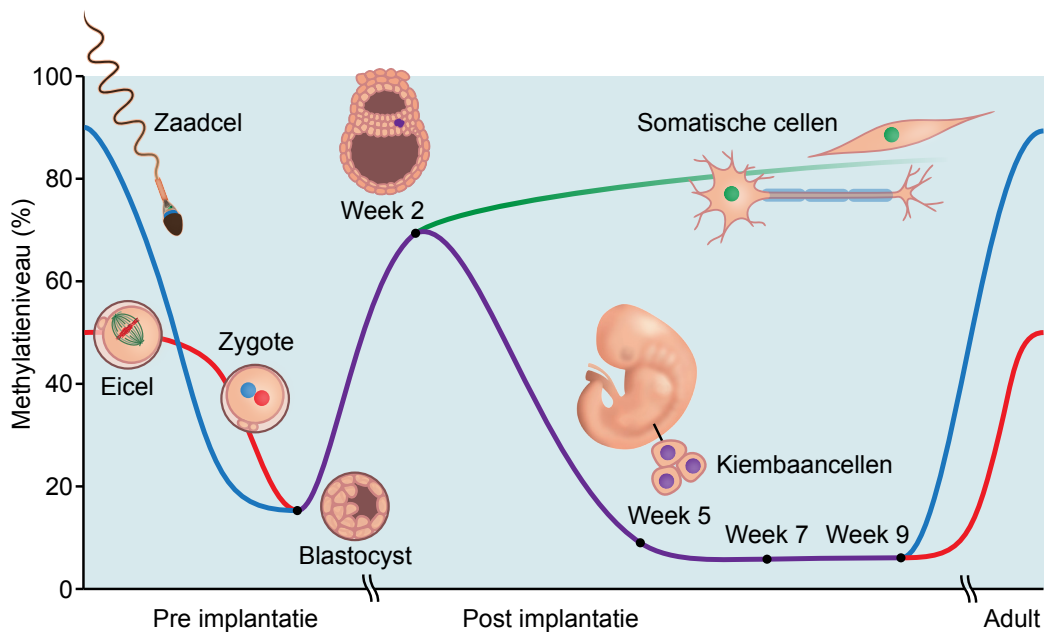


FIG 23

In de literatuur wordt de methylatiegraad van cytosine (meestal in een CpG dimeer, fig 11) gebruikt om het “resetten” van het **chromatine** in de **kiembaan** aanschouwelijk te maken. De vrouwelijke en mannelijke **gameet** zijn hierin opvallend verschillend. In de **blastocyst** is het globale methylatieniveau sterk afgenomen en gelijk. Dit is onderdeel van, en symboliseert de eerste “reset”. Vervolgens treedt bij het opstarten van de **embryonale** ontwikkeling een snelle remethylatie op, hetgeen een dynamisch proces is. Volgend op de specificatie van de **primordiale kiemcellen** wordt dit proces omgedraaid naar een nog lager methylatieniveau. We spreken hierbij van de tweede “reset” in de kiembaan. Het vrouwelijke **genoom** is rood, het mannelijke blauw. Deze figuur is geïnspireerd op de situatie bij de mens.

Een heel mooi voorbeeld daarvan is de beschikbaarheid van een voorraadje **mRNA** van het maternale effect **gen** *Trim28*. Het door dit gen gecodeerde eiwit is “matchmaker” in een ingewikkeld complex van eiwitten met diverse taken op chromatine gebied, waaronder het beschermen van de ICRs tegen demethylatie (fig 24, zie ook H13.5.3).

Het bestaat uit een cocktail van **transcriptiefactoren**, “chromatin writers” en “chromatin readers” (H2.3.2, fig 24).

Ook bij de mens wordt het paternale DNA in de zygoote actief gedemethyleerd, maar recent is met behulp van het heel veel grotere oplossende vermogen van de huidige techniek ontdekt dat er dan ook weer methylgroepen aan C's worden gekoppeld en dat dit gebeurt in samenhang met het inactiveren van **retrotransposons** (LINEs en SINEs) (H2.3.3, tabel 2). CpG methylatie (fig 11) geldt als een bevestigingssignaal voor de lokaal geïnactiveerde toestand van het chromatine. Dit is in dit stadium van de embryonale ontwikkeling bij de mens ook van toepassing op repeterende elementen zoals LINEs en SINEs.

CpG methylatie blijft een goede parameter om het “resetten” in de **kiembaan** mee te beschrijven (fig 23). Maar in werkelijkheid moet er bij de ombouw naar de totipotente en pluripotente staat nog veel meer gebeuren. De complexiteit van de chromatine ombouw in het pre-implantaire embryo is tegenwoordig met een groot oplossend vermogen te onderzoeken en de daaruit verkregen gegevens zijn nauwelijks te bevatten. De technieken worden steeds betrouwbaarder maar er zijn nu nog steeds 300 eicellen (muis) nodig om een indruk per gen-promotor te verkrijgen. Het hele proces is buitengewoon fascinerend, maar de details ervan gaan de strekking van dit boek te buiten. Het “resetten” van het chromatine moet leiden tot het aanschakelen van de genen, die essentieel zijn voor totipotentie en pluripotentie, en die daarom “aan” moeten staan in de pluripotente stamcellen (box 2). De transcriptiefactoren Oct4, Sox2 en Nanog zijn hierbij heel belangrijk. De genen hiervoor staan tijdens de **oogenese** en de **spermatogenese** uit, maar zijn niet extra verzegeld, er is geen CpG methylatie in het promotor gebied. Dat kan een voorbode zijn van hun snelle aanschakeling tijdens het begin van de embryonale ontwikkeling. Tijdens deze hele operatie moeten de retrotransposons (H2.3.3, tabel 2) niet de kans krijgen weer actief te worden. De expressie ervan wordt daarom mede onderdrukt door het Trim28 complex (fig 24).

Zoals aan het begin van dit hoofdstuk vermeld vindt de tweede “reset” plaats tijdens het transport en de vermeerdering van de primordiale kiemcellen op weg naar de gonade (H7 en H8). Primordiale kiemcellen pakken de zaken voortvarend aan en verwijderen de imprintcodes van beide geslachten, de ICRs (fig 27) worden hierbij gedemethyleerd. Dit is nodig om later tijdens de **gametogenese** de bij het geslacht behorende “imprint” er weer op te zetten.

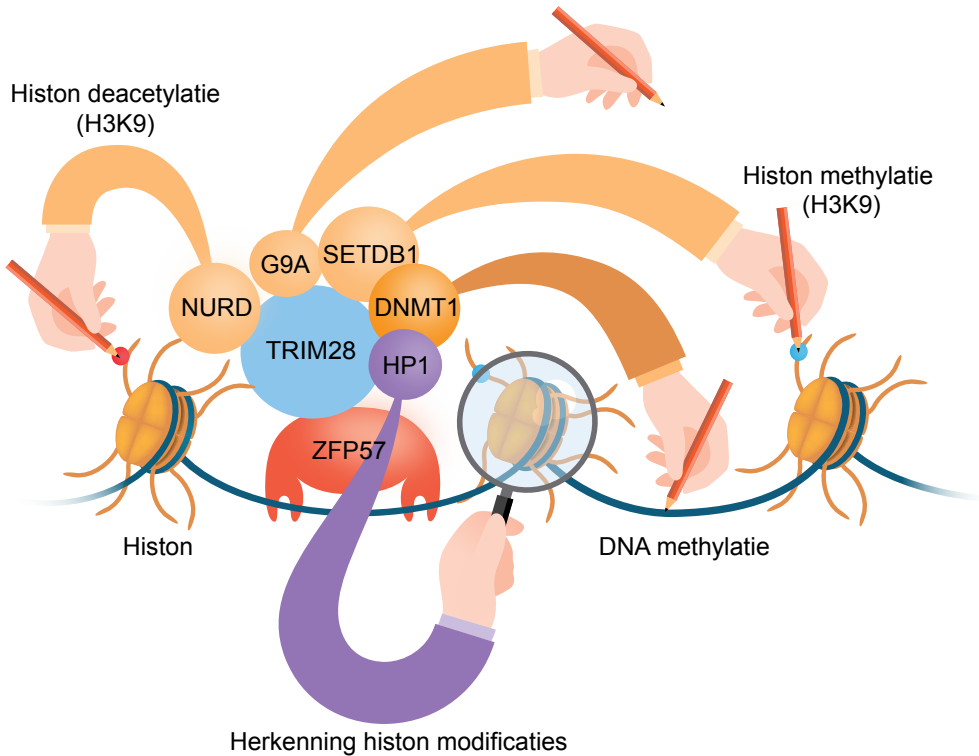


FIG 24

Een artistieke impressie van een voorbeeld van de multi eiwitcomplexen die op het niveau van **chromatine** de activiteit van het **DNA** reguleren. In dit geval is de integrator van de functies van dit complex, dat kort na de bevruchting functioneel wordt, het eiwit Trim28 waarnaar ook het hele complex genoemd is. Onder de te coördineren functies zijn die van de chromatine “writers” (oranje) en “readers” (paars, begrippen die in hoofdstuk 2.3.2 zijn geïntroduceerd) de belangrijkste. De “writers” oefenen hun functie uit via **histon post translationele modificaties** (de **PTMs** van tabel 1) en via het methyleren van DNA (fig 11). Als vitale schakel in het reguleren van genactiviteit staat het eiwit Zfp57 (hier roodbruin, een onderdrukker van de **transcriptie**) sterk in de belangstelling. Het is een “zinc finger” eiwit (als Prdm9 van H5.1) en kan zo voor positiebepaling in het **genoom** zorgen. Het onderdrukken van **retrotransposons** en het beschermen van de “imprint control regions” (de ICRs van H10 en fig 27) tegen de genomwijde demethylatie van CpG dimeren (fig 11) vanaf de bevruchting tot aan het **blastocyst** stadium (fig 23) zijn zeer belangrijke functies van het Trim28 complex.

De algehele DNA demethylatie wordt grondiger uitgevoerd dan bij de eerste reset, die vooral ten dienste staat van het op gang helpen van de embryonale ontwikkeling (fig 23). Ook wordt het chromatine weer gereorganiseerd. Tijdens dit hele proces moet voorkomen worden dat evolutionair relatief jonge retrotransposons actief worden. Daarom behouden deze hun CpG methylering. Elke generatie kiemcellen begint zo weer met een schone lei. Hoe schoon die lei nu eigenlijk is komt in hoofdstuk 15 aan bod. Het blijft immers een vraag of het hele proces wel zo eenduidig wordt doorlopen. Voor dit moment is het al belangrijk op te merken dat ook m.b.t. de CpG methylering op het niveau van individuele **genen** weer uitzonderingen gevonden zijn, een ontdekking uit 2015 van Azim Surani uit Cambridge. Dit kan een aspect zijn van epigenetische overerving die wordt behandeld in hoofdstuk 15.

Een laatste aspect van de 2^e “reset” vindt alleen plaats in XX primordiale kiemcellen van vrouwelijke embryo's, omdat deze net na de periode waarin er random X chromosoom inactivatie is opgetreden zijn ontstaan (box 4). De twee X chromosomen zoeken elkaar aan het begin van **meiose** op om het proces van **crossing over** voor te bereiden (H5.1, H11.1). Een dan bestaand verschil in de chromatine organisatie tussen de **homologe** X chromosomen zou dit hinderen. Daarom lijkt het logisch dat de zojuist geïnactiveerde X weer geactiveerd moet worden.

Genomische imprinting

Eicellen hoeven niet per se bevrucht te worden om te starten met de embryonale ontwikkeling. Dat kan ook met een trucje, bijvoorbeeld een behandeling met een beetje alcohol. De **embryo's** die zo ontstaan worden **parthenogenonten** genoemd en ze kunnen **diploïd** zijn omdat de producten van de 2^e meiotische deling in de eicel zijn gebleven (dan heeft 2^e poollichaampje zich niet afgesplitst, fig 42). De maximale ontwikkeling van deze “onbevlekt ontvangenen” is al bereikt voordat de organen gevormd zijn, dus in het embryonale stadium.

Na de versmelting van de eicel en de zaadcel ontstaan in de nu gevormde **zygote** twee kernen, een mannelijke, uit de kern van de zaadcel, en een vrouwelijke, uit de 2^e meiotische deling van de eicel (H13.5 fig 42). Bij de juiste microscoopbelichting stralen die van de muis microzonnetjes. Begin jaren 80 werd het technisch mogelijk om de kernen tussen zygoten uit te ruilen (de pronucleï, fig 25, ook muis).

Wanneer je met een uit een schimmel afkomstig stofje het cytoskelet (fig 2) van de zygote “ontspant”, kun je de kernen eruit zuigen. Eigenlijk is de verwijderde kern een kleine cel met een celmembraan. Met behulp van een stroomstootje kan deze minicel gefuseerd worden met een zygote waar dan eerst een pronucleus uit verwijderd is. Dit is het protocol om embryo's te construeren met of alleen genetisch materiaal van de moeder of alleen van de vader (fig 25). De resultaten van deze ingreep werden in 1984 ongeveer gelijktijdig door twee onderzoeksgroepen gerapporteerd. De groep met Azim Surani werkte in Cambridge op de “animal research council unit of reproductive physiology”, die van Davor Solter in Philadelphia op het Wistar Instituut. De embryo's met 2 vrouwelijke kernen worden **gynogenonten** genoemd, die met alleen maar mannelijke kernen **androgenonten**. Het verschil tussen de eerder genoemde parthenogenonten en

deze gynogenonten is dus niet zo groot. Na transplantatie in een schijnzwangere muizenmoeder ontwikkelen de gynogenonten zich op dezelfde manier, de besten stoppen tijdens de organogenese. Met de androgenonten loopt het nog droeviger af, sommigen implanteren nog wel maar de maximale embryonale ontwikkeling houdt een paar dagen na de implantatie op.

Op weg naar Cornwall, het was zomer 1984, werd er vanuit een camping in Cambridge een bezoek aan de ARC "reproductive physiology unit" aan de Huntington Road gebracht. Daar vond men dat ik nog even langs Azim Surani moest lopen alvorens weer naar de familie te gaan. Ik kende hem niet maar de proef met de kerntransplantaties was snel uitgelegd. De androgenonten leken tekort te schieten in de ontwikkeling van het embryo en de gynogenonten in de ontwikkeling van de embryonale membranen. Er waren genoeg androgenonten in de baarmoeder teruggeplaatst om uit te sluiten dat de slechte ontwikkeling zou kunnen komen door de toevallige samenkomst van twee kernen met een Y chromosoom. De suggestie van de proefuitkomst was natuurlijk duidelijk: de bijdragen van de vader en de moeder aan de embryonale en foetale ontwikkeling vullen elkaar aan.

De ontwikkeling van de geheel "mannelijke" embryo's lijkt op een vorm van spontane abortus bij de mens, waarbij de abnormaal gevormde embryo's "hydatidiform moles" worden genoemd. Deze bestaan overwegend uit extra embryonale structuren met als gevolg dat de zwangerschap in de 4^e-5^e maand eindigt.

Ter plekke deed de uitkomst van deze proeven me sterk denken aan de resultaten van kruisingsproeven, die in de jaren 70 in Harwell op de MRC "radiobiology unit" waren opgezet. In figuur 26 wordt het idee van deze proeven uitgelegd, waarbij vooral gebruik gemaakt wordt van reciproke translocaties (fig 12). Wanneer een chromosoomsegment, dat van de moeder komt gelijkwaardig is aan hetzelfde segment van de vader, maakt het niet uit waar het vandaan komt, als het maar in de dubbele hoeveelheid aanwezig is. Dit is mogelijk wanneer de andere ouder het betreffende segment niet levert. Maar hoe herken je de nakomelingen die uit zo'n completererende bevruchting (2 + 0 in plaats van 1 + 1) zijn ontstaan? Dat werd de experimentele voorwaarde waaraan onderzoekers als Tony Searle, Colin Beechey en Bruce Cattanaach in de jaren 70 moesten voldoen. **DNA** merkers bestonden toen nog niet, daar kon pas in het begin van de 90-er jaren mee worden gewerkt. De onderzoekers pakten dit slim aan door veel mutanten te analyseren met een **recessief** overervingspatroon, waarvan het **homozygoot** recessieve **genotype** aan het uiterlijk is te herkennen, en dat liefst al bij de geboorte. En je moest natuurlijk weten op welk chromosoom en waar op dat chromosoom het betreffende **gen** ligt. Het maken

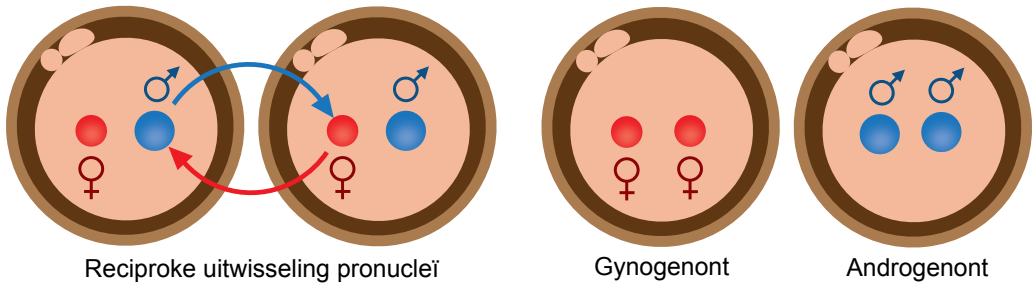


FIG 25

Illustratie van de muizenproef met de verwisselde pronucleï, waarmee het verschijnsel **genomische imprinting** een grote onderzoeksimpuls kreeg.

van de stammen met de reciproke translocaties en de **fenotypische** merker genen op de bij de translocatie betrokken chromosomen, kostte de meeste muizen en de meeste tijd (fig 26). De eerste wat grotere studie waarbij de **heterozygoten** met elkaar werden gekruist, uitgevoerd door Tony Searle en Colin Beechey, is in 1978 gepubliceerd, overigens zonder dat het opmerkelijke falen van de **complementatie** meteen als een voorbeeld van **genomische imprinting** werd geïnterpreteerd. Omdat er in Harwell stug aan dit project werd doorgewerkt was er in 1985 een redelijk idee ontstaan over de chromosomen (en segmenten daarvan) waarvoor de muizenman en muizenvrouw niet gelijkwaardig zijn. Dit leidde tot de “mouse **imprinting** map”, waar Colin Beechey tot 2011 bij betrokken was. Waren het eerst regio’s van chromosomen, die van beide ouders moesten komen om geen afwijkend fenotype te veroorzaken, over de jaren werden ook langzaam de daarin gelegen genen geïsoleerd, waarvoor complementatie niet mogelijk is. Deze genen bleken in een enkele dosis, of van de vader of van de moeder, tot expressie te komen (fig 27). Gaandeweg werd opgehelderd wat de functie van deze genen is. De belangstelling ging sterk uit naar het **epigenetische** mechanisme dat achter de mono **allele** expressie verscholen ligt. Ondertussen waren er ook bij de mens ziektebeelden bekend waarvan bleek dat die met imprinting te maken hadden, zoals het Prader-Willi syndroom, Angelman syndroom en Beckwith-Wiedemann syndroom. Man en vrouw kunnen door deze epigenetische mechanismen in reproductief opzicht niet zonder elkaar en wat is er mooier dan dat!

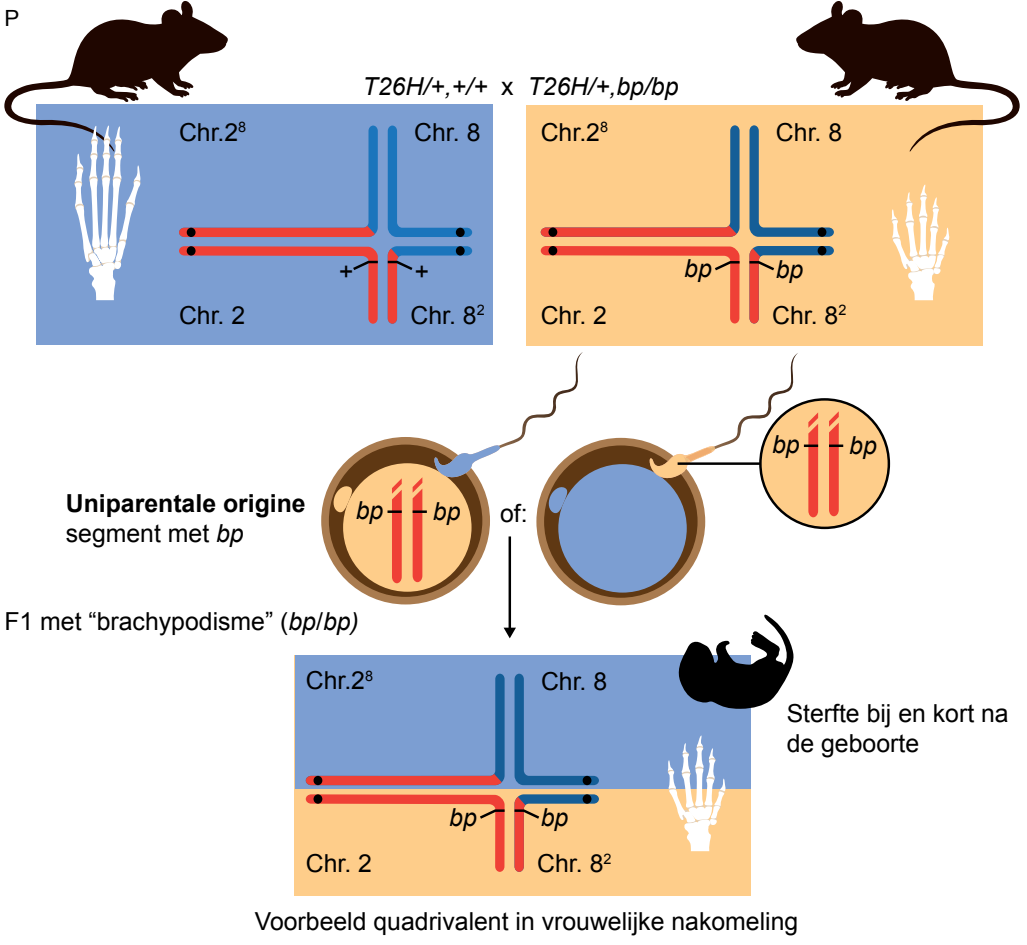


FIG 26

Een van de eerste **complementatie** proeven uitgevoerd op de MRC “radiobiology unit” in Harwell (UK) in de jaren 70. Het chromosoomsegment dat loopt van het breukpunt van de *T26* translocatie tot aan het eind van **chromosoom 2** is gemerkt door de recessieve **mutatie** *bp* die in **homozygote** toestand leidt tot een sterke verkorting van de botten in de ledematen (vooral de voetkootjes). Verder zijn deze muizen volledig levensvatbaar en vruchtbaar. Bij reciproke translocaties (fig 12) leidt het zoeken naar **homologie** tijdens de eerste **meiotische** profase tot de vorming van een quadrivalent, zoals hier getekend. Het voert te ver om de verdeling van de chromosomen over de secundaire oocyten en spermatocyten (fig 13) uit te leggen. Belangrijk is dat vooral voor de segmenten tussen het translocatie breukpunt en het chromosoom eind (hier gemarkeerd door *bp*), het verschijnen van 2 kopieën in een **gameet** allesbehalve een zeldzaamheid is. Dit kan bij de bevruchting goed gemaakt worden door een complementaire gameet, die dit segment juist mist. Beige (in de F1) staat voor de gameet met de duplicatie (bevat chr 2 en chr 8²) en lila voor de gameet met de deficiëntie (bevat chr 2⁸ en chr 8) voor het segment van chromosoom 2 dat gemarkeerd is door *bp*. De figuur geeft aan dat het niet uitmaakt welke ouder homozygoot is voor *bp*. Alle homozygoten (*bp/bp*) sterven bij de geboorte of kort erna af. Op deze manier is het hele genoom van de muis op **genomische imprinting** in kaart gebracht. Het feit dat de ene ouder verantwoordelijk is voor een set van genproducten en de andere ouder weer voor een andere set verhindert de complementatie, maar de effecten van een dubbele gendosis (waar die normaal enkel is) spelen door de complementatie proeven heen. P is “parental”. **F1**, zie de verklarende begrippenlijst.

Wat is het inzicht tot nu toe? Jo Peters, ook uit Harwell, heeft in haar actieve onderzoekscarrière sterk bijgedragen aan het verder ontrafelen van de epigenetische mechanismen achter genomische imprinting. Ze werkte daarbij intensief samen met Gavin Kelsey van het Babraham Instituut in Cambridge. Wat nu volgt is gebaseerd op hun reviews. Het je verdiepen in genomische imprinting leidt gelijk naar het “resetten” van epigenetische informatie in de **kiembaan** (H9). De geslachtspecifieke vader-moeder informatie moet in de tijdsspanne tussen de bevruchting en het starten van de embryonale ontwikkeling worden bewaard en daarna behouden (de ICRs van H9, fig 27). Maar bij de tweede reset in de kiembaan, bij het opbouwen van de pool

van **primordiale kiemcellen**, moet ze worden uitgedomd, deze cellen zijn dan nog niet tot een geslacht “bekeerd” (H7, H8, H9, fig 23). Wanneer dat eenmaal is gebeurd en de keus tussen **oogenese en spermatogenese** is gemaakt, worden voor de ICRs van de geïmprinte genen de juiste bij het geslacht behorende instructies er weer opgezet (fig 27).

Het ontstaan van imprinting moet iets te maken hebben met de ontwikkeling van een baarmoeder bij zoogdieren en met levendbarendheid, de ontwikkeling van de placenta. Maar ook bij tal van andere levensvormen komt het voor. Al snel nadat het idee van een tot de ene of de andere sekse beperkte bijdrage aan de volgende generatie bij de theoretische biologen geland was, werden er concepten ontwikkeld waarin dit verschijnsel past. De meest bekende daarvan is de “parental conflict hypothese” (maar er zijn er meer). Deze gaat ervan uit dat de vader en moeder in competitie zijn omdat de moeder verantwoordelijk is voor zowel de voeding van embryo, **foetus** en zuigeling als voor zichzelf. Voor de vader zou het voordelig kunnen zijn om te streven naar zwaardere nakomelingen, ook al zou dat ten koste gaan van de moeder. Er is immers sprake van concurrentie om voeding tussen moeder en foetus. Een enkele uniform sluitende theorie die imprinting verklaart zal niet bestaan en is ook moeilijk te verzinnen gezien de veelheid aan lichaamsfuncties die erdoor worden beïnvloedt.

De fenotypen van de androgenonten en de gynogenonten lijken elkaars tegenpool te zijn, waar het gaat om de balans tussen het embryo en de embryonale membranen. Een reflectie daarvan is later bij de geboorte voor meerdere kleine chromosoomsegmenten te zien, die of alleen van de vader of alleen van de moeder afkomstig zijn (fig 26). De Harwell groep had het over “opposite phenotypes”. Een voorbeeld: wanneer de duplicatie van de moeder en de deficiëntie van de vader komt zijn de muizen bij de geboorte mager, willen niet zuigen en gaan binnen 24 uur dood. Bij de omgekeerde situatie zijn ze vet en hyperactief maar gaan wat later ook dood. In 2014 heeft Jo Peters de (patho)fysiologische processen waarmee genomische imprinting zich bemoeit, samengevat in een prachtig stuk dat gepubliceerd is in Nature Reviews/Genetics. De genoemde processen en daaraan gekoppelde aandoeningen waren: a) prenataal en postnataal overleven en groei; b) metabolisme waaronder ook obesitas; c) neurologische en gedragseffecten waaronder slaapgedrag en sociaal gedrag inclusief psychiatrische afwijkingen. En tenslotte is er kanker. Bij metabolisme worden zaken als glucosetolerantie en insuline gevoeligheid genoemd. Vooral de neurologische en gedragsaspecten van “genomische imprinting” trekken nu de aandacht. Uit een meer recente review blijkt dat deze kant ook bij de muis meer onderzoek heeft aangetrokken. Naast gedrag (bijvoorbeeld het nemen van risico en impulsiviteit) worden mogelijk ook cognitieve processen beïnvloed door imprinting. Bij de mens zijn Prader-Willi en Angelman

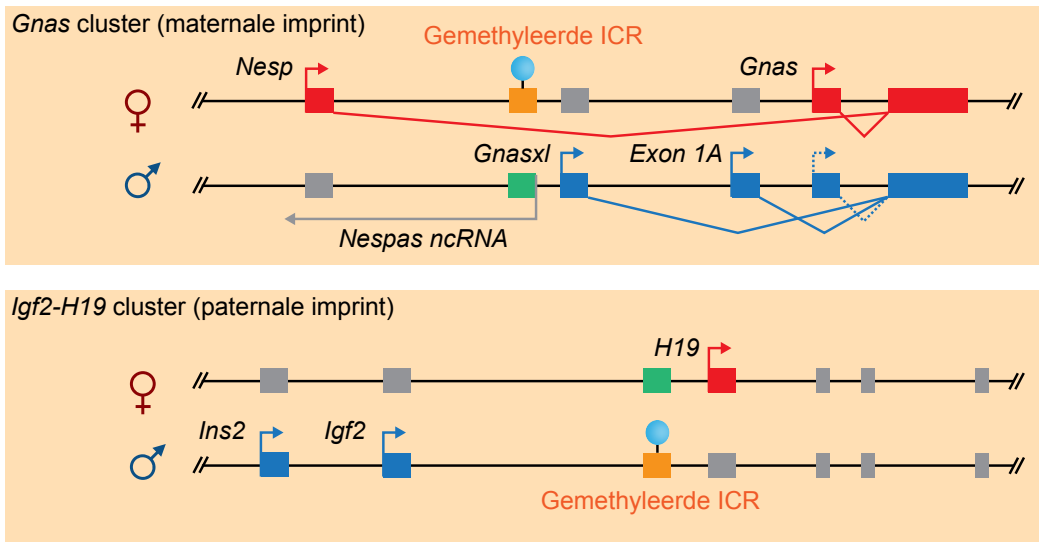


FIG 27

Een vereenvoudigde weergave van de **genregulatie** rond een “imprint control region” (ICR, hier oranje in de gemethyleerde inactieve vorm en groen in de actieve vorm). De toevoeging paternaal en maternaal duidt op het geslacht van de **kiembaan** waarin de ICR wordt gemethyleerd (de imprint). De *Gnas* cluster ligt in hetzelfde segment van **chromosoom 2** als het **gen *bp*** van fig 26. De **transcriptierichting** staat aangegeven met een pijl. Genen met een maternale expressie staan in rood, genen met een paternale expressie in blauw aangegeven. Hoe in de *Gnas* cluster gebruik wordt gemaakt van **exons**, wordt aangegeven door verbindingstrepen (box 1). De *Gnas* cluster coördert o.a. voor *Nespas*, evenals het product van *Exon 1A* een lang niet coderend (lnc) **RNA**. Ook het product van *H19* in de paternaal geïmprinte *Igf2 H19* cluster is een niet coderend RNA. De grijze blokken verbeelden genen met een onderdrukte expressie.

syndroom (ook gebruikt als illustratie van de humane uitvoering van de “opposite phenotypes”), een goede illustratie van de betrokkenheid van imprinting bij werking van de hersenen, gezien de mentale retardatie die bij deze ziekten optreedt.

Bij een dier-experimentele benadering om de richting van de paternale en maternale effecten te duiden, worden er **chimaeren** gemaakt tussen normale pre implantaire embryo's en

gynogenonten of androgenonten om daarna te kijken naar bijvoorbeeld de ontwikkeling van de hersenen. Wanneer de balans bewoog in de richting van de androgenonten, werden de chimaeren groter maar hun hersens kleiner. In de omgekeerde situatie, dus met een grotere bijdrage van de moeder zag men precies het omgekeerde. Nu waren de jongen kleiner, maar hun hersens groter.

Bij de muis zijn nu zo'n 260 genen bekend, die geslachtspecifiek (naar herkomst) worden gereguleerd. Bij de mens wordt ruwweg voor vergelijkbare chromosomale gebieden (de **orthologen**), een getal van 228 opgegeven. Op bijna alle chromosomen kom je ze tegen. Geheel in lijn met de theorie achter, en de experimentele bevindingen rond het verschijnsel genomische imprinting, is gevonden dat het **transcriptoom** van de placenta het meest rijk is aan geïmprinte genen.

In het onderzoek naar het mechanisme achter de naar herkomst van sekse gerelateerde genexpressie, stuitte men op het verschijnsel dat "differentially methylated region" (DMR) wordt genoemd. Dat zijn regio's waarin in gewone lichaamcellen, de methylatiegraad van C(ytosine) tussen de **homologe** sequenties verschilt (bijna altijd volgt er op deze C's een G, zie fig 11). Er zijn nogal wat van zulke regio's, en van vele is de betekenis nog niet bekend. Maar wanneer ze in een chromosoomsegment liggen, waarvoor de genetische imprinteffecten zijn aangetoond en ze bij de regulatie daarvan betrokken zijn, kregen ze betekenis met een andere naam tot gevolg. Dan worden ze "imprint control regions" of ICRs genoemd (H9, fig 27). Het uitpuzzelen van de manier waarop de regulatie van genactiviteit vanuit de ICRs wordt geredigeerd, is een voorbeeld van modern onderzoek waarvoor genetica en moleculaire biologie momenteel de technische mogelijkheden hebben. Bij de muis zijn er nu drie regio's gevonden met een paternaal gemethyleerde ICR en 20 met een maternaal gemethyleerde ICR. Vanuit deze ICRs wordt de genactiviteit van een paar nabij gelegen genen op het chromosoom, en ook op het homologe chromosoomsegment gereguleerd. Zie voor verdere verduidelijking ook het bijschrift van figuur 27. Hoe de communicatie tussen de homologe regio's precies geregeld is, is nog niet goed bekend. De methylatie status van de ICR voorspelt niet automatisch welke van de genen, die het in zijn omgeving controleert aan zijn en welke uit. Van de geïmprinte genen bij de mens komt van de meerderheid het paternale allel tot expressie (76%). Bij de muis is de verhouding tussen expressie van maternale en paternale allelen wat gelijkjer (respectievelijk 45% vs. 55%).

Het gaat hier te ver om in te zoomen op individuele genen, maar twee genen die coderen voor functioneel gekoppelde eiwitten zijn het noemen waard. *Igf2* is een gen waarvan het paternale allel tot expressie komt (fig 27). Het is één van de voornaamste groeifactoren voor

de prenatale ontwikkeling. De expressie van de receptor van Igf2 op de celwand, *Igf2r*, vindt bij de muis plaats vanaf het maternale gen, het *Igf2r* gen van de vader staat uit. *Igf2r* geeft het Igf2 groeisignaal via receptorwerking door van buiten de cel naar binnen. Bij een analyse van de **genetische architectuur** van de hoogtemaat (rughoogte) bij runderen werden regulatoren van Igf2 als relatief belangrijk opgepikt. Is dit een voorbeeld van een “balancing act” tussen de seksen? Bij de mens is de imprint status van de Igf2 receptor evolutionair aan het vervlakken, maar zijn er genoeg geïmprinte genen in de placenta, waarvan de maternale kopie tot expressie komt en zo kunnen helpen om de balans tussen moeder en foetus te bewaren. Ook effecten op andere fysiologische processen en neurologische functies krijgen momenteel volop aandacht in het onderzoek naar de rol van imprinting bij de mens. Zo is er niet lang geleden, in 2018, op IJsland **genoom** breed en met nadruk op de Prader-Willi regio nauwkeuriger naar de rol van epigenetische veranderingen op genexpressie gekeken. Het CpG methylatie landschap (fig 11) kon voor het paternale een maternale genoom afzonderlijk gereconstrueerd worden en ook de **transcripten** werden naar herkomst onderscheiden. Daardoor werd het beeld veel gedetailleerder. Allerlei verhoudingen van paternale en maternale genactiviteit werden gevonden. De situatie is dus niet altijd zo zwart wit als tot dan toe altijd werd aangenomen, de werkelijkheid is zoals meestal ingewikkelder.

Box 4 Meer over X chromosoom inactivatie

Bij het beschrijven van **heterochromatine** in hoofdstuk 2.3.2 kwam X **chromosoom** inactivatie al even langs. In het genetische jargon wordt deze oplossing voor het verschil in aantal X chromosomen tussen vrouwen en mannen aangeduid met de term **dosis compensatie**. In hoofdstuk 3.4.2 werd al vermeld dat embryo's met een chromosoom te weinig of te veel in de regel niet geboren worden vanwege de vele **gendosis effecten**. X chromosoom inactivatie heeft als doel om een verschil in gendosis voor de op het X chromosoom gelegen **genen** tussen mannen en vrouwen te voorkomen. Waar de X en de Y vanuit het gemeenschappelijke verleden van een gewoon **homoloog** chromosomenpaar die homologie nog hebben weten te behouden is deze inactivatie niet nodig. Deze relatief kleine chromosoomsegmentjes staan bekend als de **pseudo autosomale regio** (of PAR). Ze onttrekken zich aan de dosiscompensatie omdat dit niet nodig is en zijn essentieel voor het mogelijk maken van **crossing over** (H12.5.1, fig 37).

Bij de muis begint het proces van inactiveren in de vrouwelijke embryo's al heel snel na de bevruchting, ergens vanaf het 4-cellige stadium (fig 43). De X van de vader wordt eerst geïnactiveerd, dit wordt wel de geïmprinte inactivatie genoemd (voor **genomische imprinting** zie H10). Rond de implantatie verandert dit en vindt er in iedere cel van de **epiblast** (fig 43) een keuzeproces plaats: of de maternale X of de paternale X inactieveert zichzelf. Om dat mogelijk te maken moet de geïmprinte activatie van de paternale X weer ongedaan worden gemaakt. Uiteindelijk is, gerekend over de hele populatie van **somatische cellen**, ongeveer in de helft het maternale X chromosoom en in de andere helft het paternale X chromosoom actief. Dit leidt tot een aantal duidelijke **fenotypen**, waarvan de lapjeskat veruit de meest bekende is. Het gen voor oranje (O/o) ligt op het X chromosoom. In aanwezigheid van het actieve allel (O) overheerst "oranje" de donkere kleur gecodeerd door de **autosomale** genen, het inactieve allel (o) doet dat niet. Wan-

neer er maar één X chromosoom aanwezig is zul je dus geen lapjespatroon aantreffen: het zijn bijna altijd katers.

Bij de mens wordt de geïmprinte inactivatie van de paternale X overgeslagen, maar is het uiteindelijke resultaat hetzelfde. Zo rond de implantatie is er eveneens een 1 op 1 verdeling tot stand gekomen in het zowel actief zijn en *mutatis mutandis* ook inactief zijn van de maternale en paternale X.

De inactivatie bij muis en mens wordt aangestuurd vanuit de **orthologe** genen *Xist* en *XIST*. Wanneer op de ene X dit gen “aan gaat” moet het op het andere chromosoom uitgeschakeld worden. De afspraak rond de aanduiding van genen en hun producten is dat het muizengen altijd met een hoofdletter begin en cursief geschreven wordt, terwijl het *Homo sapiens* gen, met louter hoofdletters ook cursief geschreven wordt. Wanneer de letters rechtop staan wordt het eiwit, gecodeerd door het corresponderende gen bedoeld. Het *Xist/XIST* gen bevat de basenvolgorde voor een lang niet-coderend **RNA** (lncRNA) met rond 15 kb aan **nucleotiden** (een *Xist/XIST* eiwit bestaat niet). Sinds het in de evolutie uit elkaar gaan van de lijnen waarin uiteindelijk muis en mens zijn ontstaan, is het ruwe ontwerp van het gen bewaard gebleven maar zijn er zoals verwacht, en vooral in een deel van het gen waar het wel kon lijden, veranderingen opgetreden. Hoe dit *Xist* RNA werkt is nu vrij goed bekend, ook door het werk van Joost Gribnau van de afdeling ontwikkelingsbiologie van het Erasmus MC. Vanuit het *Xist* gen op het X chromosoom bedekt het *Xist* RNA zijn omgeving en verspreidt het zich in samenwerking met eiwitten over de hele X. Dit heeft als resultaat dat deze vervolgens een inactieve chromatine-status aanneemt. Lokale genactiviteit is dus nodig om een heel chromosoom inactief te maken. Het RNA dient, denkt men, vervolgens als een soort van platform om allerlei spelers op het chromatineveld toegang te verschaffen. Deze manier van inactiveren lijkt in aanvang erg op de regulatie van “genomische imprinting” (H10, fig 27). Het inactieve X chromosoom is als verwacht rijk aan H3K27me3 (tabel 1) en de promotoren van de genen zijn gemethyleerd op de CpGs, met uitzondering van die van het actieve *XIST*/

Xist gen (fig 11). De **replicatie** van het chromosoom vindt laat in de celcyclus plaats. De *XIST/Xist* promotor van de actieve X is wel gemethyleerd en het gen staat uit. Maar ondanks deze suprachromosomale maatregelen zijn er toch weer genen die aan deze **epigenetische** controles zijn ontsnapt. Bij de mens zijn dat er veel meer dan bij de muis. Van de rond de 850 X gelokaliseerde genen bij de muis ontsnappen er 17 altijd aan de inactivatie en zijn er 20 niet helemaal “zwart wit”. Van de 639 humane genen waarvan de inactivatie status bekend is, zijn er 80 verstokte weigeraars en nog eens 93 vertonen een variabel gedrag. Een conclusie die je hieruit zou kunnen trekken kan zijn dat voor de genetische activiteit van het X chromosoom, man en vrouw bij de mens meer verschillen dan bij de muis. Daar zou je naar kunnen kijken door bij mens en muis de ontwikkeling van vrouwelijke embryo's met maar één X chromosoom met elkaar te vergelijken. Bij de mens praten we dan over het Turner syndroom (45,X), een betrekkelijk veel voorkomende aantalsafwijking van de geslachtschromosomen (1 op 2000-4000, zie ook tabel 4). XO muizen zijn spontaan zeldzaam, maar er bestaan goede modellen voor. Daaruit weten we dat er alleen extra prenatale sterfte is wanneer de X van de vader komt. Wanneer de X van de moeder komt is die niet verhoogd. Bij de mens is het totale beeld met 99% prenatale sterfte veel dramatischer. Bij de muis groeien XO vrouwtjes langzamer en blijven wat kleiner, maar ze zijn wel vruchtbaar. Ik kan me nog herinneren dat Mary Lyon in de herfst van 1971 op een laboratoriumpraatje in Harwell vertelde dat het vruchtbare leven van XO vrouwtjesmuizen wat korter was maar ook weer niet zoveel, een kwestie van hooguit een paar maanden. Uitputting van de oocytenvoorraad ligt als reden voor de hand. Dat is bij Turner meisjes wel heel anders. Zo worden ze behalve door een achterblijvende groei ook ontdekt, omdat in de puberteit de cyclus niet op gang komt: de ovaria bevatten geen **kiemcellen** en geen follikels (fig 28, 29).

Meisjes met de diagnose Turner, die toch zwanger worden, hebben zo goed als altijd weefsels met een samenstel van 45,X en 46,XX cellen, een **mozaïek** van waarschijnlijk zeer vroege embryonale oorsprong. Bij de deling van een **blastomeer** (fig 43) is een X

chromosoom verloren gegaan en de daaruit gevormde cellijn werd vervolgens niet door selectie verwijderd.

Het tamelijk grote verschil in het 45,X, XO fenotype tussen mens en muis klopt dus wel met het kleinere aantal genen dat ontsnapt aan X chromosoom inactivatie bij de muis: fysiologisch zijn vrouwtjesmuizen voor genfuncties afkomstig van het X chromosoom wat meer gelijk aan mannetjesmuizen. Die “ontsnap genen” zijn natuurlijk reuze interessant in de zoektocht naar genetische verschillen tussen man en vrouw, vooral wanneer het bij muis en mens orthologen zijn en ze bijvoorbeeld te maken hebben met het demethyleren van **histonen** (tabel 1, fig 8).

Nu we gezien hebben dat met betrekking tot het X chromosoom vrouwen en mannen in een subset van deze genen een verschillend niveau van expressie hebben, is een voor de hand liggende vraag of dat ook een effect zou kunnen hebben op het functioneren van de hersenen, eigenlijk een zijpad in dit boek. Een aanwijzing is dat vrouwen met drie X chromosomen (XXX, waarbij twee X chromosomen worden geïnactiveerd, waardoor de activiteitsdosis van de “ontsnap” genen hoger is) een fenotype hebben waar de psyche nadrukkelijk bij betrokken is. Het lijkt er dan ook op dat bij de “ontsnap” genen er ook enkele zijn die een hersenfunctie hebben.

Een heel recente illustratie van de macht van deze ontsnap genen is het gen *TLR7*, dat een rol speelt bij het verschil tussen mannen en vrouwen in de reactie op een COVID-19 infectie. De hogere dosis van het door dit gen gecodeerde eiwit draagt bij aan de betere kansen van vrouwen bij het bestrijden van het virus. In Duitsland wist een serieuze radiozender (WDR5) het prima uit te leggen.

X chromosoom inactivatie is iets dat rondom ons heen zichtbaar is, zie het verhaal over de lapjeskat aan het begin van deze box. Mijn leermeester in Harwell, Tony Searle scoorde er in 1949 zijn eerste algemeen geciteerde artikel mee. Tony was, na zijn verblijf als een Japanse oorlogsgevangene (in de periode 1941-1944; met daarin een kort verblijf bij de Siam Birma “death railway”) in de naoorlogse jaren geïnteresseerd geraakt in

genetica en studeerde in Londen. Hij kwam daar in contact met JSB Haldane, in de jaren voor de Tweede Wereldoorlog een van de “founding fathers” van de populatiegenetica. Haldane wordt nog steeds geciteerd. Als eerste had hij door dat **mutaties** in genen veel makkelijker plaats vinden in de mannelijke **kiembaan** dan in de vrouwelijke (tabel 3). Haldane's tweede, ook nog steeds geciteerde, wetenschappelijke nalatenschap heeft te maken met de steriliteit die optreedt bij het nageslacht van partners die evolutionair van elkaar afgedreven zijn. De regel van Haldane, in 1922 geformuleerd luidt: “When in the F1 offspring of two different animal races, one sex is absent, rare, or sterile, that sex is the **heterozygous** sex (heterogametic sex)”. Muilezels en muilieren zijn daar de bekendste voorbeelden van en hoofdstuk 12.5.1 vertelt hier meer over.

Haldane, gedeeltelijk van Indiase komaf, had de trekjes van een excentrieke Engelman. Zijn werkkamer op het “university college” in Londen was overvol en toen Tony Searle bij zijn eerst bezoek aan de grote geleerde aan de secretaresse vroeg waar hij in afwachting van zijn komst plaats kon nemen zei zij, “op een stoel”. De enige stoel die vrij was, was die van Haldane zelf, maar hij sprak de secretaresse niet tegen. Die eerste ontmoeting leidde er wel toe dat Tony naast zijn promotieonderzoek op een andere afdeling, begon aan een populatiegenetische studie van vachtkleuren en -patronen bij de katten van Londen. Bij nacht en ontij werden die gespot en dode exemplaren werden eventueel in huize Searle in de vriezer bewaard. Het bekendste onderdeel van dit project: de lapjespoes met evenveel oranje als niet-oranje zoontjes. En dan heb je ook nog oranje en niet-oranje poezen. Met een beetje rekenen met behulp van de in de populatiegenetica zo bekende Hardy-Weinberg regel zie je zo of de katten elkaar op het uiterlijk verkiezen, of dat het ze niet uit maakt (wat het geval is). En zie je een lapjeskater, dan is dat een XXY “Klinefelter” kater en dus steriel (H12.12.1).

Zou chromosoom inactivatie er de oorzaak van zijn dat vrouwen veel minder last hebben van monogene X chromosoom gekoppelde aandoeningen dan mannen? Om dit te verklaren moet je er van uit gaan dat de cellen waarin de “verkeerde” X aan staat een

selectief nadeel in de vermenigvuldigingscompetitie met de “goede” hebben. Een andere mogelijkheid is dat cellen met de goede X in weefsels of organen “burenhulp” verlenen, waardoor het fenotype (*i.e.* het fysiologische defect) minder uitgesproken tot uiting komt.

Bekende X gebonden aandoeningen waarvoor dit speelt zijn kleurenblindheid, Duchenne spierdystrofie, androgeen ongevoeligheid en X gekoppelde mentale retardatie. Deze ziekten komen relatief veel voor, ook omdat vrouwen ongemerkt drager kunnen zijn van het mutante allel. Duchenne spierdystrofie komt bij jongens in ongeveer 1 op de 3500 geboorten voor. Maar bij 2,5-8% van de vrouwelijke dragers van de mutatie zijn er symptomen van de ziekte. Het lijkt erop dat een niet volledig gebalanceerde verdeling van de actieve en de inactieve X, waardoor in een verminderd aantal spiercellen het goede dystrofine eiwit wordt aangemaakt, hiermee samenhangt.

Wordt bij vrouwen met een Duchenne allel minder vaak een spierprobleem gezien, bij draagster van het X gekoppelde mentale retardatie allel zien we wel vaker een fenotype. De schattingen van de bevolkingsfrequentie van deze aandoening lopen wat uiteen, maar zo'n 1 op de 1250-4000 mannen heeft het fenotype tegenover 1 op de 2500-8000 vrouwen. Dit suggereert dat bij ongeveer de helft van de draagsters, die dan dus **heterozygoot** zijn, zich kenmerken van de aandoening manifesteren. Vrouwen zijn wel minder sterk aangedaan, en krijgen ook duidelijk minder vaak het stempel ADHD. Ook hier lijkt dus de ernst van het ziektebeeld samen te hangen met de mate waarin de gemuteerde X ook het actief gebleven chromosoom is.

Oogenese

11.1 Het overzicht

Wanneer de primordiale **kiemcellen** aankomen in een gonade die “er voor kiest” de vrouwelijke kant op te gaan (doordat het **genproduct** van *Sry* (mens *SRY*) er niet is, H8), delen ze nog een aantal keren door en worden dan oogonia genoemd. De delingen zijn dan niet volledig waardoor er bruggetjes van **cytoplasma** tussen de kiemcellen blijven bestaan, er ontstaan cysten. In de muis beginnen de oogonia redelijk synchroon, daartoe aangezet door een vitamine A signaal, aan de **meiose**. Hierdoor zijn er op dag 15 post coitum (p.c.) ongeveer 25.000 primaire oocyten in het zygoten of al in het pachyteen stadium (fig 14). Bij de mens vind je vanaf 8 weken na het begin van de zwangerschap zo'n 600.000 oogonia die daarna nog door delen (tot in de 6^e maand).

Nadat de meiose in de primaire oocyten rond week 12 (ook hier op geleide van vitamine A) begonnen is, zijn vanaf 16 weken de eerste pachyteen stadia te vinden. Net als bij de muis kan in dit stadium het aantal **cross overs** m.b.v. MLH1 **immunofluorescentie** (H5.2, fig 15) worden geteld. Oogonia kunnen zoals bovenvermeld nog weken delen en dat is er de oorzaak van dat er na 25 weken nog steeds oocyten in het pachyteen stadium zijn. De mate van asynchronie in de meiotische ontwikkeling is bij de mens zo anders dan bij de muis, dat het onderzoekers blijft verbazen. Die verbazing strekt zich uit tot de extreme spreiding die tussen **foeten** wordt gezien in het aantal primordiale follikels die na het pachyteen worden gevormd (iets dat niet tot uitdrukking komt in fig 28). Rond de 22 weken is er een piek met zo'n 7 miljoen kiemcellen, waarna de sterfte rap inzet. Dit verschijnsel was lang een mysterieus gebeuren en is dat eigenlijk nog steeds. De normale gang van zaken voor oocyten is dat ze na het pachyteen in een bijzondere vorm van het

diploleen belanden (fig 14, 28). De structuur van de **bivalenten** gaat daarbij als het ware op slot. Dit kan vanaf week 18 worden waargenomen en is het kernstadium waarin even later de vorming van de primordiale follikels zich voltrekt en de ontwikkeling van de eicel tot vlak voor de ovulatie plaats vindt. Voor alle processen die nodig zijn om tot een volwaardige eicel te komen, is deze bivalent vorm met de daarbij horende organisatie van het **chromatine**, het uitgangspunt. Vanaf het diploleen worden de cytoplasma bruggetjes tussen de oocyten opgeheven en moet elke oocyt maar zien hoe ze steuncellen, de pre-granulosacellen, besproken in hoofdstuk 8, aan kunnen trekken. Op dat moment is de vorming van primordiale follikels met granulosacellen begonnen (fig 28). Tijdens dit proces komen de jonge follikels wat verder van de rand van het ovarium af te liggen. Zoals hiervoor is aangestipt wordt deze fase ingezet met een grote sterftegolf onder de oocyten. Het lijkt erop dat het in de hand houden van de actieve **retrotransposons** (tabel 2) hier een belangrijke oorzaak van is.

In een in alle opzichten veeleisend onderzoeksproject kwamen Alex Bortvin en medewerkers uit Baltimore er in 2020 namelijk achter dat ongewenste activiteit van LINE retrotransposons een rol speelt bij de grote oocytensterfte, in de fase waarin de follikels worden gevormd en het pachyteen afloopt. Bij de muis vindt dit zo rond de geboorte plaats.

De bekende grafiek van Baker uit 1963 (fig 28) illustreert de grote prenatale afname van het aantal kiemcellen bij de mens. Dit fenomeen heeft een groep van doorgewinterde meioseonderzoekers, van het type dat het hele leven doorgaat en voor wie het pensioen niet bestaat, ertoe gebracht de mannelijke en vrouwelijke meiose bij mens nog eens goed met elkaar te vergelijken, in de verwachting de vrouwelijke meiose zo beter te kunnen begrijpen. In 2017 rapporteerden ze hierover in het toptijdschrift Cell. Voor hun studie gebruikten ze immunofluorescentie om met antilichamen tegen verschillende eiwitten betrokken bij crossing over (waaronder MLH1, H5.2 en fig 14, 15) dit proces voor onze soort nu eens goed in kaart te brengen. Ze besteedden extra aandacht aan de **chromosomen** 16 en 21. Chromosoom 16 omdat tijdens het uit elkaar gaan van de **homologen** er het meest frequent fouten optreden. Chromosoom 21 vanwege de oorzakelijke betrokkenheid bij Down syndroom (H3.4.2). Al eerder was opgevallen, dat het aantal cross overs bij de mens in de vrouwelijke meiose veel groter is ($\times 1,5$) dan in de mannelijke meiose en dat de spreiding ook groter is. De eindconclusie van deze studie is dat ongeveer 25% van de cross overs niet worden afgemaakt. Ook dat is een reden voor het in **apoptose** gaan van de eicel. Het begin van de vrouwelijke meiose bij de mens wordt dus gekenmerkt door een grote variatie in lotsbestemming tussen eicellen.

Laten we teruggaan naar de primordiale follikels van figuur 28. Bij de mens zijn er daar rond de geboorte zo'n 2 miljoen van met een grote spreiding tussen individuen. Dit is de gebruiksvorraad voor het hele reproductieve leven van de vrouw. Hieruit ontwikkelen zich van meet af aan primaire follikels (fig 28). De granulosa cellen veranderen van vorm en komen in een nauw contact met de eicellen. Ze gaan zich delen en zo ontstaan uit primaire follikels secundaire follikels. Tenslotte vormt zich een kleine holte: de tertiaire follikel is geboren (fig 28). Bij alle diersoorten inclusief de mens is de follikel nu tussen de 200 en 300 μm groot, zo rond een kwart mm. Vanaf dat moment zijn de granulosa cellen ook omgeven door theca cellen, de steroïdhormoon producerende cellen van de follikel.

Nadat een primaire follikel is gevormd gaat de eicel groeien en zet zich aan de buitenkant een geleï-achtige substantie af, de welbekende **zona pellucida** (fig 28, 39, 42). Zo rond het verschijnen van een holte tussen de granulosa cellen, bij het ontstaan van de tertiaire follikel, is de eicel volgroeid (fig 28). Granulosa cellen onderhouden tijdens het hele maturatieproces intensieve contacten met elkaar en met de eicel. Er ontstaan cytoplasmatische uitlopers die door de zona pellucida heen contact maken met de eicelmembraan. Zo communiceren ze over en weer, en kan de granulosa cel ook taken van de eicel overnemen. Dit concept staat bekend als "bidirectionele communicatie". Onder cellen in weefselverband is dit heel normaal maar hier wat scherper uitgewerkt. Natuurlijk betekent dit ook dat er onderlinge afhankelijkheid is, bijvoorbeeld voor het koolhydraat- en vetstofwisselingsmetabolisme, waarbij intermediären worden uitgewisseld. Voor het energiemetabolisme ligt de nadruk in de granulosa- en cumulus cel meer op de afbraak van glucose tot pyruvaat en lactaat die aan de eicel worden geleverd. Daarom gebruikt de eicel voor de productie van energie vooral de citroenzuurcyclus in de mitochondriën. Maar de ondersteunende rol van de granulosa- en later cumulus cellen (fig 28, 29) blijft niet tot de energievoorziening beperkt, de samenwerking is eindeloos ingewikkeld.

In de hier aan de orde komende onderlinge communicatie is de eicel uiteindelijk wel de baas. Zo worden de granulosa cellen door de eicel beschermd, tot celdeling aangezet, en groeit de follikel o.i.v. signalen uit de eicel. Nog een demonstratie van dit principe is de rol die de eicel speelt bij het verschijnen van de steroïdhormoon producerende theca cellen ten tijde van de differentiatiestap naar de tertiaire follikel (fig 28). Uiteindelijk zijn de granulosa cellen op hun beurt weer betrokken bij het handhaven van het meiose arrest in het bijzondere diploteen (fig 14) van de eicel, maar dit gebeurt wel op commando van de eicel. Eicellen kunnen zelfs het sein aan

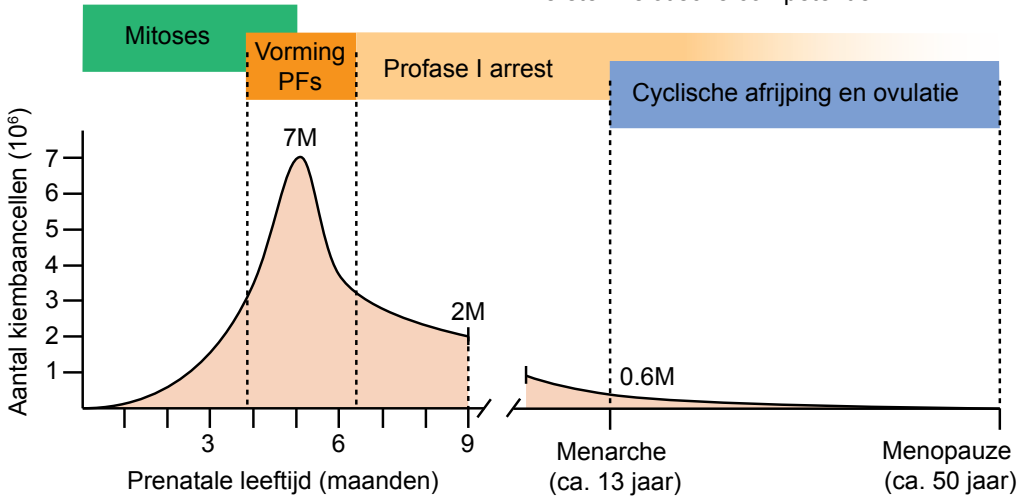
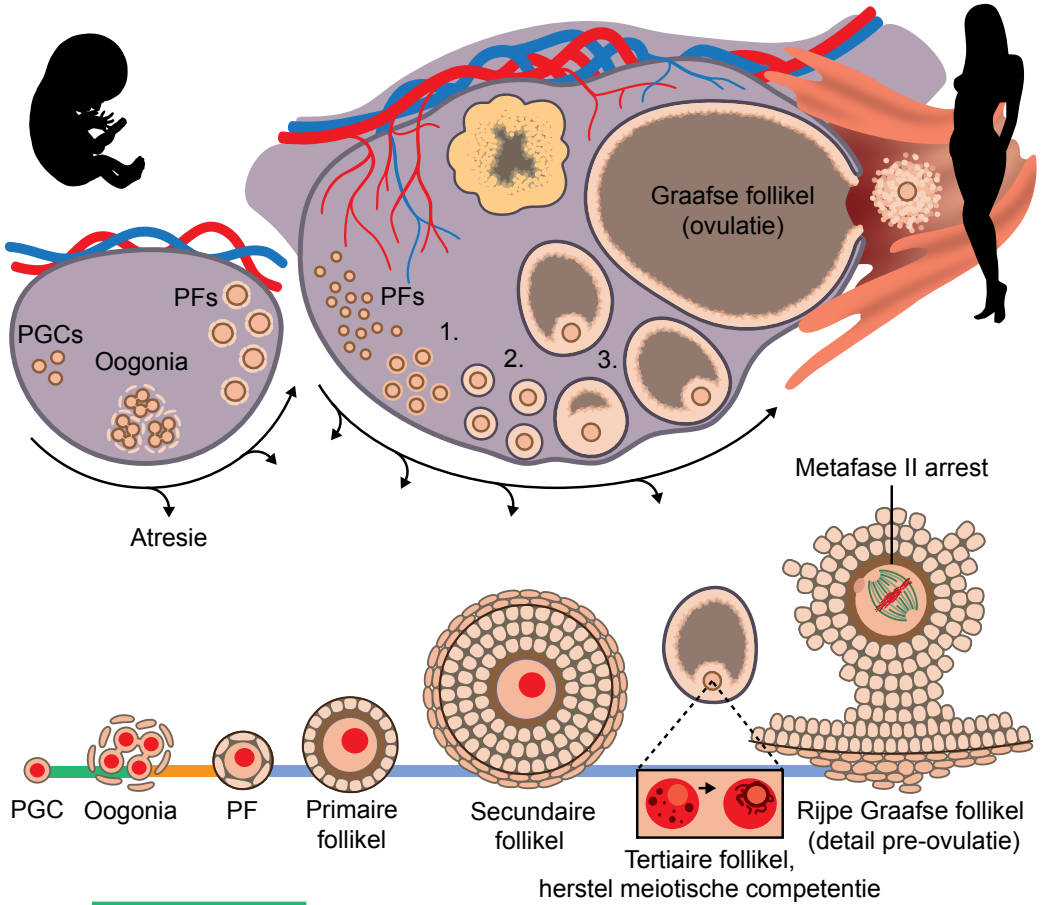


FIG 28

Een overzicht van de **oogenese** van het **embryonale** stadium tot in de volwassenheid. Het **foetale** stadium kenmerkt zich door de profase van de eerste **meiotische** deling in de primaire oocyten (fig 13) en door de vorming van de primordiale follikels (PF). PGC is "primordial germ cell". Wanneer de primordiale follikels worden gevormd treedt er een variant van het diptoteen (fig 14) op (in de literatuur "dictyate stage" genoemd) die specifiek is voor de oogenese. In het overzicht van het volwassen ovarium staan 1, 2 en 3 voor resp. primaire, secundaire en tertiaire follikels. In de tertiaire follikels ontstaan uit de granulocellen cumuluscellen rond de eicel waardoor deze meer los komt van de wand van de follikel. Na de secundaire follikel zijn de diameters in de tekening niet meer in verhouding. De vorming van de **zona pellucida**, die voor het eerst verschijnt in de primaire follikel, is weergegeven door een donkere lijn. Het verlies aan primaire oocyten is een continu proces met een sterke piek bij de vorming van de primordiale follikels. Het verlies zet daarna door en uit zich als **atresie** van de follikel. Een van de weinige duidelijke aspecten in de kern van de eicel die hiermee in verband zijn gebracht, is de ordening van **heterochromatine** (H2.3.2) rond de **nucleolus** (fig 2), hier geïllustreerd in de vergroting bij de tertiaire follikel. Oocyten die deze reorganisatie van de kern niet laten zien vallen in meerderheid af. Bij de ovulatie van de Graafse follikel (> 18 mm) is de oocyt in het metafase stadium van de 2^e meiotische deling (zie ook fig 39). Rond en na de ovulatie wordt de dan lege follikel omgevormd tot het corpus luteum, het gele lichaampje (bovenin). De geboorte wordt aangegeven door een interruptie in de tijdlijn, die het verloop in aantallen eicellen weergeeft.

granulosacellen geven om in apoptose te gaan. Daarmee heffen ze uiteindelijk ook zichzelf op. De hele follikel wordt **atretisch**, de eicel in haar val meeslepend. Omdat er in het leven van een vrouw maximaal maar zo'n 400 eicellen voor ovulatie zijn bestemd, treft dit lot bijna alle eicellen.

Aanvankelijk zijn de tertiaire follikels nog niet groot genoeg om ontvankelijk te worden voor de hormonen die in een cyclisch patroon door de hypofyse worden afgescheiden, de **gonadotrope** hormonen (fig 29). Daarvoor is meestal verdere groei noodzakelijk en de maat van de follikel waarin dit gebeurt verschilt per soort: bij muis en rat is de grootte ongeveer 0,25 mm, varken 1 mm, schaap 2 mm, mens en rund 3-5 en paard 10 mm. Omdat pas vanaf de puberteit follikels op deze manier worden gered is alles wat zich eerder ontwikkelt (en dat gebeurt), ten

dode opgeschreven. Dit verklaart de afname van de follikelpool met zo'n 80% vanaf de geboorte tot aan de puberteit bij de mens (fig 28).

Aan het begin van de puberteit bestaat de reserve aan follikels uit een "pool" van primordiale follikels onder het oppervlak van het ovarium. Deze reserve wordt de uitgangreserve genoemd. De andere reserve, de dynamische reserve, bestaat uit jonge tertiaire follikels (met een kleine holte, fig 28, 29). Uit dit reservoir worden de te ovuleren eicellen gekozen. Opgeteld zijn er dan nog rond de 300.000 eicellen per ovarium over. Onderzoekers hebben de indruk, dat de omvang van de uitgangreserve van individu tot individu nogal kan variëren. Ook lijkt deze populatie te bestaan uit eicellen die in de foetale periode later aan de meiose zijn begonnen en later een follikel hebben gevormd.

Om een idee te krijgen van de omvang van dit reservoir kan met echoscopie een idee verkregen worden van het aantal follikels dat 1 mm of groter is; men heeft het dan over de "antrale follikel telling" (fig 28, jonge tertiaire follikels zijn ongeveer 0,4 mm in diameter). Het lijkt erop dat er een vaste relatie is tussen de omvang van de uitgangreserve en de dynamische reserve. Voor elke ovulatie worden er op jonge leeftijd veel meer primordiale follikels gemobiliseerd dan op oude leeftijd. Om dan toch met het voor de soort kenmerkende aantal per cyclus te eindigen wordt het wapen van de follikel**atresie** zwaarder ingezet. Op oudere leeftijd, wanneer de uitgangreserve danig is ingeklonken, kan de soort zich zo'n zware selectieprocedure niet meer veroorloven; dan zou er niets meer voor de ovulatie overblijven (fig 28, 29). De eicellen zullen ook door veroudering van een minder goede kwaliteit zijn.

Wat er allemaal een rol speelt bij dit hele keuzeprocess wordt maar voor een klein deel begrepen. Follikels zullen concurreren om het follikel stimulerend hormoon (FSH) uit de hypofyse (fig 29). Geef je daar meer van, dan ovuleren er ook meer eicellen. Superovulatie is een vast onderdeel van een IVF behandeling (H16.3). Bij een andere techniek, de "ovum pick up" worden er in een normale cyclus uit de grotere tertiaire follikels eicellen omringd door cumuluscellen (fig 29) geogst. Deze techniek wordt gebruikt bij de kunstmatige voortplanting van rund en paard. Ook dan zou er bij de normale gang van zaken maar eentje bij de ovulatie vrij komen. Zowel bij superovulatie en "ovum pick up" red je follikels die mogelijk al op weg naar het einde waren. Wat we weten omtrent de variatie tussen deze eicellen bij superovulatie en "ovum pick up" komt in hoofdstuk 16.3.2 aan de orde.

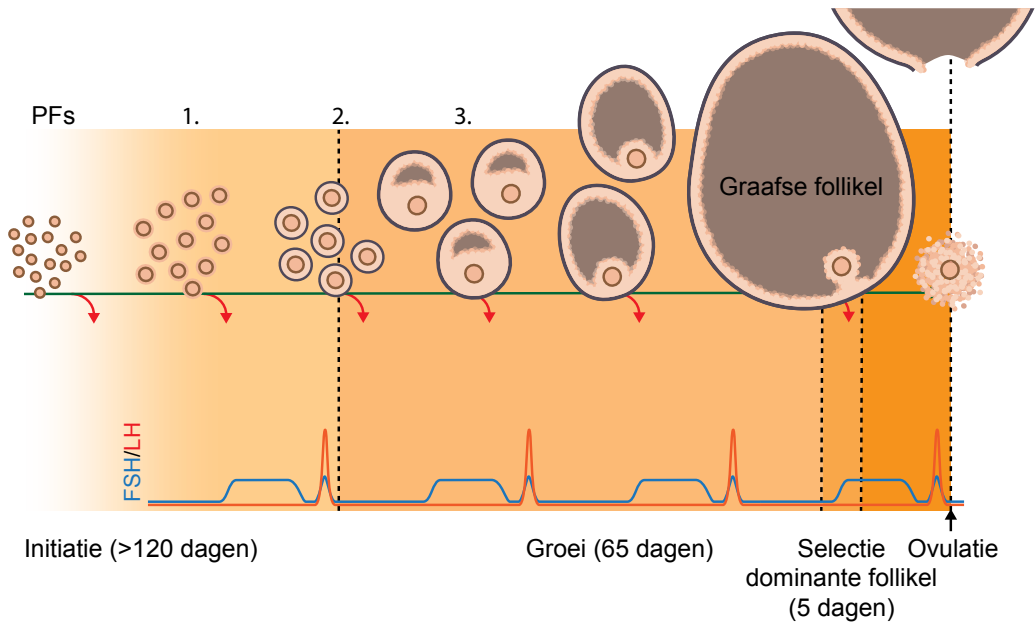


FIG 29

Het verloop van de follikelgroei en -selectie (zich uitend als **atresie** van de follikel) tegen de achtergrond van de cyclus. PF primordiale follikel. Primaire, secundaire en tertiaire follikels worden als in figuur 28 weer aangegeven met 1, 2 en 3. De eicel is simplistisch weergegeven. De cyclus wordt schematisch verbeeld door de concentratieschommelingen van de **gonadotrope** hormonen follikel stimulerend hormoon (FSH) en het luteïniserend hormoon (LH), de laatste als “Zeitgeber” van de ovulatie. De cumuluscellen van de rijpere tertiaire follikel, die de eicel omringen, dienen voor de ovulatie als een wolk uit, vandaar de uitdrukking cumuluscel expansie (zie ook fig 39).

11.2 Ontwikkelingen in de eicel

Omdat het moeilijk is om eicellen op ontwikkelingsstadium te zuiveren hebben onderzoekers met de muis als proefdier (en ons meeste inzicht komt daar vandaan) de eerste golf van follikelgroei na de geboorte gebruikt om de verschillende stappen in de ontwikkeling te bestuderen. Een eicel hoeft zijn ontwikkeling niet te hebben voltooid om van het zojuist beschreven “bevroren” diploten in de metafase van de eerste meiotische deling te komen (legenda fig 14). Zoals

we hiervoor zagen houden de granulosa cellen op commando van de eicel de voortgang van de meiose tegen. Wanneer je eicellen uit een jonge tertiaire follikel (fig 28) bevrijdt, waardoor ze niet meer in het diploteen blokkeren, dan kunnen ze zich in korte tijd ontwikkelen tot de metafase van de eerste meiotische deling. Wanneer dit trucje bij een wat grotere tertiaire follikel wordt herhaald, kan de 1^e meiotische deling van de primaire oocyt worden afgemaakt en organiseren chromosomen zich snel in een volgende delingsfiguur, die van de 2^e meiotische metafase van de secundaire oocyt (fig 13, 28, 39, 42). Deze eicellen kunnen worden bevrucht, maar de ontwikkeling van het embryo stopt in het 2 cellige stadium (fig 43). Bij de muis wordt in dit stadium "het stokje overgedragen". Dat wil zeggen dat de maternale en paternale chromosomen genen tot expressie gaan brengen, het eerste **mRNA** van embryonale oorsprong verschijnt. Om deze blokkade te overwinnen zijn eicellen uit grotere en rijpere follikels nodig. In de literatuur staat deze fase bekend als de "**Maternal to Zygote**" overgang (H13.5.3). Bij de mens vindt deze in het 4-8 cel stadium plaats.

Het mag duidelijk zijn dat voor de enorme groei van de eicel er veel eiwit nodig is, vele genen komen daarvoor tot expressie. Wanneer de follikel tertiair is geworden stopt deze **transcriptie** en verandert de structuur van de kern op een vergelijkbare manier bij muis, varken, aap, rund en mens. Het **constitutieve heterochromatine** van de **centromeergebieden** (H.2.3.2, fig 3) gaat rond het kernlichaampje liggen (fig 28). Eicellen die dit niet voor elkaar krijgen vallen af. Vanaf dat moment beginnen de kansen voor een door de eicel ondersteunde embryonale ontwikkeling zich te ontwikkelen. Omdat er nu geen genen meer worden afgeschreven, en er ook bij de muis nog een paar dagen overheen kunnen gaan voor de eicel zal ovuleren, worden mRNA moleculen, die coderen voor eiwitten die nodig zijn voor het afmaken van de meiotische delingen, in een soort van slaaptoestand gehouden. Dat geldt ook voor het mRNA van genen, die na de binnenkomst van de zaadcel noodzakelijk zijn voor het opstarten van de embryonale ontwikkeling, de "maternale effect" of "Maternal to Zygote" genen (H13.5.3). Bij de regulatie die nodig is voor het stabiliseren en tijdelijk buiten gebruik stellen van deze mRNA collectie zijn RNA bindende eiwitten betrokken die RNAs in grote complexen omsluiten. Het gaat hier te ver om in te gaan op de details van dit verwonderlijk ingewikkelde proces.

11.3 DNA herstel in de eicel

Hoe is de eicel in staat zichzelf en haar chromosomale DNA te beschermen tegen b.v. schade door milieu invloeden? En hoe gaat de eicel om met zuurstofschade opgewekt door de hoge

metabole-mitochondriële activiteit die nodig is bij de enorme groei aan het begin van de follikelontwikkeling (fig 28)? Een eerste inzicht is afkomstig uit onderzoek naar de effecten van ioniserende straling op het ontstaan en overleven van **mutaties**. De naweeën van de atombombardementen op Japan aan het eind van de Tweede Wereldoorlog, de introductie van kernenergie en de mogelijke bijwerkingen van het toepassen van beeldvorming met behulp van ioniserende straling in het ziekenhuis, het zijn allemaal redenen waarom er vooral in de tweede helft van de vorige eeuw veel onderzoek gewijd is aan de genetische risico's van straling voor het nageslacht. Meestal werd de muis hiervoor in grote aantallen als proefdier gebruikt. Naarmate de **cytogenetica** zich ontwikkelde kon je beter naar individuele cellen in de **kiembaan** kijken en dat verminderde het aantal benodigde proefdieren enigszins.

Ergens in de herfst van 1971, toen ik op de MRC radiobiology unit in Harwell rond liep, had de bekende onderzoekster Mary Lyon het over een stadium van de **oogenese**, dat bij de muis onredelijk gevoelig bleek te zijn voor straling. Deze observatie bracht ze, zoals dat gaat op laboratoria waar wetenschap een dagtaak is, tijdens de morgenkoffie te berde. Mary Lyon had gezien dat de worpgrootte door stralingsschade in dit stadium helemaal instortte en zich niet herstelde. Later werd dit bij andere knaagdieren zoals de Chinese hamster ook gevonden maar niet in een zo extreme mate als bij de muis. Het moment van de grootste gevoeligheid bleek samen te vallen met het organiseren van de primordiale follikels rond en net na de geboorte. Nu 48 jaar later kan je speculeren dat dit fenomeen wel iets te maken zal hebben met de defensie tegen retrotransposon integraties zoals recent in Baltimore ontdekt (H11.1). De mysteries rond deze tijdelijke supergevoeligheid in de oogenese zijn echter nog verre van opgehelderd.

In het stadium van de organisatie van de primordiale follikels staat het hele systeem van DNA schade detectie op scherp en beschadigingen wordt nauwelijks getolereerd (H2.2.1, fig 4). Dat betekent dat bij het optreden van schade de oocyt toch vooral kiest voor de dood en deze eigenschap zullen de primaire oocyten in de primordiale follikels ook later in het leven met zich meenemen. Een belangrijke surveillerende en regulerende rol in de detectie van DNA schade en de reactie daarop is in de eicel wederom weggelegd voor het eiwit p53 maar wordt nu ook vervuld door het eiwit p63, een ander familielid van de p53 familie (H2.2.1, fig 4, de politiemannetje in fig 33). Niet iedere vorm van DNA schade leidt tot een keus voor apoptose. In de uitgangsreserve (H11.1) van primaire oocyten is er soms wel degelijk sprake van breukherstel. Het was in de wereld van de gynaecologie opgevallen dat vrouwen die drager zijn van een BRCA mutatie een verkort reproductief leven hebben. Omdat BRCA1 (en BRCA2) betrokken zijn bij het herstel van dubbelstrengs DNA breuken, is een mutatie in een enkele kopie van *BRCA1* (naast *BRCA2*)

een genetische predispositie voor een sterk verhoogde kans op borstkanker. Bij *BRCA1/Brca1* **heterozygoten** van mens en muis worden in de in eerste instantie overlevende oocyten bij oplopende leeftijd meer dubbelstrengs DNA breuken gevonden. Een zeker niveau van tolerantie waarbij apoptose wordt vermeden is dus in deze oocyten aanwezig. Tegelijkertijd is de surveillance door p53 (fig 4) en p63 verantwoordelijk voor de desastreuze effecten van chemotherapie op de vrouwelijke fertiliteit. Begin deze eeuw bleek dat de leeftijd van de menopauze (en dus de omvang van de oocytenpopulatie) een hoge erfelijkheidsgraad heeft (H6.1). Met behulp van hedendaags GWAS onderzoek (H6.2) is dit verschijnsel nu te onderbouwen met de detectie van betrokken **loci**. Een hele grote studie waarin deze aanpak werd benut is in de zomer van 2021 in Nature gepubliceerd. Bij de 290 posities op het genoom waar genetische variatie gerelateerd kon worden aan de leeftijd van de menopauze, zaten liefst 35 genen die betrokken zijn bij de "**DNA damage response**" (schade detectie, reparatie en de uitvoering van de checkpoint controle, fig 4).

Wat we weten van het DNA herstel van primaire oocyten in groeiende follikels is eigenlijk verbazingwekkend weinig. Zou er bij al die follikelatesie (H11.1) geen selectie zijn tegen follikels met een eicel die DNA schade bevat? In 1974 publiceerde Mary Lyon met een van haar medewerkers een proef die nu weliswaar vrijwel vergeten is maar qua inzicht wel het een en ander bijdraagt. De volwassen ovaria ontvingen een flinke klap ioniserende straling (4 Gy) waarvan de gevolgen in de eerste en derde week erna werden bestudeerd. Een indruk van de schade die dit aan de bivalenten toebrengt, kun je krijgen door de eicellen uit de rijpere tertiaire follikels te bevrijden en na het hervatten van de meiose de metafase van de eerste meiotische deling met de lichtmicroscop te bekijken. Straling veroorzaakt onder meer structurele chromosoomafwijkingen (H3.4.1) en zo zie je bijvoorbeeld bivalenten die door een verkeerd herstel van dubbelstrengs DNA breuken met elkaar verbonden zijn. Sommige eicellen overleefden de bestraling niet, maar de eicellen die dat wel deden bevatten zowel in de eerste week als na 2-3 weken relatief veel chromosoomafwijkingen. Dit is te verklaren uit foutief of mislukt herstel van deze dubbelstrengs DNA breuken. Eicel en follikel lijken geen erg actief beleid te hebben om tegen deze chromosoomafwijkingen op te treden. De eicellen uit de bestraalde jongere follikels bevatten nog meer afwijkingen dan de eicellen die binnen een week na het bestralen uit de rijpere follikels werden bevrijd. Een eerste hint dat de eicel kort voor ovulatie nogal relaxt omgaat met de regulatie van aan DNA schade gekoppelde checkpoints in de celcyclus (H2.2.1 en fig 4) was al zo'n 10 jaar daarvoor verkregen.

In 1963 verscheen er een artikel van Robert Edwards, een van de vaders (en Nobelprijswinnaar hiervoor) van de reageerbuisbaby, en mijn grote inspirator Tony Searle (H10). Vrouwjesmuizen werden ingespoten met een hormoon dat wordt gewonnen uit het bloed van drachtige merries (PMSG). Dit hormoon bootst de werking van het gonadotrope follikel stimulerend hormoon (FSH) na (fig 29). Na 48 uur zijn de follikels voldoende gegroeid en kunnen in een volgende stap de muizen met humaan chorion gonadotropine (HCG) in worden gespoten. HCG is het substituut voor het lichaamseigen LH (fig 29). Net als LH zet HCG de follikels aan tot ovulatie, nadat de eicellen de eerste meiotische deling hebben afgemaakt en halt houden in de metafase van de tweede meiotische deling (fig 28, 39, 42). Het hele proces duurt bij de muis een uurtje of twaalf. Dit protocol om met gonadotrope hormonen op een “getimede” manier meer eicellen te krijgen, was al in 1957 door Ruth Fowler samen met haar echtgenoot (Robert (Bob) Edwards) gepubliceerd. Edwards’ en Searle’s onderzoek leerde dat vanaf het weer opstarten van de meiose door HCG, de eicellen bij oplopende contractie van het chromatine steeds stralingsgevoeliger worden. Dat zagen ze als een piek in de embryonale sterfte vanaf de implantatie. Bij een stralingsdosis van 2 Gy overleefde nog maar 25% van de normaal bevruchte eicellen tot aan het eind van de embryonale periode. In 1991 herhaalden we in Wageningen de proef van Edwards en Searle en keken we naar de chromosomen van de moeder op het moment van de eerste klievingsdeling van de **zygote** (fig 42). We zagen dat, ondanks het aanbrengen van dubbelstrengs DNA breuken door straling kort voor de ovulatie, dit stadium in het normale tempo werd bereikt. Er was “herstel” van de breuken, maar heel vaak met een structurele chromosoomafwijking (H3.4.1) tot gevolg. Zoals hiervoor al vermeld, zitten deze de embryonale ontwikkeling daarna bijna altijd in de weg.

Eerder was in Harwell ontdekt, dat het “repareren” van deze vaak gecompliceerde breuken al in de uren na de bestraling plaats kan vinden, terwijl de bivalenten korter worden en zich opmaken voor de eerste meiotische deling. We weten nu, dat de controle van de celcyclus (H2.2.1, fig 4) tijdens de meiotische delingen van de eicel, alhoewel die echt wel bestaat, op heel speciale wijze is gereguleerd. Dit is iets dat hierna bij het onderwerp **non disjunctie** weer terugkomt.

Al met al begrijpen we dus betrekkelijk weinig van de manieren waarop de eicel tijdens haar vaak lange leven omgaat met bedreigingen voor de integriteit van het DNA. Wanneer er tegenwoordig onderzoek naar mutaties wordt gedaan gaat dat met behulp van **NGS (WES, WGS)**, de bepaling van de basenvolgorde van het genoom (H3.2, tabel 3). Vanuit de afdeling genetica van de medische faculteit van de Radboud Universiteit in Nijmegen, promoveerde in 2019 Jacob Goldmann op een proefschrift getiteld “Characterization of *de novo* mutations in the human

germ line". De proefopzet die systematisch werd gebruikt staat bekend als "trio sequencing". Je hebt DNA nodig van de vader, van de moeder en van één of meer kinderen. Door nu base voor base de kinderen te vergelijken met de ouders kun je erachter komen op welke posities het kind een andere base heeft dan de ouders. Via deze aanpak zie je de **SNPs** als het ware ontstaan (H3.2, tabel 3). Vergelijkbaar onderzoek vindt nu op verschillende plekken in de wereld plaats en de resultaten bevestigen elkaar. De uitkomsten lijken geruststellend, want de veranderingen op het niveau van de enkele base zijn in de kiembaan per generatie niet heel groot (tabel 3). Het bijzondere van het werk van Jacob Goldmann was dat hij een heel groot bestand aan trio's had (1291) waardoor hij de invloed van de leeftijd van de moeder kon schatten (de invloed van de leeftijd van de vader op het aantal *de novo* basenpaar veranderingen komt in H12.3 en H12.13 aan bod, zie ook tabel 3). In de kinderen met een wat oudere moeder zag hij iets gek.

Ten eerste waren daar meer mutaties aanwezig dan bij jongere moeders. Bovendien bleek uit zijn analyses (die veel te complex zijn om hier weer te geven), dat deze mutaties leken te zijn ontstaan als bijproduct van de reparatie van een meiotische dubbelstrengs DNA breuk. Ook deze bevinding wordt nu breder gedeeld. Een nog op te lossen puzzel blijft het verschijnsel dat bij het ouder worden het aantal cross overs in de te ovulieren eicel stijgt en dat de fractie die daarvan "ingewikkeld" is ook verder toeneemt. Een van de stellingen bij zijn proefschrift gaat over ons gebrekkige inzicht in het DNA onderhoud van de eicel en de reactie daarop in de follikel. Dat komt omdat onderzoek op DNA niveau op individuele eicellen in relatie tot de fysiologische status van de follikel nog steeds moeilijk is.

11.4 Non disjunctie

Onder non disjunctie verstaat men het niet goed uit elkaar gaan van de chromosomen tijdens de eerste meiotische deling, en van de **chromatiden** tijdens de tweede meiotische deling of tijdens een mitotische deling. Dit leidt tot afwijkingen in het aantal chromosomen van de dochtercellen, **aneuploïdie**.

Als een soort van vuistregel in de gynaecologie geldt dat wanneer alle herkende zwangerschappen bij elkaar worden opgeteld, zo rond de 15% (10-20% en oplopend met de leeftijd van de moeder) in een spontane abortus eindigt. Hoe hoger het kindertal, hoe groter de kans om er als gezin mee te maken te hebben. Midden 70-er jaren werd voor het eerst aangetoond, dat embryo's met een afwijkend aantal chromosomen hier sterk aan bijdragen (H3.4.2). Momenteel wordt het aandeel van door meiotische en vroeg embryonale mitotische (H16.3.1) fouten

veroorzaakte monosomieën (45,X) en trisomieën (vooral voor de chromosomen 15, 16, 21, en 22) geschat op minstens 35% van het totale aantal spontane abortussen.

11.4.1 Leeftijdseffecten

Wanneer iets het onderzoek naar het meiotische gedrag van de eicel gestimuleerd heeft is dat wel het plaatje van de Engelse onderzoeker Lionel Penrose, midden jaren 50 gepubliceerd in het tijdschrift *De Lancet*. Op deze grafiek zie je de relatie tussen de leeftijd van de moeder en de kans op een kind met Down syndroom (trisomie 21), met de duidelijke toename van die kans vanaf 35 jaar. Tussen rond de 25 en boven de 40 wordt die kans 15x groter. In de jaren 70 en 80 werd door het tellen van de chromosomen in eicellen, die klaarliggen om bevrucht te worden (fig 42), duidelijk dat het leeftijdseffect op non disjunctie (fig 30) ook bij de muis bestaat, alhoewel het veel kleiner is. Dat verminderde de waarde van de muis als proefdier voor onderzoek naar non disjunctie bij de mens. Om heel begrijpelijke redenen is het bij de mens moeilijk om in embryo's rond de implantatie een indruk te krijgen van het leeftijdseffect op non disjunctie, wanneer alle chromosomen in de analyse worden betrokken. Met behulp van kunstmatige voortplantingstechnieken is dat nu wel mogelijk. In 2013 verscheen er een publicatie uit de USA waarin van 15.169 opvolgende **blastocysten** (fig 43) in de kliniek een trofoblast biopt was genomen, dat vervolgens met SNP technologie (H3.2) werd geanalyseerd op de aanwezigheid van aneuploidie. De leeftijd van de moeders die bij deze analyse betrokken waren varieerde tussen de 22 en 45 jaar. Het percentage aneuploïde blastocysten lag tussen de 20 en de 90%. Van 25 tot 30 jaar is er een dal, met een geleidelijke stijging daarna die bijna lineair is en rond 45 jaar bij 90% eindigt. Al eerder was bekend dat de toename van non disjunctie voor de verschillende chromosomen in de tijd een verschillend verloop kan hebben; vergeleken met chromosoom 21 is chromosoom 16 al veel eerder een risicofactor.

In 1968 postuleerde Robert Edwards samen met zijn collega Henderson dat eicellen van de muis, die prenataal in het zojuist ontstane ovarium als eerste aan de meiose beginnen, ook als eerste aan bod komen bij follikelontwikkeling en ovulatie. Dit werd bekend als de "production line hypothesis". De wetenschappelijke betekenis hiervan had alles te maken met de hier geschetste relatie tussen de leeftijd van de moeder en de kans op een kind met Down syndroom. De onderzoekers keken naar de morfologie van de bivalenten van de eicel, zo tegen het moment van het uit elkaar gaan van de homologe chromosomen, een paar uur voor de ovulatie. De hiervoor

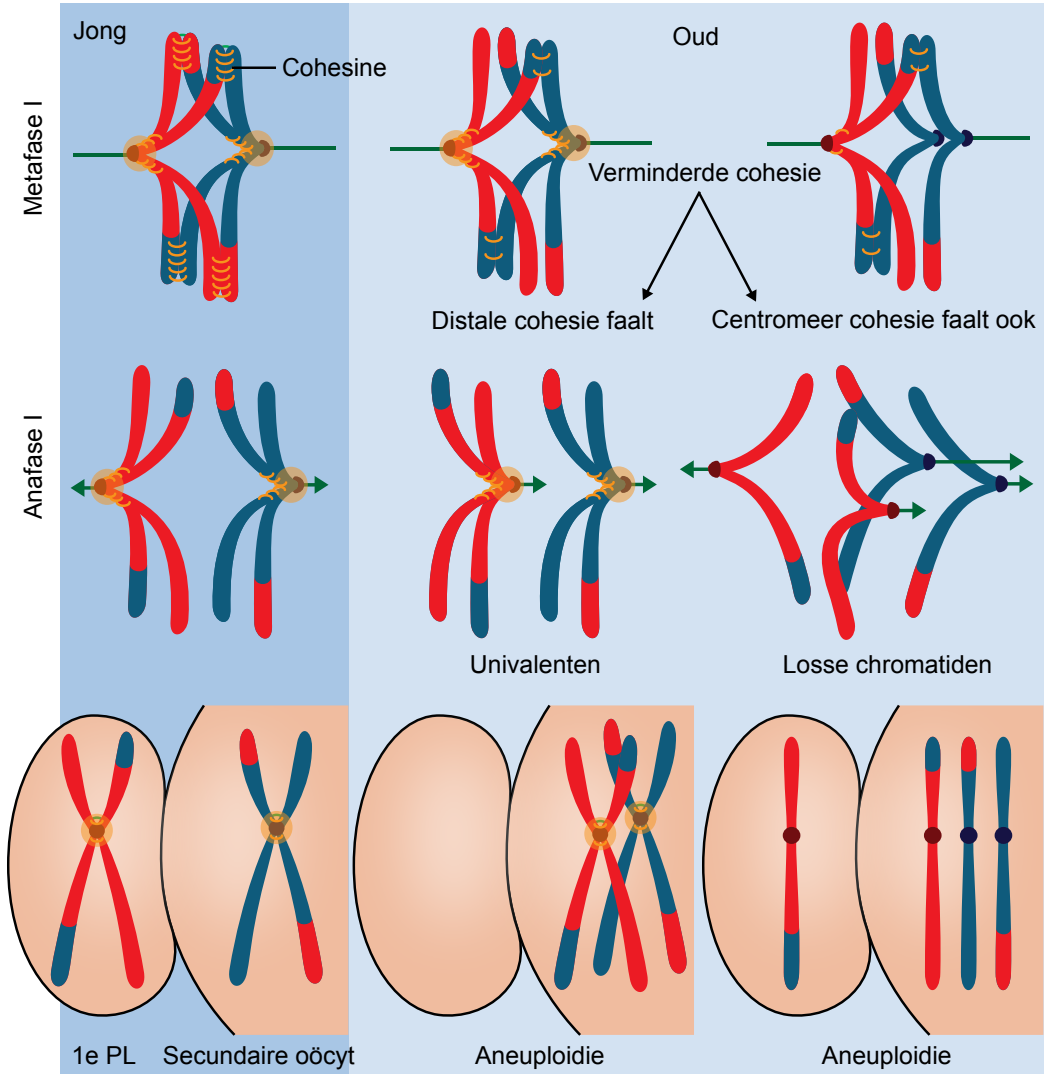


FIG 30

Een nog steeds simplistische voorstelling van het mechaniek achter het vergrote risico van **non disjunctie** bij veroudering van de eicel in het ovarium. Centraal hierin staat de achteruitgang van de functionaliteit van het **cohesine complex** (zie fig 6), het wordt hier als een dunne gele ring voorgesteld. Normaliter blijft dit complex tijdens de eerste meiotische deling bij het **centromeer** aanwezig. Door het verminderde onderhoud aan het cohesine complex, o.a. als een gevolg van veroudering, hebben de **bivalenten** een groter risico om geheel of gedeeltelijk voortijdig uiteen te vallen (rechts) en worden de centromeergebieden vatbaar voor een voortijdige splitsing in **chromatiden**. Welk numeriek afwijkend chromosoomcomplement in het poollichaampje komt en welke in de eicel is naar men aanneemt gebaseerd op het toeval.

gebruikte techniek kwam in hoofdstuk 3.4 al langs, maar is, wanneer het om een enkel cel (of een paar cellen) gaat wat uitdagender.

Wat na het kleuren meteen door de microscoop opviel is het grote verschil tussen de bivalenten van de eicellen uit jonge en oude vrouwtjes. Die van de jonge vrouwtjes zijn veel langer en gedetailleerder, de **chiasmata** (fig 14) zijn beter te tellen. Bij de oudere vrouwtjes ziet alles er veel wolliger uit en zijn de chiasmata aan het eind van een bivalent vaak niet meer te zien. Soms liggen de homologe chromosomen los, maar nog wel tegenover elkaar (fig 30), niet bestand tegen de krachten van het spreiden van de eicel op het microscoopglasje. Dat zagen Hender-son en Edwards als eersten, en ze veronderstelden dat dat te maken had met een lager aantal cross overs in eicellen, die later in de “productielijn” van het foetale ovarium zitten. Nu we die aantallen cross overs gewoon m.b.v. MLH 1 immunofluorescentie door de microscoop kunnen tellen (H5.2, H11.1, fig 15), weten we dat dat bij de mens niet opgaat. Nog intrigerender is de hier-voor gemelde recente vinding dat bij onze soort met het stijgen van de leeftijd bij de te ovuleren eicellen juist meer cross overs worden gezien.

11.4.2 Mechanismen

Met de publicatie van slechts één auteur werd in 1991 meer duidelijk. Ruth Angell was werkzaam op de MRC Clinical and Population Cytogenetics unit naast het Western General Hospital in Edinburgh (H3.4.2). Ze had toegang tot een IVF kliniek en toestemming om naar de chromosomen te

kijken van eicellen die niet waren bevrucht. In 38 chromosoomportretten van de metafase van de 2^e meiotisch deling (fig 13; de chromatiden hangen alleen bij het **centromeer** aan elkaar), vond ze in 4 een afwijkend beeld met losse chromatiden. Kennelijk en vooruitlopend op het afmaken van de 2^e meiotische deling waren er al eerder chromosomen in chromatiden gesplitst (fig 30).

In 2005 werd duidelijker wat hierbij een rol speelt. In de groep van Pat Hunt, toen in Cleveland Ohio, werd via genetische manipulatie (box 3) een muizenstam gecreëerd met een defect in een **gen** dat codeert voor één van de eiwitten van het **cohesine complex** (H2.2.2, fig 6), het eiwitcomplex dat de twee zusterchromatiden bij elkaar houdt. Ze zagen een sterk op de leeftijd van de mutante muizen reagerende verstoring van de bivalenten. In de eicellen van relatief jonge vrouwtjes van vier maanden oud, waren deze bivalenten in 4 losse chromatiden opgelost. Maar de techniek schrijdt verder: nu kunnen eicellen *in vitro* microscopisch worden gevolgd terwijl ze zich rond de eerste meiotische deling bevinden. In 2015 wordt hiervan verslag gedaan vanuit Zweden. De onderzoekers gebruikten eicellen van jonge en oude muizen en vrouwen. Bij de eicellen van oude muizen en van vrouwen boven de 35 jaar, laat een chiasma makkelijker los (fig 30). De **univalenten** die zo ontstaan worden daarna gevoelig voor een splitsing in chromatiden: feitelijk gebeurt dit een deling te vroeg. Het ligt voor de hand dat veroudering van de eicel hierin een belangrijke rol speelt.

Wat we vroeger dachten, dat om bijvoorbeeld een kind met Down syndroom te krijgen het nodig was om de hele bivalent van chromosoom 21 in de dochter secundaire oocyt te manoeuvreren, is niet altijd het geval. Ook de locatie van crossing over op het chromosoom draagt bij aan het risico voor riskant meiotisch gedrag. Soms is crossing over afwezig (chromosoom 18) maar ook een enkele cross over die dicht bij de **telomeren** gelokaliseerd is predisponeert samen met veroudering tot non disjunctie (fig 15). Dit komt veel voor bij chromosoom 16, het chromosoom dat in de vrouwelijke meiose het meest frequent in de fout gaat. Chromosoom 21 kent alle situaties die de kans op een incorrecte verdeling tussen eicel en poollichaampjes verhogen: crossing over dicht op het centromeer is hier ook nog een factor.

In hoofdstuk 2.2.1 zijn de celcycluscheckpoints G2 > M en het “spindle assembly checkpoint” (SAC) aan de orde geweest (fig 4). Dan zou je toch kunnen aannemen dat wanneer het tijdens de vrouwelijke meiose fout loopt, deze controle mechanismen in werking treden? “State of the art” moleculair en celbiologisch werk van de afgelopen jaren bij voornamelijk de muis heeft aangetoond dat hier in de eicel toch iets bijzonders aan de hand is. De eicel controleert namelijk wel of de centromeren met de **spoelfiguur** verbonden zijn maar is daar relatief slordig in. Het reageert niet op een paar bivalenten die zich niet correct in de spoelfiguur van de eerste meiotische deling

oriënteren, terwijl aan het gedrag van bij het SAC betrokken eiwitten te oordelen, het “checkpoint” wel bestaat. De effectiviteit van de SAC is bovendien sterk leeftijdsafhankelijk want veel minder effectief in oude muizen. Ook redelijk hoge niveau's van dubbelstrengs DNA breuken die aan de contraherende bivalenten worden toegebracht brengen het systeem niet van haar stuk. Terwijl ondertussen al een heel deel van de breuken, correct of incorrect worden gerepareerd, gaan de meiotische delingen gewoon door.

Uit al dit onderzoek blijkt, dat de eerste meiotische deling de voornaamste bron is voor het ontstaan van afwijkingen in het aantal chromosomen van de eicel. Kennelijk wordt het cohesine complex (fig 6, 30) bij het verouderen slecht onderhouden. Maar ook fysiologische achtergronden, bijvoorbeeld de hormoonhuishouding in combinatie met de leeftijd, doen er toe. Wat bij de humane eicellen ook nog een rol speelt is de relatief lange duur van de opbouw van de spoefiguur (16 uur) en de instabiliteit ervan, ook in het contact met de centromeren. Ook wordt de communicatie van de eicel met de cumuluscellen (fig 28) er met het klimmen der jaren niet beter op. In 2022 verscheen er over dit onderwerp weer een prachtig overzicht vanuit de groep van Melina Schuh van het Max Planck Instituut in Göttingen. Het illustreert de verschillende aspecten van meiotische non disjunctie in oocyten op een bijzonder mooie manier. Wat opvalt is de aandacht die er nu aan **oxidatieve stress** wordt besteed als een factor bij onregelmatigheden in de meiotische delingen. Kan een primaire oocyt daar wat aan doen?

Ook in 2022 verscheen er een belangrijke publicatie die daarop in gaat. In de primaire oocyten van de primordiale follikels (fig 13, 28) is een enzym complex van de mitochondriële ademhalingsketen (complex I) zo veranderd dat het inactief is, waarmee de productie van zuurstofradicalen (H14) wordt verminderd.

Veroudering is een relatief begrip en het tempo waarin dit optreedt is individueel verschillend. De voorraad primordiale follikels bij de geboorte is variabel, en het tempo van het legen daarvan tot aan de puberteit ook. Dit resulteert in een vrij grote spreiding in de leeftijd van de laatste ovulatie, van 35 tot 45 jaar. Niet duidelijk is of en hoe een vroegere uitputting van de voorraad aan oocyten de kans op fouten bij de eerste meiotische deling beïnvloedt. Kennelijk is er nooit in onze evolutionaire geschiedenis veel selectiedruk geweest op het krijgen van kinderen op een wat oudere leeftijd.

Nog even terug naar Robert Edwards en de “production line hypothesis”. Volgens het mooie review van Danielle Monniaux van het INRA Nouzilly in Frankrijk uit 2014 bestaat deze wel, maar zoals hiervoor vermeld is er niet sprake van een daling van het aantal cross overs in foetale eicellen die later aan de meiose beginnen. Wat Edwards en Henderson dus vooral zagen, was

de aflopende functionaliteit van het cohesine complex in de bivalenten, waardoor bij veroudering van de eicellen de zusterchromatiden te vroeg loslaten (fig 30).

11.4.3 Invloeden van buiten

Bij een systeem dat zo kwetsbaar is als de meiotische delingen van de eicel, vraag je je af hoe makkelijk niet-lichaamseigen stoffen hier invloed op kunnen hebben. Dit boek is geen toxicologisch-genetische verhandeling, maar twee voorbeelden wil ik toch geven omdat ze zo dicht bij de dagelijkse praktijk liggen. Een voorbeeld van een alom voorkomende chemische verbinding is bisphenol A, afgekort BPA, dat wordt gebruikt om plastic af te harden. De groep van Pat Hunt heeft het meiotische effect van BPA bij toeval ontdekt. In 2003 beschreven zij problemen bij het zich in de metafase ordenen van de bivalenten in eicellen van muizen in hun laboratorium. Meestal was er niet sprake van een totale chaos maar wel van onregelmatigheden waarbij non disjunctie optrad. De muizen zaten in oude bakken van makrolon, een harde polycarbonaat plastic, dat m.b.v. BPA wordt geproduceerd. Bij het gebruik en het schoonmaken raken de bakken licht beschadigd en komt BPA vrij in de omgeving. Dit verklaarde het waargenomen meiotische effect want na de aanschaf van nieuwe bakken verdwenen de onregelmatigheden totaal. In vervolgonderzoek dienden de onderzoekers BPA in verschillende doses toe en keken ze naar het effect van zowel de duur als ook de belasting. De concentraties waarbij er al iets te zien was, kwamen overeen met concentraties, die voor humane omstandigheden niet ongewoon zijn. De resultaten verschenen in 2003 in *Current Biology*, een gerenommeerd tijdschrift. Dit werk trok bijzondere aandacht omdat BPA veel toepassingen heeft en omdat lage concentraties ervan ook bij de meeste mensen kunnen worden aangetroffen. We weten nu dat BPA het receptoreiwit van **oestrogenen**, op de celwand van de granulosa-cellen (fig 28) herkent. Daarmee is het een "**endocrine disruptor**".

Nu het tweede voorbeeld. In 1982 publiceerde Matthew Kaufman (box 2) dat je met alcohol een geovuleerde eicel (fig 42) kan foppen. De eicel raakt geactiveerd en gaat zonder de bagage van de zaadcel als **parthenogenont** het pad van de embryonale ontwikkeling op (H10).

Allerlei uitkomsten zijn mogelijk, het embryo kon **haploïd** of **diploïd** worden of iets er tussenin. Uiteindelijk leidde dat weer tot een andere nieuwe ontdekking, die van een effect van alcohol (ethanol) op de correcte verdeling van de chromosomen in de 2^e meiotische deling van de eicel. Kwam dit nu door de manier van activeren van de eicel (H13.5.1) of is het een effect van alcohol op de spoelfiguur? Het laatste lijkt waarschijnlijker. In 1987 publiceerde dezelfde Pat Hunt het resultaat van een onderzoek naar ethanol en non disjunctie bij de eerste meiotische

deling van de mannelijke muis. Alhoewel dit proces niet zo gevoelig is als de vrouwelijke meiose, was er wel een effect te zien, namelijk incidenteel een abnormale afloop van de meiose. Destijds was dit een opzienbarende ontdekking. Maar schrik niet: sociaal drinken levert niet dit soort risico's op. Daarvoor zijn de promillages die deze onderzoekers in hun experimenten gebruikten veel te hoog.

11.5 Eicelkwaliteit

Prenatale sterfte en de hoofdmoot daarvan, de embryonale sterfte, zijn normale fenomenen in de reproductie van zoogdieren. Veetelers zagen het als een verliespost op weg naar sneller drachtig worden bij het rund en grotere worpen bij het varken. Je bepaalt de sterfte bij zoogdieren door het aantal gele lichaampjes (fig 28) op de eierstokken te tellen en die te vergelijken met b.v. het aantal implantaties. De gele lichaampjes of corpora lutea ontstaan uit de leeggelopen follikels die overblijven na het bevrijden van de eicellen, en geven zo een idee van het aantal eicellen dat vrijgekomen is. In mijn scriptie uit 1971 wordt voor gelten (eersteworps zeugen) een schatting van 25% tot aan de geboorte gegeven. Veruit de meeste eicellen worden bevrucht en de meeste sterfte vindt aan het begin van de dracht plaats. De nog niet geïmplanteerde embryo's van dag 8 tot 11, waaraan ik probeerde chromosoomonderzoek te doen, kwamen uit uitgerangeerde zeugen van één tot een paar jaar oud die nog een keer gedekt werden. De sterfte was extreem variabel, van onder de 10% tot bijna alles.

Met de aanname dat pre implantaire sterfte het verlengstuk is van eicelkwaliteit, schreven we daar in Wageningen (aan de Landbouwwuniversiteit) in de 2^e helft van de jaren 80 een intern discussiestuk over. We werkten met muizen, ratten en varkens. Hoe per individuele eicel de "kwaliteit" is te bepalen, als ze er door de microscoop allemaal ongeveer hetzelfde uitzien, was toen een grote vraag en dat is het eigenlijk nog steeds. We gaven de volgende indicaties voor de omvang van de prenatale sterfte: de knaagdieren muis, rat, hamster en konijn hebben de laagste sterfte, tot 15%. We vonden 20-40% sterfte voor rund en varken en 25-50% sterfte voor de mens. Een begrip als de "Maternal to Zygote" overgang (H13.5.3) was nauwelijks bekend en de moleculaire technieken om hier handen en voeten aan te geven waren in de jaren 80 voor materiaal dat zo schaars is als een eicel, niet aanwezig. Bij de soorten die per cyclus in de regel een enkele nakomeling geboren laten worden, leidt de bevruchting niet noodzakelijkerwijs tot nageslacht. Het idee dat variatie in de "Maternal to Zygote" overgang hier achter zit, komt in hoofdstuk 13.5.3 en hoofdstuk 16.3.2 verder aan bod.

11.6 Oogenese *in vitro*

In een commentaar uit 2018 noemt John Eppig van het Jackson laboratorium Bar Harbor, Maine USA, een bekende en zeer succesvolle onderzoeker naar vele aspecten van de oogenese, twee redenen waarom follikelontwikkeling *in vitro* zo nuttig zou zijn. a) Het kan vrouwen helpen bij het bewaren van vruchtbaarheid en beschermen tegen onvruchtbaarheid na chemotherapie en b) het zou ingezet kunnen worden bij het redden van diersoorten van de ravage die de mens op aarde aanricht. De onder (a) genoemde *in vitro* toepassing zal inmiddels minder belangrijk zijn geworden door nieuwe mogelijkheden om de weefsellaag onder het epitheel van het ovarium, waar de primordiale follikels zich bevinden, in te vriezen en later bij een hopelijk geslaagde behandeling en kinderwens weer terug te transplanteren. Alhoewel deze procedure internationaal op brede schaal wordt toegepast, wordt deze mogelijkheid in Nederland vanwege financiële beperkingen maar in een paar academische centra aangeboden. Toch kun je ook in Nederland niets vermoedend naar het NOS journaal kijken en een gynaecoloog in witte jas horen vertellen dat folliculogenese *in vitro*, voor de mens aanstaande is. Ook dit pad is John Eppig als gangmaker ingeslagen. Het onderzoeksveld in de reproductiewetenschappen heeft altijd gestreefd naar *in vitro* modellen om de mogelijkheden tot het bestuderen van de levensprocessen te vergroten en nu met gebruik van de stamceltechnieken en celdifferentiatie methoden (box 2) het proefdiergebruik te verminderen. Wat dan de grote drive van een klasse van onderzoekers op uitbreiding van het *in vitro* traject in de humane reproductiebiologie verklaart? Het zal onze medische gerichtheid op het individu zijn.

De tweede, onder (b) genoemde toepassing betreft pogingen om diersoorten voor uitsterving te behoeden, de noordelijke witte neushoorn is hiervoor een goed voorbeeld. Wanneer van de twee overgebleven vrouwtjes van deze diersoort primordiale follikels in kweek zouden kunnen worden gezet en het verder een kwestie van afwachten is om daar de rijpe eicellen uit te oogsten, was de kans wellicht groot geweest dat je embryo's van de twee geslachten had verkregen. Van de twee nu in de publiciteit verschenen ingevroren blastocysten die men uit de noordelijke witte neushoorn heeft verkregen en bewaard, moet je dat nog maar afwachten. De reproductiebioloog Bernhard Roelen merkte bij een lezing over reproductietechnologie ook nog op, dat je de witte neushoorn wel kon proberen te behouden, maar dat je dan wel een veilig biotoop moet kunnen garanderen. In hoofdstuk 13.7 en hoofdstuk 16.7 komen de voor mens en dier gebruikte *in vitro* fertilisatie en embryo technieken weer terug en in hoofdstuk 16.7 komt *in vitro* **gametogenese** uitgebreider aan bod.

Spermatogenese

12.1 Inleiding

Het onderzoek naar de **spermatogenese** van zoogdieren kent een trouwe schare beoefenaars. Voor sommigen van hen is het zelfs een levenslange verslaving. Sinds de komst van de **knock-out** muizenmodellen in de negentiger jaren van de vorige eeuw (H4.1, box 3) vindt de grote bulk aan onderzoek naar de vele verschijnselen tijdens de spermatogenese vooral bij deze diersoort plaats. Eerder was de endocrinologie (leer der hormonen) een belangrijke ingang, terwijl de reactie van de spermatogenese op ioniserende straling ook tamelijk centraal in de belangstelling stond, zo vanaf de jaren 60 van de vorige eeuw. Je zou ook denken dat het anticonceptie onderzoek zich met enige kracht op de spermatogenese heeft geworpen maar dat is niet het geval. In artikelen met een aanknopingspunt voor deze toepassing wordt het tijdelijk blokkeren van de spermatogenese wel genoemd maar daarna blijft het in de regel stil. Recent is er vanuit de USA/China op dit terrein het een en ander gemeld over het gebruik van het plantaardige stofje triptonide (zie verder in H12.6).

Je kunt de spermatogenese gemakkelijk opknippen in drie deelprocessen: 1) de **mitotische** vermenigvuldiging van de **diploïde** spermatogonia vanuit de spermatogoniale stamcellen, 2) de overgang, via een laatste mitotische deling naar het bestaan als **meiotische** cel. De spermatogonia zijn nu spermatocyten geworden, en tenslotte 3) na de meiotische delingen de **haploïde** fase waarin de spermatiden transformeren tot spermatozoa, een proces dat we **spermiogenese** noemen (fig 31). Wanneer het eindstadium daarvan is bereikt laten de cellen los van de wand van de testisbuisjes en komen in het lumen terecht, een proces dat met de term **spermie** wordt aangeduid. Dan begint het transport van de zaadcellen naar de bijbal

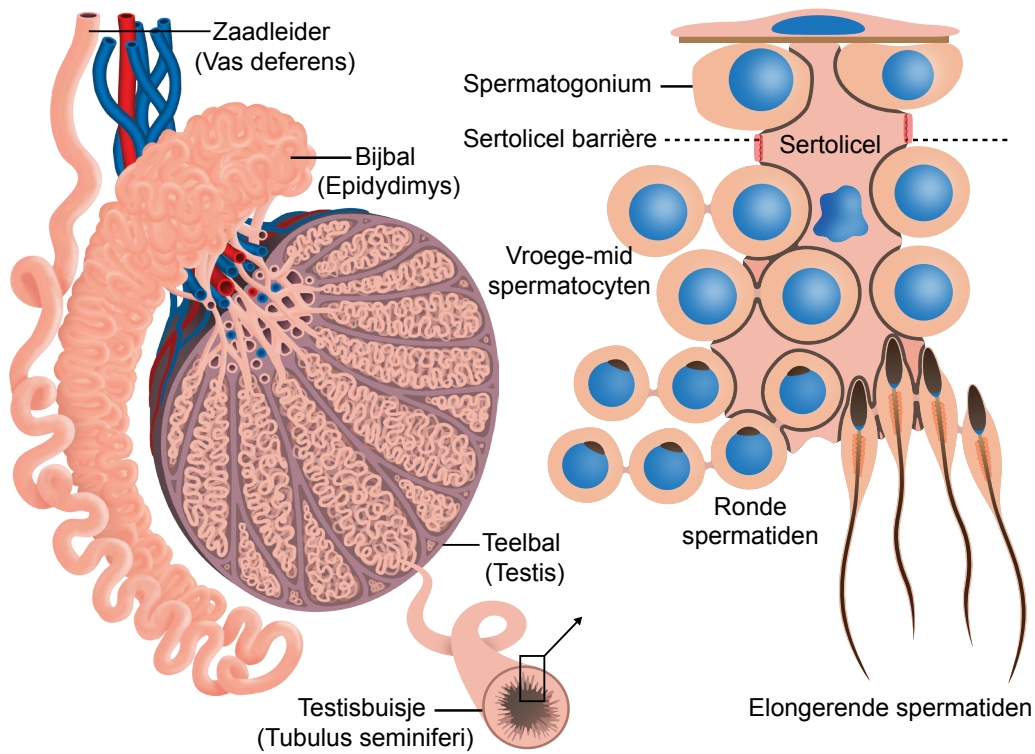


FIG 31

Schematische weergave van de testis met een nadruk op de testisbuisjes, de afvoer naar de bijbal en de overgang van de bijbal naar de zaadleider. Ook de bloedsomloop is weergegeven (aanvoer rood, afvoer blauw).

De opbouw van de **spermatogenese** vindt plaats vanuit de wand van het testisbuisje waar de stamcellen van de spermatogenese liggen. De alomvattende rol van de Sertolicel is geaccentueerd. Spermatiden waarvan de kern langwerpig wordt staan in de literatuur bekend als elongerende spermatiden. De spermatogenetische cellen houden elkaar na een deling met behulp van een cytoplasmabrug vast. De Sertolicellen die niet delen doen dit met behulp van een dichte schakeling tussen de celwanden (in rood). Op basis van de ontwikkeling van de kopkap (het **acrosoom**) wordt de spermatogenese van zoogdieren onderverdeeld in stadia. Bij bepaalde morfologieën van de kopkap (van een blaasje tot een kapje op een ronde kern tot het grotendeels bedekken van een elongerende kern, hier in zwart) horen bepaalde spermatocyt ontwikkelingsfasen en bepaalde spermatogonium differentiatie fasen.

Deze vaste combinaties staan bekend als de stadia van de spermatogenese en hebben alle een bepaalde tijdsduur. Het met behulp van microscopische analyse benoemen van deze stadia is voor elke soort maar speciaal bij de mens een specialisme. De kenners kunnen hier stadium IV van de mens in herkennen. Voor het loslaten van de spermatiden van het epitheel, die zich nu spermatozo of zaadcel mogen noemen, wordt de term **spermiatie** gebruikt. De afvoergangen uit de testis naar de bijbal staan bekend als de rete testis (zie ook fig 22).

(de epididymis). Wanneer die lange reis is doorlopen komen ze in de zaadleiders (vas deferens) terecht (fig 31). Bij een ejaculatie worden de mannelijke **gameten** voornamelijk vanuit de vasa deferentia gerekruteerd. Hierbij speelt de innervatie van de gladde spiercellen in de wand van de zaadleiders een rol. Vanaf het moment dat de stamcellen differentiërende spermatogonia vormen, die aan hun vermenigvuldigings- en ontwikkelingsreis beginnen, is het hele proces strikt in de tijd gereguleerd. Het tijdsverloop van de verschillende fasen verschilt per diersoort. Wanneer je onderzoek doet naar de spermatogenese heb je hiervoor een soort van spoorboekje nodig. Bij de muis wordt voor het traject van stamcel tot in de testis loslatende zaadcel 34,5 dagen gerekend en voor de mens 74 dagen.

12.2 Beoordelen van de spermatogenese

De stamcellen van de spermatogenese zijn natuurlijk de bron waarom alles draait. Wanneer die zichzelf niet voldoende beschermen *i.c.* beschermd worden, en/of wanneer hun dochtercellen te vaak de route van de differentiatie kiezen, loopt de zaadcelproductiecapaciteit gedurende het leven terug.

De zoektocht naar wat nu de enige en echte stamcel spermatogonia zijn, is bij de mens tijdens dit schrijven nog niet helemaal met volledige collegiale overeenstemming voltooid, maar het beeld wordt wel eenduidiger. Voordat we hiermee verder gaan eerst iets over de **testishistologie**, de veelgebruikte aanpak om m.b.v. de analyse van weefselcoupes een beter begrip te krijgen van de spermatogenese (fig 31). Wanneer je naar een testisbuisje kijkt, zie je dat de spermatogenese hierin van buiten naar binnen plaatsvindt. De stamcel spermatogonia liggen aan de wand, in relatief kleine aantallen bij de muis maar met velen bij de mens. Deze cellen hebben, en dit geldt voor cellen in ieder stadium van de spermatogenese, steun nodig van de Sertolicellen, ze zijn er totaal afhankelijk van (fig 31). Wanneer de Sertolicellen (die we eerder tegenkwamen bij de sekse beslissing richting man tijdens de embryonale ontwikkeling, H8) gedurende de ontwikkeling eenmaal gevormd zijn, delen ze niet meer. Ze kunnen niet functioneren zonder het signaal van het steroidhormoon testosteron, waarvan de leverancier gelukkig in de buurt zit. Testosteron wordt geproduceerd door de zogenaamde Leydigcellen, die zich bevinden in het weefsel tussen de testisbuisjes. Hoe het ook zij, gedurende het hele proces, vanaf de stamcel fase tot aan de spermiatie, is de spermatogenese verder aan de goede zorgen van de Sertolicellen toevertrouwd. Hoe dirigistisch is een Sertoliceel eigenlijk? Allereerst staan Sertolicellen bekend als de leverancier van vitamine A, zowel nodig voor de differentiatie van spermatogonia en als signaal molecule voor het opstarten van de **meiose**. Dit zijn dus a.h.w. gefaseerde opdrachten, welke veranderen per locatie bij het in de tijd voorbijkomen van de stadia van de spermatogenese (fig 31). Wanneer je een zitplaats zou hebben op de rand van een buisje zou je bij de muis 8,5 dag moeten wachten (de cyclusduur) om dezelfde compositie van celtypen als “een snapshot” uit de spermatogenese weer langs te zien komen. Bij de muis hebben we die alsmaar herhaalde doorlopende vertoning op basis van de microscopie op histologische coupes verdeeld in 12 stadia (fig 31). De vorm van het zich ontwikkelende **acrosoom** is leidend bij dit classificatiesysteem. Op die manier ontstond er in 1956 een schema van de spermatogenese bij de muis waaraan de naam van Eugene Oakberg van het Oak Ridge National Laboratory in Tennessee voor altijd verbonden is. Voor het op basis hiervan beoordelen van de

spermatogenese is wel oefening vereist. Maar dan kan een ervaren onderzoeker een kwantitatieve inschatting geven van eventuele problemen, zo die er zijn.

Om de hele cyclusduur (*i.e.* de 8,5 dagen van zonet), vast te stellen, injecteerden de onderzoekers de met radioactieve waterstof gemerkte **DNA** bouwsteen thymidine in de buikholte. Op gewenste tijden daarna werden muizen geofferd en werden histologische coupes gemaakt die daarna met een fotografische film werden bedekt. De nakomelingen van de cellen, die kort na de injectie het radioactieve thymidine (staat voor de T van fig 5) bij de DNA verdubbeling voor de celdeling hadden ingebouwd, waren na het ontwikkelen van de film bedekt met zilverkorrels en hierdoor duidelijk te onderscheiden. Met het verstrijken van de tijd zie je dit signaal in steeds verder ontwikkelde spermatogenetische cellen verschijnen. Aan de hand hiervan is het mogelijk een schatting te maken van de hele cyclusduur. Voor de menselijke variant van deze analysemethodiek werden in het begin van de 60-er jaren testisbiopten van Amerikaanse gevangenen bestudeerd. Op deze manier is de cyclusduur van de spermatogenese bij de mens bepaald op 16 dagen. Is het histologisch onderzoek naar het verloop van de spermatogenese over het algemeen vlot van start gegaan, bij de mens was dat een veel moeizamere exercitie. In plaats van de 12 stadia bij de muis was er bij de mens jarenlang sprake van maar 6. De reden van de moeizaamheid van het humane spermatogenese onderzoek is gelegen in het fundamentele verschil tussen muis en mens in de strategie om tot een zeer grote productie van zaadcellen te komen. Bij de muis zijn er relatief weinig stamcel spermatogonia en zeer veel spermatogoniale delingen voordat de meiose begint. Bij de mens is het andersom: heel veel stamcellen en relatief weinig mitotische delingen. Bij de muis zijn er 7 tot 10 delingen waardoor elke stamcel die zich op het pad van de differentiatie naar een zaadcel beweegt, een grote familie van tot wel 1000 spermatocten produceert. In het in 2017 gepubliceerde meest gedetailleerde overzicht bij de mens zijn dat er maar een paar: een familie van spermatocten telt slechts 8-16 leden. Het gevolg hiervan is, dat je in een histologische coupe van een enkel dwars doorsneden testisbuisje, bij de mens wel tot drie verschillende stadia kunt onderscheiden. Dan is de analyse alleen voorbehouden aan de echt aan de humane spermatogenese verslaafde biologen, en daar zijn er erg weinig van. Met de ontwikkeling van het acrosoom van de spermatocten als voornaamste houvast, kent de humane spermatogenese op geleide van de Nederlandse onderzoeker Dick de Rooij vanaf 2013 nu ook 12 stadia (fig 31). Zoals zonet al aangegeven is deze analysemethodiek te specialistisch voor klinisch onderzoek aan een haperende spermatogenese. Het meest gebruikte en relatief simpele evaluatiesysteem is de "Johnson score", genoemd naar een Deense patholoog, die gewoon heeft gekeken naar de aanwezigheid van spermatogonia, spermatocten, ronde

spermatiden en geëlongeerde spermatiden (fig 31) in 40 histologische coupes per testisbiopt. Wanneer de spermatogenese synchroon in een bepaalde fase stopt, bekend als een "maturation arrest" (H12.12), is dat zo wel te achterhalen.

12.3 De spermatogoniale vermenigvuldiging

Hiervoor werd al aangestipt dat er een groot verschil is in de wijze van de spermatogoniale vermenigvuldiging tussen mens en muis. Bij de knaagdieren delen de stamcellen, waarvan de muis er per testis zo'n 35.000 heeft, per cyclustijd van het epitheel zo'n 2 à 3 keer. De mens heeft een veel grotere hoeveelheid stamcellen, die er vanaf de aanleg van de testis tot aan de puberteit moeten zijn gekomen. Deze grote voorraad leidt tot een hoge bezettingsgraad van stamcellen aan de wand van de buisjes. Ze worden niet optimaal gebruikt voor differentiatie. Per stamcel gebeurt dit minder dan 1 x per cyclusduur van 16 dagen. De geestelijke vader van dit model uit 2017 is de eerder genoemde emeritus hoogleraar Dick de Rooij, die dit onderzoek in samenwerking met een goed laboratoriumteam in Rome uitgevoerd heeft. Daar vonden ze dat maar 15% van de ongedifferentieerde spermatogonia, die je nu wel als stamcelkandidaten kunt aanmerken, in een actieve celcyclus zijn. Ook met deze kennis kun je nog niet voorspellen hoeveel zaadcellen dat uiteindelijk op zal leveren. De eerste ideeën over het in stand blijven van de spermatogoniale vermenigvuldiging, gebaseerd op het muizenwerk, waren bij nader inzien wel heel simpel. Er werd gedacht dat wanneer een geïsoleerd levende stamcel deelt en de twee dochtercellen door een **cytoplasmabrug** verbonden blijven, er een kloon ontstaat van differentiërende spermatogonia. Wanneer dit niet gebeurt ontstaan er twee nieuwe stamcellen. Aan een iets minder wetmatige voorstelling van de gang van zaken wordt nu echter de voorkeur gegeven. Een belangrijke vraag daarbij is in hoeverre een differentiërende stamcel nog op zijn schreden kan terugkeren. In ieder geval moet de omvang van de stamcelpopulatie worden bewaakt. Wanneer de producten van de spermatogoniale delingen door cytoplasmabruggetjes verbonden blijven, begeven de cellen zich op het pad van de verdergaande differentiatie richting de vorming van spermatocyten. Ook bij de meiotische delingen van de spermatocyten worden cytoplasmabridges gevormd (fig 31). Spermatiden, die in de kern haploïd zijn delen hun cytoplasma met vele andere spermatiden waardoor ze alle producten van het uitgang **genotype** in principe nog tot hun beschikking hebben. Ze gedragen zich fysiologisch nog steeds grotendeels als diploïd (fig 13). Dit mechanisme kan een rol spelen bij eventueel te verhinderen gevolgen van de scheiding van de X en de Y. Bovendien is het hele systeem goed voor het zich synchroon

ontwikkelen van de **kiemcellen** en het verhindert een fenotypisch effect op haplo niveau: het is een niet dikwijls uitgesproken axioma dat het genotype van een spermatide geen effect heeft op de functionaliteit van de zaadcel die eruit kan ontstaan. Maar gelukkig is de technologie nu zo ver gevorderd dat per enkel spermatide de **transcripten** kunnen worden herkend. Wanneer het genetische verschil tussen de **homologe** chromosomen groot genoeg is zijn de transcripten naar oorsprong per **homoloog** in te delen en verwacht je ze in gelijke hoeveelheden in ieder spermatide te vinden. Uit onderzoek dat in 2021 werd gepubliceerd bleek deze verwachting grotendeels uit te komen.

Maar voor zo'n 13% van de genen en de producten daarvan werd een ander beeld gevonden. Deze groep was verrijkt voor genen met een rol tijdens de spermiogenese en kan zo leiden tot een effect van het genotype van de individuele zaadcel op de kans om te bevruchten. De aanname die volgt uit de eerste wet van Mendel kan dan niet meer gelden. In de wetenschappelijke literatuur hierover wordt dit fenomeen (een afwijking in een 1 : 1 splitsing) aangeduid met de Engelse term "transmission rate distortion". Deze subtiele manier om toch onderscheid te kunnen maken tussen **allelen** die tijdens de spermiogenese tot expressie komen lijkt voor de mannelijke vruchtbaarheid een evolutionair voordeel op te kunnen leveren.

Behalve voor de kennis over de productie van zaadcellen, zijn er ook nog andere aspecten waarvoor het begrijpen van de spermatogonale vermenigvuldiging belangrijk is. Zo weten we dat chemotherapie voor de behandeling van kanker vaak schadelijk is voor de humane spermatogenese en dat herstel van deze schade niet vanzelfsprekend is. Vaak komt daarna de spermaproductie niet meer goed op gang (H12.7). Ook is bekend dat het aantal delingen, *i.c.* verdubbelingen van het DNA, dat tussen de generaties plaats vindt, een rol speelt bij het bepalen van de last aan nieuwe **mutaties** voor een nieuwe generatie. DNA **replicatie** is nu eenmaal niet foutloos (H2.2.2, tabel 3, fig 5) en is dat ook tijdens de spermatogonale vermenigvuldiging niet (maar zie het bijschrift van tabel 3). Dat is een reden waarom er bij de kinderen van oudere vaders duidelijk meer mutaties, in dit geval van een enkele base (*de novo* SNPs, H3.2), gevonden worden dan bij de nazaten van jongere vaders. Het aantal verdubbelt zo ongeveer iedere 20 jaar tijdens het ouder worden.

Naast onnauwkeurigheden bij de DNA replicatie spelen er ook andere invloeden: een verandering van een C naar een T (fig 11) en een C die wordt vervangen door een G (samen goed voor een kwart van de *de novo* SNPs) worden in eerste instantie niet gelinkt aan de DNA replicatie, maar toegeschreven aan de invloed van de omgeving (zie ook H12.13 en het bijschrift van tabel 3).

12.4 De Sertolicel barrière

De alomvattende rol van de Sertolicellen in de spermatogenese kwam hiervoor al aan bod (H12.2). Sertolicellen zijn via een aparte schakeling tussen de celmembranen met hun buur-Sertolicellen verbonden. Samen vormen ze zo een aaneengesloten laag in het testisbuisje, de “bloed-testis of Sertolicel barrière” (fig 31). Een mogelijke functie hiervan is het buiten de deur houden van kwalijke stoffen, die het DNA van de spermatogenetische cellen zouden kunnen beschadigen. Daarnaast helpt de barrière ook bij het verhinderen van auto-immuun reacties. De raakvlakken tussen de Sertolicellen zijn zeer uitgebreid. Wanneer een spermatogenetische cel, die net aan de meiose begonnen is, door de Sertolicel barrière geloodst moet worden, lijkt het proces veel op een doorgang door een nauwe schutsluis met hele dikke deuren. Ergens begin jaren 70 zag ik die “sluisdeuren” op een grote elektronenmicroscopie foto van een poster die getoond werd tijdens een Nederlandse natuurwetenschappelijke bijeenkomst in Utrecht. De poster was van Mebius Kramer, de leermeester van Dick de Rooij. Kramer werkte aan testismateriaal van de stier. Je wordt getroffen door een sensatie als “het is dus echt waar”, je toen nog niet realiserend dat al die spermatogenetische cellen in kortere of langere ketens aan elkaar vast zitten en elkaar echt niet los gaan laten wanneer ze in de sluis worden geduwd en er weer uit.

12.5 Mannelijke aspecten van de meiose

De mannelijke meiose verschilt kwantitatief en ook kwalitatief van de vrouwelijke. Het verwerken van de dubbelstrengs DNA breuken, die betrokken zijn bij het zoeken van het homologe chromosoom en **crossing over** (H5.1), gebeurt op een meer uniforme manier dan in de vrouwelijke meiose (H11.1). Het aantal cross overs is ook lager (H11.1) en de verdeling ervan over het chromosoom is subtiel anders. Bij de man vinden we de cross overs dicht bij de chromosoomindelen. Dan liggen de **loci** tussen welke recombinatie daadwerkelijk heeft plaatsgevonden ook verder uit elkaar.

Non disjunctie leidend tot een chromosoom extra komt in de eerste meiotische deling van de muis weinig voor, zo rond 1 procent. Voor de tweede meiotische deling komt daar weinig bij. Bij de mens is de **cytogenetica** van de spermatogenese altijd een moeizame bezigheid geweest, maar weinig onderzoekers waagden zich eraan. Het tellen van de chromosomen tijdens de tweede meiotische deling was lastig. De eerste schattingen die gedaan zijn in populaties

van zaadcellen waren gebaseerd op **fluorescentie in situ hybridisatie** met chromosoom specifieke stukjes zoek-DNA ("probes"). Dit leidde tot een schatting van rond de 0,1% **disome** spermatozoa per chromosoom, ongeveer 2,5% voor het totaal. In een prachtige publicatie die in de zomer van 2020 verscheen wordt een methode gepresenteerd die wel tot een nauwkeurige schatting leidt. Op de afdeling genetica van de Harvard Medical School is een DNA techniek ontwikkeld om per individuele zaadcel op basis van 1% van het **genoom** de plekken van de cross overs te bepalen en uit te lezen welke chromosomen dubbel aanwezig zijn en welke missen. In dit onderzoek werden meer dan 31.000 zaadcellen, afkomstig van 20 jonge donoren tussen de 18 en de 38 op deze manier onderzocht. Het bleek dat maar 0,7% van alle zaadcellen disoom waren en wat meer (1,8%) een chromosoom misten. De tweede meiotische deling was het meest foutgevoelig. Afwijkingen bij de verdeling van de **geslachtschromosomen** zijn het meest interessant (tabel 4) en die blijken weer wat vaker tijdens de eerste meiotische deling plaats te vinden. In het eerdere werk met de chromosoom specifieke fluorescerende probes is er nooit een leeftijdseffect voor non disjunctie bij de man gevonden. Wel geldt dat hoe slechter de spermatogenese is, hoe hoger de gevonden frequenties voor non disjunctie zijn (denk aan 2 tot 4 keer zo hoog).

12.5.1 "Sex bodies"

Het grote verschil tussen de vrouwelijke en de mannelijk meiose is de aanwezigheid van twee verschillende geslachtschromosomen bij de laatste. We weten zo ongeveer op de DNA base nauwkeurig welk deel (of delen) van de X en de Y perfect homoloog zijn. Dit zijn de DNA gebieden die noodzakelijk zijn om crossing over mogelijk te maken (fig 15, 38). Door het chiasma dat hier het gevolg van is zijn de X en de Y tijdens de metafase van de eerste meiotische deling (legenda's fig 13, 14 en 30) met elkaar verbonden. Ze gaan in de anafase uit elkaar en zorgen zo voor een sex ratio van 1 in het nageslacht. Bij de mens zijn er twee homologe "**pseudo autosomale regio's**" (PAR1 en PAR2) betrokken bij de positionering van de cross overs. De langere (PAR1) is ongeveer 2,6 mb en ligt aan het eind van de korte armen van het X en Y chromosoom (fig 37, 38). In dit gebied vindt altijd 1 cross over plaats. Het andere regio (PAR2) is veel korter (fig 38), ligt aan het einde van de lange arm van de X en de Y en is veel minder vaak betrokken bij een cross over (ongeveer 25%). Bij de muis is de PAR wat langer. Nergens is de cross over incidentie per mb DNA hoger dan in de PAR van de man. Het elkaar langs de kernwand opzoeken van deze relatief kleine stukjes homoloog X en Y DNA kan beschouwd worden als een

meesterproef voor de homologe meiotische paring (H5.1). Het loopt wat achter het paringsgedrag van de **autosomen** aan. Wanneer de PARs elkaar gevonden hebben vormen de **sex chromosomen** meteen een **chromatine** domein dat zich van nu af aan heel anders gaat gedragen dan het chromatine van de andere **bivalenten**. De genexpressie stopt en het gebied, waarvoor algemeen de naam “**sex body**” (fig 15, 37) wordt gebruikt, komt vol met eiwitten te zitten die het DNA beschermen, bijvoorbeeld door betrokken te zijn bij de reparatie ervan. Hadden we het in hoofdstuk 5.1 over de grote hoeveelheid dubbelstrengs DNA breuken die aan het begin van de meiose in het DNA worden aangebracht om bij te dragen aan de “homology search” en om crossing over mogelijk te maken (fig 14). Dit gebeurt ook in de sex chromosomen en ook deze breuken moeten worden hersteld. Dat kan met behulp van het DNA van het zuster**chromatide**.

Mogelijk omdat de PARs niet lang zijn, lijken tijdens de evolutie opgetreden kleine verschillen in hun basenvolgorde al snel een effect te hebben op de meiotische paring van de geslachtschromosomen. Eind 70-er jaren kregen we uit Lübeck van professor Alfred Gropp wat Japanse huismuizen (*Mus musculus molossinus*). Wanneer we die kruisten met onze albino Swiss laboratoriummuizen liepen we tegen vruchtbaarheidsperikelen op die onder andere te maken hadden met het feit dat het Japanse Y chromosoom niet wilde “cross overen” met het X chromosoom van de Swiss muizen, waardoor het **univalenten** bleven. Dat leverde verlaagde spermatellingen in de bijbal op (fig 31).

Dit is een voorbeeld van een begin van hybride steriliteit. De X en de Y fungeren hier als een soort van poortwachters om de soort “zuiver” te houden. Dat hybride steriliteit als eerste het geslacht treft met twee verschillende sex chromosomen, werd al in 1922 door de beroemde Engelse populatiegeneticus JBS Haldane geformuleerd (box 4). Dit is een van die oude regels in de genetica, die de tand des tijds heeft doorstaan. Zoek maar eens op het internet naar de Lijger, het kruisingsproduct tussen een mannetjesleeuw en een vrouwtjestijger waar mijn kapper uit Koerdistan het altijd over heeft en dan zegt: “heb je het nou nog niet opgezocht?” De regel van Haldane werkt dus o.a. via het meiotische gedrag van de X en de Y, en de mate van homologie tussen de PAR gebieden daarin. Zou dat een rol hebben gespeeld bij het gevolg van de avances tussen *Homo sapiens* en *Homo neanderthal*? Er zijn aanwijzingen dat paringen tussen de moderne en oudere mensachtigen niet gunstig zouden zijn geweest voor de fertiliteit van de nakomelingen. Over het algemeen vindt men in gebieden die rijker zijn aan **genen** betrokken bij de mannelijke (en ook vrouwelijke) meiose, geen of nauwelijks nog sporen van het *neanderthal* genoom. Ook is de bijdrage aan het X chromosoom lager dan aan de autosomen. Van genen

die met de meiose te maken hebben lijken de allelen van *neanderthal* origine door natuurlijke selectie te zijn verdwenen. Opmerkelijk genoeg wordt bij de beschouwingen over de genetische signatuur die deze paringen bij ons hebben achtergelaten de Y nooit genoemd. Het zou best kunnen dat de nalatenschap van *neanderthal* DNA (H5.4.3) aanvankelijk via, of vooral via de vrouwelijke **F1**'s tot stand is gekomen.

12.5.2 Chromatine veranderingen en genexpressie in de meiose

Bij de spermatogenese zijn iets meer dan 2000 genen betrokken met een ten opzichte van andere organen sterk verhoogde **RNA** expressie. Naar schatting minstens 500 genen hiervan zijn er exclusief bij betrokken. Tijdens het pachyteen (fig 14) zie je het chromatine veranderen, duiken er testis specifieke **histon** typen op die ook weer moeten worden ingebouwd en worden de kernen groter en losser. De **transcriptie** (box 1) neemt sterk toe, iets dat zich na de meiotische delingen voortzet. Dit is al in de 60-er jaren door het inbouwen van radioactief uridine in RNA ontdekt, na d.m.v. **autoradiografie** en lichtmicroscopie zichtbaar te zijn gemaakt. Lang niet alle **mRNA** moleculen worden vertaald in eiwit. Nu, met het toepassen van **next generation sequencing (NGS)** op het **transcriptoom** neemt de verwondering over de RNA productiehoogte en -variatie (denk bijvoorbeeld aan het gebruik van **exonen**, box 1) die hier ten toon wordt gespreid alleen maar toe. De Rotterdamse reproductiebioloog Anton Grootegoed vergeleek het wel eens met een "test run". De motoren voor RNA transcriptie en RNA processing worden nog eens flink aangezet voordat na de meiose het pad tot differentiatie naar zaadcellen wordt ingezet. De biologische betekenis van deze uitbundige transcriptie is nog niet helemaal in beeld.

Van alle chromatine omvorming die tijdens het mannelijke pachyteen plaats vindt, is die van het sex chromatine in het "sex body" (fig 15, 37) het meest ingrijpend. De **nucleosomen** worden afhankelijk van de soort wat meer of wat minder rigoureuus afgebroken en weer opnieuw gevormd, waarbij nu een andere H3 variant wordt gebruikt (fig 8). Dit proces is onderdeel van de transcriptionele inactivatie van de sex chromosomen binnen de "sex bodies". Na de meiose is de repressie van genactiviteit wat minder strikt gereguleerd, maar de sex chromosomen blijven grotendeels inactief, ook wanneer ze in aparte spermatiden terecht zijn gekomen.

Alhoewel niet naadloos in deze paragraaf passend moeten we in dit hoofdstuk toch ook aandacht schenken aan de expressie van kleine RNA moleculen die niet voor eiwit coderen, de zogenaamde small non coding (snc)RNAs. Drie subklassen daarvan zijn miRNA (19-23 nucleotiden), siRNA (idem) en piRNA (26-32 nucleotiden). De aandacht voor de biologische functie van deze

RNAs is groeiende en heeft geheel nieuwe inzichten opgeleverd voor onder meer celbiologen en genetici. Dit geldt zeker voor hun rol in de **gametogenese**, waarvoor men nu aanneemt dat het belang van sncRNAs in de spermatogenese veel groter is dan in de oogenese. De piRNAs komen zelfs bijna uitsluitend tijdens de spermatogenese tot expressie. Gedurende de vorming van de testis en daarna onderdrukken ze met name de activiteit van **retrotransposons**.

Dit komt tot uitdrukking in de vorm van CpG methylering (fig 11). Ook tijdens de meiose speelt de piRNA gemedieerde uitschakeling van retrotransposons een rol. De sncRNAs doen echter nog meer. Ze hebben onder meer een functie in de regulatie van (hetero)chromatine en in het opruimen van overtollig RNA later in de spermiogenese. Van de miRNAs en siRNAs weten we dat ze specifiek betrokken zijn bij het controleren van de expressiehoogte en vertaling van de eiwit coderende mRNAs gedurende de spermatogenese. Meer en meer reviews verschijnen er dan ook over hun grote biologisch belang en over de klinische betekenis die afwijkingen in de populaties van sncRNAs kunnen hebben. Zo draagt ook kennis van sncRNA significant bij aan het groeiende inzicht in de ongelofelijke complexiteit van de spermatogenese.

12.5.3 Checkpoints in de meiose

Bij de muis zijn er tijdens de eerste meiotische deling twee duidelijke checkpoints (fig 4) gevonden: het pachyteen checkpoint en het metafase I checkpoint. Het pachyteen checkpoint zagen we voor het eerst in 1983 in een van de MRC radiobiology unit (Harwell) afkomstige muis uit een stralingsexperiment. Bij deze muis was de helft van chromosoom 7 in chromosoom 1 terecht gekomen en in iedere pachyteen spermatocyt werden grote ongepaarde stukken van chromosoom 7 gezien. De vrouwelijke meiose kon hier op een bepaalde manier nog wel mee omgaan, de mannelijke kennelijk niet. Halverwege het pachyteen, net voor de tijd van de chromatine verandering en oplopende transcriptie (H12.5.2) gingen de spermatocyten collectief in **apoptose** en werden ze door de Sertolicellen “opgegeten”. Dit bleek de voorbode van een **fenotype** dat later, toen er knockout muizen met defecte genen kwamen, vaker gezien werd. Wanneer het geïnvalideerde **gen** een essentiële functie heeft bij de homologe chromosoomparing, c.q. het repareren van dubbelstrengs DNA breuken, komt het pachyteen arrest in actie. In hoofdstuk 5.1, bij het beschrijven van de rol van **mismatch repair** genen bij de vorming van de **synaptonemale complexen** en dus bivalenten, kwam dit arrest eigenlijk al ter sprake. Kenmerkend is ook dat het verminderen van de genactiviteit van de X en de Y in de “sex bodies” (H12.5.1) niet goed lukt. Dit alleen al is voldoende om bij de muis het pachyteen arrest op te laten treden. Bij de

mens is het pachyteen arrest ook effectief. Ik heb me er altijd over verbaasd dat het collectief opruimen van de hele productie aan meiotische cellen bij het pachyteen checkpoint niet tot een chaotisch histologisch beeld leidt. Wanneer je een manier zou vinden om de chromosoomparing te hinderen, heb je eigenlijk een ideaal geboortebeperkingsmiddel voor de man. Ideeën hierover zijn eind 90-er jaren bij het toenmalige Organon gedropt. Om plannen in deze richting verder te ontwikkelen moest er voor een kandidaat eiwit, betrokken bij chromosoomparing, een *in vitro* test voor de werking van dat eiwit beschikbaar zijn. Het eiwit mag natuurlijk alleen aanwezig zijn in meiotische cellen. Het zoeken naar een remmer voor een dergelijk eiwit kon worden gedaan door verbindingen uit een hele bibliotheek aan chemicaliën te testen. Die *in vitro* test was er toen niet. Achteraf gezien was de tijd nog niet rijp voor een dergelijke aanpak.

Een tweede checkpoint tijdens de spermatogenese zit in de metafase van de eerste meiotische deling. Hiervoor (H12.5.1), in het verhaal over het verstoord paringsgedrag van de X en Y en de verlaagde spermatellingen van hybriden tussen de Japanse huismuis en Swiss laboratoriummuizen, werd er eigenlijk al op dit checkpoint gehint. Een losse X en Y zullen het SAC, het “spindle assembly checkpoint” activeren (H2.2.1, H11.4.2, fig 4). Univalenten predisponeren als in primaire oocyten voor een verkeerde aantalsverdeling van de chromosomen over de secundaire spermatocyten (vergelijk met fig 30). Het SAC kan de vorming van spermatozoa met een aantalsafwijking niet helemaal voorkomen (H12.5), ook niet voor de geslachtschromosomen. De bron voor het XXY **karyotype** (Klinefelter mannen, tabel 4) is zowel in de vrouwelijke (2 keer de X) als in de mannelijke meiose (X plus Y) te vinden.

Iets dat lijkt op deze checkpoints, maar waarvan de oorsprong anders is, heeft te maken met het proces van afscherming van de sex chromosomen in het “sex body”. Bij zowel muis als mens kan dit mechanisme zwaar op de vruchtbaarheid drukken. Figuur 37 geeft er voorbeelden van. Bij de aanwezigheid van een structurele chromosoomafwijking (H3.4.1, fig 12, 37) verloopt het elkaar vinden van de betrokken homologe chromosoomsegmenten vaak minder soepel.

Segmenten die daar problemen mee hebben voelen zich kennelijk “aangetrokken” tot de X en Y, die wat achter lopen in hun zoekgedrag naar homologe paring. De ongepaarde stukken chromosoom schuiven gewoon bij de X en Y aan, waardoor de strikte scheiding tussen sex chromatine en **autosomaal** chromatine verloren gaat. Ongepaard autosomaal chromatine wordt zo ook op het spoor van de inactivatie gezet en omgekeerd wordt sex chromatine geactiveerd. Bij de muis is dit alles het beste onderzocht. De gevolgen, die ernstiger worden naarmate het aantal met autosomaal chromatine “besmette” sex bodies hoger is, kunnen in het extreme geval zichtbaar zijn als een **azoospermie**. Soms gaat ook de homogeniteit van het anders zo smetteloos

uitziende muizenzaad verloren. Er ontstaat een grote variatie aan vormen in vooral de kop. Ook de staart doet mee (fig 37) en de beweeglijkheid wordt slechter. Het muizenzaad gaat kortom veel op mensenzaad lijken (H12.9.1, tabel 5, fig 34, 37).

12.6 Spermio-genese

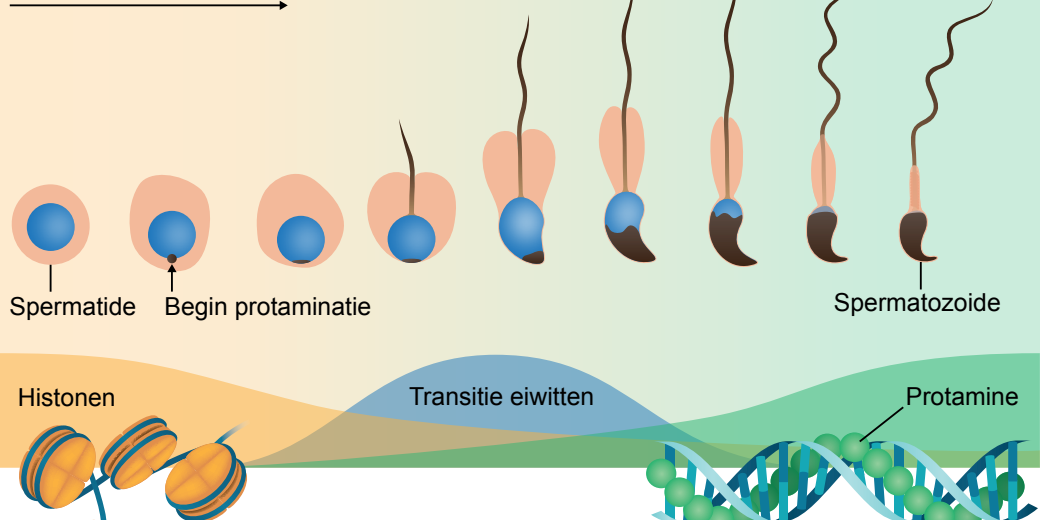
Nadat de 2^e meiotische deling snel na de 1^e meiotische deling is afgelopen begint de spermio-genese: de morfogenese van de ronde spermatiden tot aan het loskomen van de zaadcellen in het lumen (fig 31) van de testisbuisjes. Met de aanleg van het acrosoom en de staart wordt niet lang nadat de meiose afgelopen is begonnen (fig 31, fig 32). De cellen zijn actief in transcriptie en eiwitsynthese. Er moet een hoop gebeuren en dat vereist veel regulatie. Een deel van de voor dit proces benodigde genactiviteit is al tijdens de meiose opgestart. De mRNA moleculen kunnen lang ongebruikt worden opgeslagen voordat er daadwerkelijk translatie in eiwit op plaats vindt (box 1, fig 9). Later komt dit principe ook goed van pas, omdat er bij het inpakken van het DNA in de kop van de toekomstige zaadcel veel eiwit nodig is, maar de transcriptie van mRNAs daarvoor is tijdens het langwerpiger worden van de kern al gestopt. De spermio-genese is goed te volgen door naar de vorming van het **acrosoom** te kijken (H12.2, fig 31, 32). Het start als een blaasje dat geleidelijk over de kern zakt en er contact mee maakt, een beetje zoals een gebreide eierwarmer over een gekookt ei zakt. Bij het eerste contact van het blaasje met de kern start daarin de ombouw van het chromatine naar een veel compactere vorm (fig 32). Dit is iets dat we rond 2010 bij toeval ontdekten, toen we in Nijmegen keken naar de spermatogenese van de mens. De chromatineombouw vindt vanaf de voorkant van de kern in de richting van de staart plaats. Men stelt zich voor dat het chromatine in de zaadcel als een soort van touwwerk in rollen ligt opgeslagen, op gezette afstanden tussen de trossen door steun vindend aan een soort van skelet (fig 32). Om van de **nucleosomale** chromatinestructuur (fig 7, 8) te komen tot een veel dichtere pakking, is het nodig om flink wat dubbelstrengs DNA breuken te maken. Dit dient er waarschijnlijk toe om allerlei vervelende knopen in dat eindeloos lange DNA te voorkomen. Er zijn maar weinig onderzoekers die zich met deze intrigerende DNA breuken bezighouden. Je kunt bijvoorbeeld de vraag stellen of deze breuken nu willekeurig worden aangebracht, of dat er een plaatsgebonden mechanisme achter zit (wat zo lijkt te zijn). Een additionele vraag daarbij is hoe deze breuken worden gerepareerd, want bij het uitpakken van het chromatine in de eicel zijn er niet meer veel van over (H13.5.2). Het kleine eiwit protamine, dat rijk is aan het **amino-zuur** cysteïne en daarom veel SH groepen bevat speelt de hoofdrol bij het condenseren en voor

transport gereed maken van het chromatine (fig 32). Niet alle DNA is echter betrokken bij deze verandering. Bij de muis blijft rond de 1% en bij de mens zo ongeveer 10% van het DNA in de meer open nucleosomale structuur. Een volgend proces dat de condensatie van het chromatine min of meer bezegelt, begint in de testis en wordt afgemaakt in de bijbal (fig 31). Door de vorming van zwavelbruggen (-S-S-) tussen de SH groepen van de cysteïne's raken naburige protamine moleculen met elkaar verknoopt (fig 32) en wordt het gebonden chromatine DNA stevig omhult. Unaniem is men het erover eens dat je zo het chromatine het beste beschermt, totdat het door een eicel ontvangen kan worden. Bovendien is een compact gestructureerde kern met een minimum aan cytoplasma goed voor de stroomlijn en zwemsnelheid van de zaadcel.

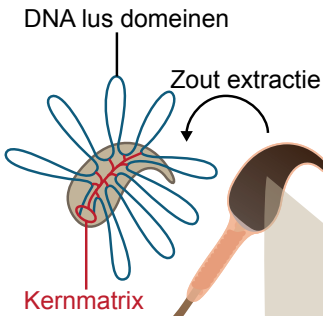
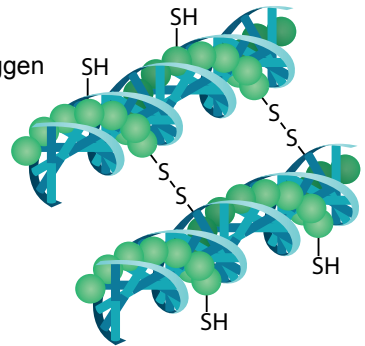
12.7 DNA herstel, beschadigende stoffen

Een eerste indruk van de stralingsgevoeligheid van de jonge stamcel spermatogonia werd in 1973 opgeschreven door Paul Selby van het National Laboratory in Oak Ridge, Tennessee, toen een megagroot muizenlaboratorium. Selby had voor zijn onderzoek niet minder dan 55.456 muizen nodig, dieren die werden geboren nadat de vaders ervan eerder, zo rond hun geboorte waren bestraald. De dan jonge spermatogonia zijn erg gevoelig voor DNA schade en kiezen er meestal voor om in apoptose te gaan. Dit ondanks het feit dat de niveaus van eiwitten die betrokken zijn bij DNA herstel hoog zijn. Door deze als babymuis bestraalde wildtype (+/+) mannetjes te paren met vrouwtjes die **homozygoot recessief** zijn voor 7 genen met een uiterlijk waarneembaar fenotype (-/-), kon je de door straling geïnduceerde beschadigende mutaties (vaak deleties) gemakkelijk zien. Dit uit zich namelijk als het verschijnen van het recessieve fenotype in de nakomelingen die normaal net als de vader uiterlijk wildtype (+/-) zijn. Mutatieschade in deze 7 genen vindt men na bestraling echter maar heel sporadisch en dit verklaart de noodzaak van de grote aantallen muizen in dit onderzoek. Soms werden er voor hetzelfde gen meerdere nakomelingen met hetzelfde recessieve fenotype geboren: een gemuteerde spermatogoniale stamcel had zich blijvend in het epitheel van het testisbuisje gevestigd en kon vervolgens voor meerdere nakomelingen zorgen. Deze zogenaamde "specific locus test" was toentertijd volkomen geaccepteerd. Op de paar laboratoria in de wereld die dit soort proeven deden, werden muizen in hoge aantallen verbruikt, iets dat tegenwoordig door betere aandacht voor nut en noodzaak van dierproeven moeilijk te handhaven is. De gevoeligheid voor celdood van de mannelijke voorlopercellen van de spermatogenese, samen met de effectieve werking van DNA repair eiwitten, kan wijzen op

Spermiogenese (muis)



Vorming disulfide bruggen tijdens rijping in de epididymis



Aandeel histonen:
1% (muis)
10% (mens)

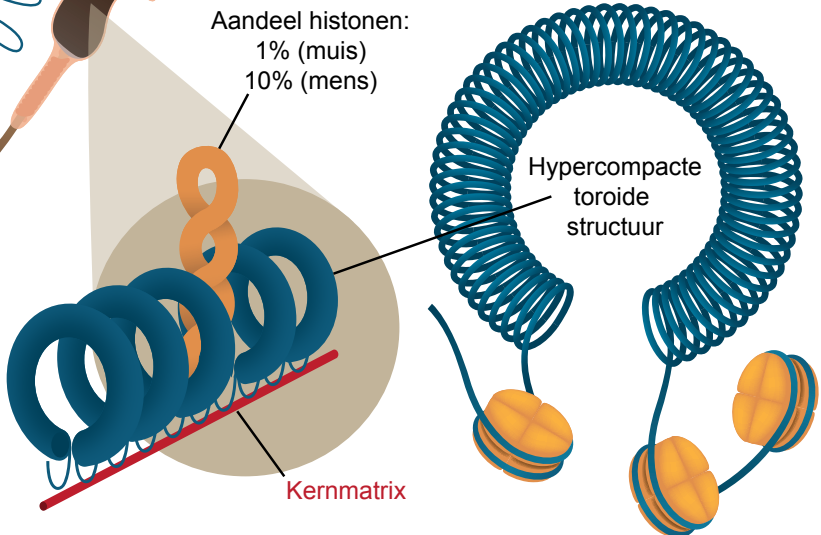


FIG 32

Het algemeen geaccepteerde model van de chromatineveranderingen, die tijdens de **spermiogenese** plaats vinden. Deze veranderingen spelen zich af tegen de achtergrond van een vormverandering van de kern, van rond naar geëlongeerd (fig 31). De overgang van de **nucleosomale** structuur naar de compacte protamine structuur verloopt via de tussenfase van de transitie eiwitten, waar nog niet veel over bekend is. De kern komt excentrisch in het **cytoplasma** te liggen dat uiteindelijk over de staart zakt en grotendeels verdwijnt. Het aanleggen van de staart begint al aan het begin van de spermiogenese evenals de ontwikkeling van het **acrosoom**, hier in zwart weergegeven. De lus domeinen (de “looped domains” van H2.3.1, fig 7) zijn een opvallend element in de structuur van de kern. Ze hechten aan de kernmatrix (nucleaire matrix, zie ook H2.3.1) en geven de kern een grote mate van stevigheid. Het onderzoek naar de **chromatine**-organisatie van de zaadcel is extreem moeilijk. Behalve door de eicel (op natuurlijke wijze na de bevruchting) is het is bijna niet zonder beschadigingen “uit te pakken”.

een evolutionair ontwikkelde strategie om de lading aan nieuwe mutaties bij het passeren van de generaties klein te houden. Paul Selby vond hiervoor een overtuigende aanwijzing.

Ook wanneer de spermatogenese op gang gekomen is, hebben DNA beschadigende stoffen en ioniserende straling een negatief effect op de stamcellen. Bij de muis is onderzoek hieraan, meeliftend op het grootschalige stralingsonderzoek in de jaren 50-80 van de vorige eeuw, vooral uitgevoerd door Tony Searle en Bruce Cattanaach op de MRC radiobiology unit in Harwell UK. Bruce Cattanaach wilde weten of bij oplopende doses, tot 10 Gy aan toe, waar mannetjes volledig azoosperm van worden, de vruchtbaarheid zich kon herstellen. Daar bleek een wonderlijk eenvoudig mathematisch principe aan ten grondslag te liggen: de tijd die verliep tot de fertiliteit was teruggekeerd, was recht evenredig met de dosis ontvangen straling. Het is natuurlijk bijzonder dat een dosis van 10 Gy, die *in vitro* 350 dubbelstrengs DNA breuken per genoom oplevert, door een klein deel van de stamcellen überhaupt nog wordt overleefd. De conclusie uit deze observatie was dat na een beschadiging van het spermatogenetische epitheel bij de muis, er eerst herstel van dat epitheel optreedt en dat pas daarna de spermatogenese weer op gang komt. Bij de aapachtigen inclusief de mens lijkt er een minder strakke regie te zijn. Eigenlijk start de ontwikkeling naar zaadcellen te snel, en dat gaat ten koste van de voorraad stamcellen en de uiteindelijke spermaproductie (H12.3).

De hele vroege stralingsproeven van de 60-er en 70-er jaren op muizen suggereerden al dat de stamcel spermatogonia per dubbelstrengs DNA breuk weinig structurele chromosoomafwijkingen (H3.4.1) opleveren. Van dit type afwijkingen komen reciproke translocaties veruit het meeste voor. Ze ontstaan in een uiterste poging van de cel om die levensbedreigende breuken te repareren, waarbij als laatste redmiddel een ander chromosoom wordt ingeschakeld (fig 12).

De "state of the art" manier om naar het optreden van reciproke translocaties te kijken was te wachten tot de nakomelingen van de stamcellen aangekomen waren in de metafase van de eerste meiotische deling (legenda's fig 13, 14). Daar zag je dan 4 chromosomen aan elkaar hangen in plaats van de normale situatie waarbij 2 chromosomen een bivalent hebben gevormd (fig 26 geeft deze situatie weer in het pachyteen (fig 15)). In de begintijd van het onderzoek naar de mutatiegevoeligheid van de spermatogoniale stamcellen voor straling, werd het hele veld erg gedomineerd door de zoektocht naar normen voor stralingsblootstelling van bijvoorbeeld werknemers in de nucleaire industrie, en ook voor mannen en vrouwen uit de bevolking in zijn algemeen (hiervoor gelden strengere normen). Extrapolatie van de resultaten van de muizenproeven naar de situatie bij de mens was daarbij een heikel punt. Recruitering van gevangenen uit Amerikaanse gevangenissen als proefkonijnen, met toen nog weinig aandacht voor ethische overwegingen rond dit soort van onderzoek, bood echter uitkomst. Vanuit het hiervoor genoemde Oak Ridge National Laboratory werd over de vindingen in 1975 in het toonaangevende *Nature* gepubliceerd. Ook bij mannen leidde bestraling en herstel van DNA schade in de stamcellen tot reciproke translocaties. Bij een stralingsdosis van 2 Gy zag men wat meer, en bij 6 Gy veel minder dan bij de muis. Kennelijk zijn de humane stamcellen stralingsgevoeliger en sterven die met veel DNA schade eerder af dan bij de muis.

Ondanks dat we nu jaren later zijn en DNA technieken sindsdien een enorme vlucht hebben genomen, weten we nog maar betrekkelijk weinig specifiek over het DNA herstel in de stamcel spermatogonia van de muis (maar zie het bijschrift bij tabel 3). Het gaat er in ieder geval anders aan toe dan in somatische cellen. Bij schade is apoptose een normale uitweg maar dit is niet de uniform gekozen oplossing. Er bestaat namelijk ook een groep stralingsresistente stamcellen. Mogelijk zijn dit cellen die in een gunstig stadium van de celcyclus zijn. Dit is de verklaring waarom de fertiliteit bij mannetjesmuizen na een hogere dosis later toch nog terugkomt. Vrij van chromosoomafwijkingen zijn ze dan zeker niet meer. Uit muizenonderzoek van de jaren 70 en 80 bleek zonneklaar, dat reciproke translocaties, alhoewel met afnemende efficiëntie, tot op hoge leeftijd door de bestraalde mannetjes op het nageslacht konden worden overgedragen. Omdat het onduidelijk is hoeveelheid nieuwe mutaties stamcellen kunnen verdragen, heeft dit voor de

mens een duidelijke klinische implicatie. Het zal altijd beter zijn, en ook ethisch beter, om voor mannen die kankertherapie met DNA beschadigende stoffen moeten ondergaan, te proberen toekomstige fertiliteit “veilig te stellen” door middel van het vooraf invriezen van zaadcellen. Vertrouw niet op de kans dat de spermatogenese zich langzaam herstelt. De additionele kans dat de zaadcellen als gevolg van chemotherapie en/of bestraling nieuwe mutaties met zich meedragen is domweg te groot en het bewijs hiervoor is zeer recent geleverd. Het kwam voort uit een groot onderzoek waarbij in 21.879 trio's (“trio sequencing”, H3) naar een hogere spontane **mutatiefrequentie** voor basenpaar veranderingen werd gezocht. Dit op zichzelf zeldzame verschijnsel kwam voor na paternale chemotherapie voorafgaand aan de conceptie. Voor verdere debatten over de effecten van ioniserende straling op het nageslacht bij de mens, zie ook nog hoofdstuk 17.3.

De sneller delende differentiërende spermatogonia zijn nog gevoeliger voor straling dan de stamcellen, ze gaan massief in apoptose. Tony Searle en zijn assistent Colin Beechey, vonden bij een acute dosis van 2 Gy (een gebruikelijke dagelijkse hoeveelheid straling bij tumortherapie) na 5 weken een diep dal in de zaadcelproductie van muizen. Dit dal (tot 10% van normaal) hield een week of twee aan, maar het belette de mannetjes niet om na paring met vrouwtjes nog zo goed als alle eicellen bevrucht te krijgen.

Opmerkelijk genoeg wordt apoptose van de differentiërende spermatogonia ook ingezet als instrument om het aantal spermatogonia aan te passen aan de verzorgende capaciteit van de Sertolicellen. Niemand weet of spermatogonia met mutaties daar extra gevoelig voor zijn en het eerst aan de beurt zijn om er zo uitgepikt te worden.

Wanneer er tijdens de lange aanloop naar de eerste meiotische deling extra dubbelstrengs DNA breuken worden geïnduceerd, repareren de spermatocyten deze wel. Het herstellend vermogen is echter van beperktere omvang. Wanneer er schade wordt aangebracht die de dubbele helix ontwricht, het type schade dat ontstaat door bijvoorbeeld ultra violette straling maar ook door sommige chemicaliën, is het beeld nog ontmoedigender. Er gebeurt nauwelijks iets. Een mogelijke verklaring is dat het hierbij betrokken NER proces (fig 33) niet werkzaam mag zijn als andere mechanismen die betrokken zijn bij het normale dubbelstrengs DNA breukherstel tegelijkertijd ook actief zijn (in de meiose voor crossing over gebeurtenissen). In 2015 werd door de vooraanstaande expert op dit complexe gebied, Francesco Marchetti uit Ottawa Ontario in Canada, gepubliceerd dat bij muizen DNA schade in de mannelijke **kiembaan** door het chemotherapeutikum Melphalan (na blootstelling tijdens de lange meiotische profase) pas in de **zygote**

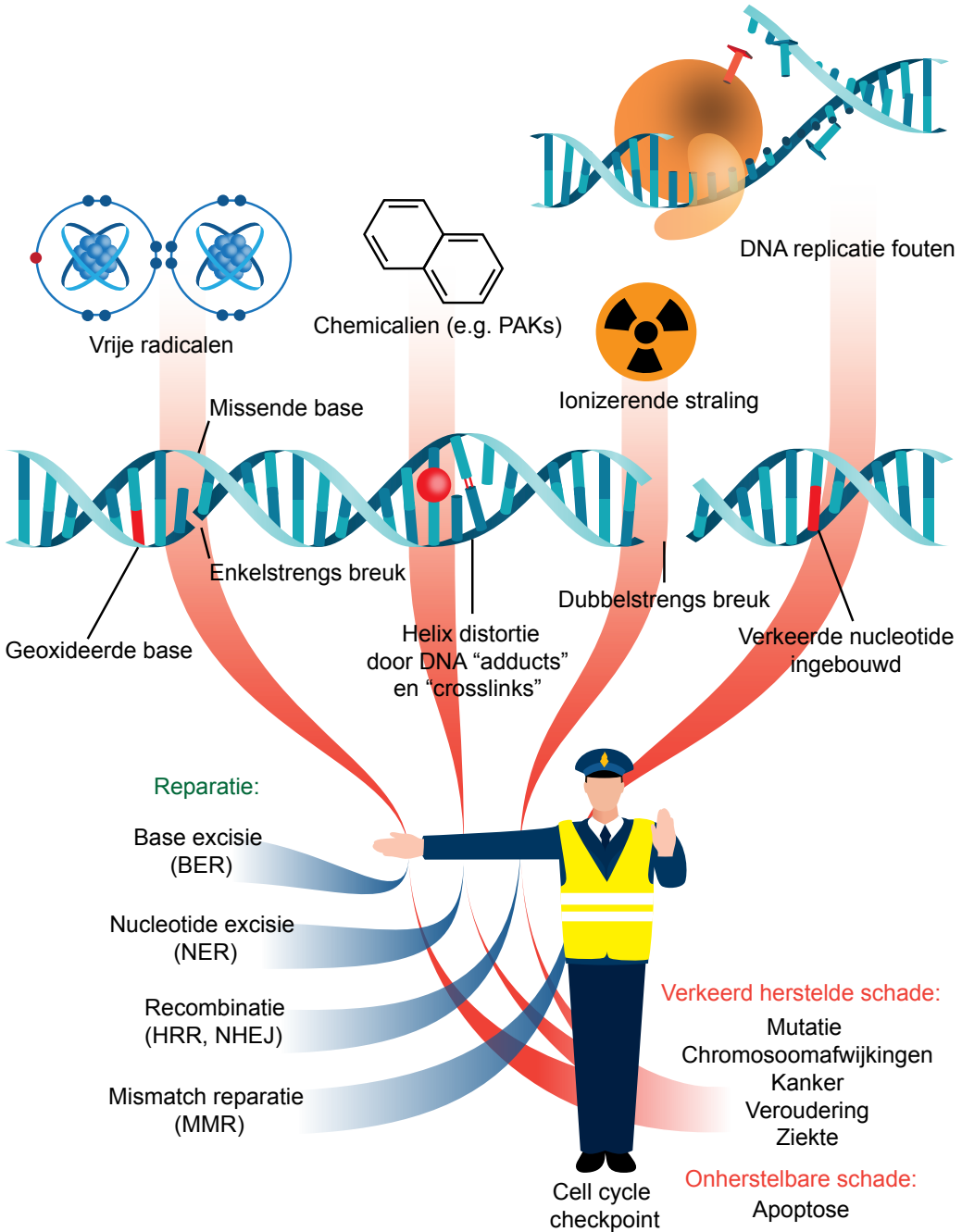


FIG 33

Sterk vereenvoudigde klassieke voorstelling van de relatie tussen **DNA** beschadigingen en de indeling van DNA herstelpaden. Deze zijn niet zo hermetisch van elkaar gescheiden als hier wordt voorgesteld.

Reparatie kan zowel foutloos zijn als fouten (**mutaties**) opleveren. Het spectrum aan fouten bij het herstel is zeker groter dan het uiteindelijke **mutatiespectrum**, omdat een aantal fouten dodelijk zullen zijn voor de cel. Wanneer de schade onherstelbaar is zal de politieman (zie ook fig 4) vaker in actie komen en het traject naar **apoptose** inzetten. Gepubliceerde schattingen van beschadigingen aan het DNA per kern per dag geven een goede indruk van het belang van DNA herstel. Van 10-50 dubbelstrengs breuken en van 10 tot 50.000 ander beschadigingen. Het verlies van een amine groep op cytosine (100-500 keer per dag) is betekenisvol: wanneer deze cytosine gemethyleerd is (fig 11, en dat is meestal het geval) verandert er een C in een T (de meest frequent voor komende base verandering). Zonder DNA herstel is er geen leven mogelijk. Spontane mutaties bevinden zich aan de basis van **somatische ziekte** in het algemeen, met name kanker en aan veroudering gekoppelde ziekte. Als merker voor zuurstofschade door **oxidatieve stress** aan een base, zoals links voorgesteld, wordt vaak 8-oxoguanine gebruikt. Voor de afkortingen, zie de lijst achterin.

wordt hersteld met structurele chromosoomafwijkingen tot gevolg. Melphalan is een zogenaamd bifunctioneel alkylarend agens.

Na de meiose, tijdens de spermiogenese, wordt de situatie nog complexer. Als er dan wat met een chromosoom, dat dan in enkelvoud aanwezig en uit één chromatide bestaat, aan de hand is, is er geen kopie voorhanden om de originele informatie bij op te halen. Alhoewel er in ronde spermatiden nog wel wat reparatie van dubbelstrengs DNA breuken plaats vindt, lijkt het naar mate de spermiogenese vordert steeds aantrekkelijker te worden om het er maar bij te laten zitten en de eventuele reparatie in de eicel af te wachten (H13.5.2). Veel van de hier gebrachte kennis is echter tamelijk speculatief en ons inzicht in DNA repair van het haploïde deel van de kiembaan, is zeker voor de mens, nog steeds erg beperkt. Next generation sequencing (NGS) brengt daar op het niveau van de enkele base langzaam over de hele kiembaan bekeken verandering in, omdat patronen van mutaties gekoppeld kunnen worden aan de fouten die er bij

DNA herstel kunnen optreden (deze manier van denken en onderzoeken stamt uit het genetisch onderzoek aan kanker). Exogene en endogene effecten, zoals de ongewenste bijverschijnselen van replicatie en transcriptie, kunnen zo in beeld gebracht worden. Ook de gevolgen van ongewenste demethylatie van mCpG (fig 11) worden in de analyse betrokken. Bovendien levert deze manier van analyseren een brug naar herstel van de schade in de zygote op (H13.5.2). De grote en expanderende databestanden van gnomAD en TOPMed (H3.2) dienen zo als basis van deze manier van analyseren, die zoekt naar het onderliggend proces op basis van mutatiepatronen, hetgeen een specialistische bezigheid is.

12.8 Aantallen zaadcellen, de productie

De criteria voor de beoordeling van de spermaproductie in het ejaculaat zijn in eerst instantie simpel: het volume, de zaadcelconcentratie, het totale aantal zaadcellen, de bewegelijkheid en de morfologie van kop en staart worden gemeten (tabel 5, fig 34). Wanneer je ervaring hebt met onderzoek aan muizen, ratten of landbouwhuisdieren, valt het afwijkende beeld bij de mens meteen op. In menselijk sperma zien we een grote variatie in uiterlijk en bewegelijkheid van de zaadcellen. Dit valt samen met een lage productie. In een overzicht uit 2009 van Rupert Amann uit Colorado, staat een tabel met daarin de spermaproductie per gram testis van de mens tussen een hele serie zoogdieren, waaronder resusaap, stier, rat en konijn en hamster. De mens is hekkensluiter. De beste mannen scoren nog altijd een factor 3 lager dan rat, konijn en hamster.

De meeste aandacht bij een zaadcelonderzoek gaat nog altijd uit naar het celaantal. De eerste keer dat ik daar wat van zag was op een bijeenkomst, in de jaren 70, van de Vlaams Nederlandse vereniging voor fertiliteitsstudie. Deze vereniging bestaat nog steeds, heeft een sterk klinische inslag en organiseert twee keer per jaar een programma met voordrachten. In België hoorde ik Frank Comhaire, toen in Gent, over de zaadcelproductie praten. Hij toonde een dia waarin een man over een deel van zijn leven was gevolgd. De curve toonde meestal een redelijk gelijkmatig verloop van de zaadcelproductie maar tijdelijk kon het ook helemaal mis zijn met een grote dip.

Men is het er over eens dat a) de beste maat de zaadcelproductie per uur is en b) dat een eenmalige bemonstering niet voldoende is. In het laatste geval kan het interval tussen twee opeenvolgende metingen veel uitmaken. Bij ejaculatie wordt het laatste deel van de bijbal (fig 31, 35) naast wat er in de zaadleider (de vas deferens) zit gelegegd. Dan geven meerdere, liefst drie samples met een tussentijd van 42-54 uren de beste indruk. Maar variatie blijft er. Daar zijn oor-

Spermiogram parameters

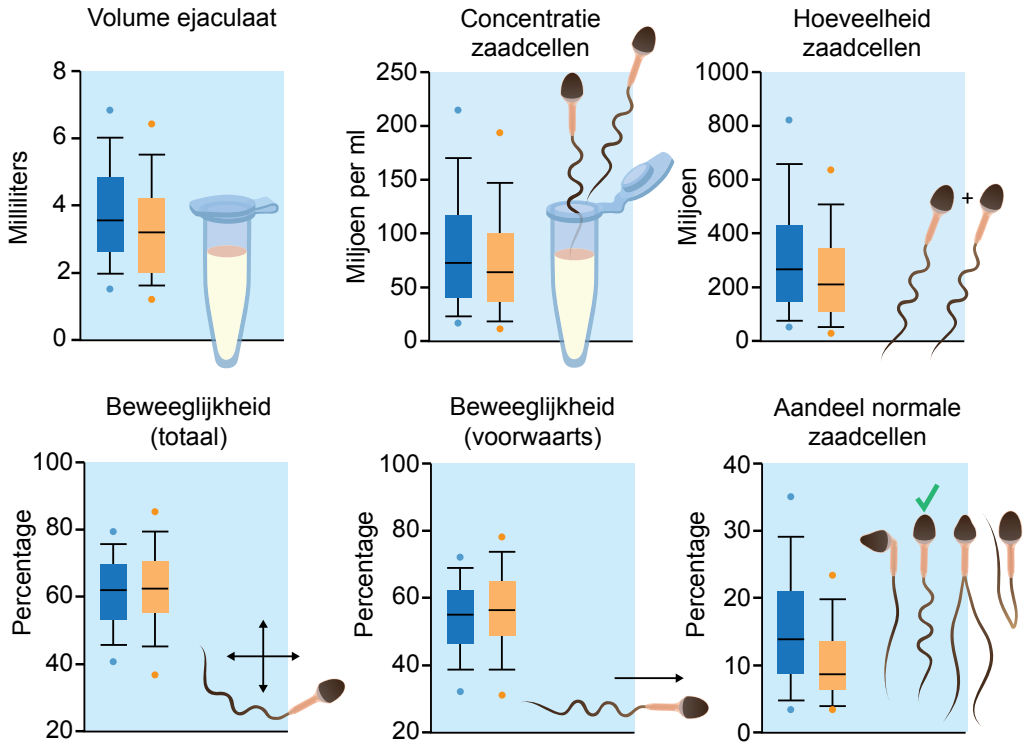


FIG 34

Beoordelingscriteria van een zaadcelmonster, geïllustreerd aan de boxplots uit een WHO publicatie in het bekende tijdschrift Human Reproduction Update 2010. Het gekleurde vlak bevat in een oplopende volgorde van waarden de percentages 25-75. De verticale lijn begrenst de waarden van 10 tot 90% en tussen de punten liggen de waarden van 5-95%. De horizontale lijn in de box geeft de middelste, de mediane waarde. Oranje: steekproef uit de hele populatie. Blauw: mannen die betrokken zijn bij een zwangerschap binnen 12 maanden. Voorwaartse bewegelijkheid wordt ook omschreven als progressief bewegend.

zaken voor. Ten eerste kan het verblijf van zaadcellen in de bijbal nogal variabel zijn en langer duren wanneer de aanmaak minder is (fig 35). Kun je er bij de muis de klok op gelijk zetten dat het transport zo ongeveer een week duurt, bij de mens zien we dat het minder dan 2 tot wel 14 dagen kan duren om zaadcellen door de ongeveer 5 meter lange buis waaruit de epididymis bestaat heen te geleiden. Bij de chimpansee, een mensaap met een andere reproductieve strategie, duurt dit proces vanwege een grote zaadproductie altijd maar kort.

In de onderzoek- en diagnostische setting worden zaadstalen meestal in a-fysiologische omstandigheden geproduceerd. Hoe zeer de interieurarchitect van het ziekenhuis ook zijn best heeft gedaan en welke visuele stimuli ook aanwezig zijn, het is niet de natuurlijke entourage. Uit de literatuur blijkt niet dat stimulering via het aanschouwen van pornografie de zaadproductie omhoog helpt. Uit wat ouder onderzoek blijkt, dat wanneer de meting volgt op het gebruik van een condoom in een situatie waarvoor die bedoeld is, er meer zaadcellen in de telkamer terecht komen, ondanks het feit dat een kleine fractie aan het rubber blijft plakken, het blijft wetenschap. Bij de runder KI maakt opwinding in de redelijk steriele omgeving van het spermawincentrum wel uit. Een stier moet een paar keer het fantoom (de kunstkoe) bespringen voor het tot een ejaculatie komt. Ook moet het dier niet vaker produceren dan 2-3 keer per week.

Reproductie blijft toch ook in belangrijke mate een kwestie van gedrag, waarbij de aanspanning van onwillekeurige spieren bij opwinding een rol speelt. Gedrag is variabel en zo ook de gedragsmatige bepaalde variatie in de zaadcelproductie, iets waar bij de runder KI gebruik van wordt gemaakt door de stier voor de sprong te "prikkelen". Er zijn ook genetische muizenmodellen die dit aspect illustreren. Een artikel hierover uit het jaar 2000 ging over een knockout muis voor een gen dat codeert voor een eiwit, betrokken bij de prikkeloverdracht naar de gladde spiercellen in de wand van de afvoergang van de bijbal (de zaadleider, fig 31, 35). De muizen hadden normale testikels, copuleerden, niets aan de hand, maar maakten hun partners niet zwanger. Geen wonder dat dit resultaat het gerenommeerde tijdschrift Nature haalde.

Wanneer het aantal zaadcellen in het ejaculaat wordt geteld, komt daar in de literatuur meestal een concentratie uit. Figuur 34 geeft een idee van de grote spreiding zoals die bij mannen wordt gevonden. Kijk je naar de belangrijkste parameter, het totale aantal, dan zit er een piek tussen de 100 en 200 x 10⁶. Ter vergelijking, voor de stier is een miljard zaadcellen per ml niets bijzonders.

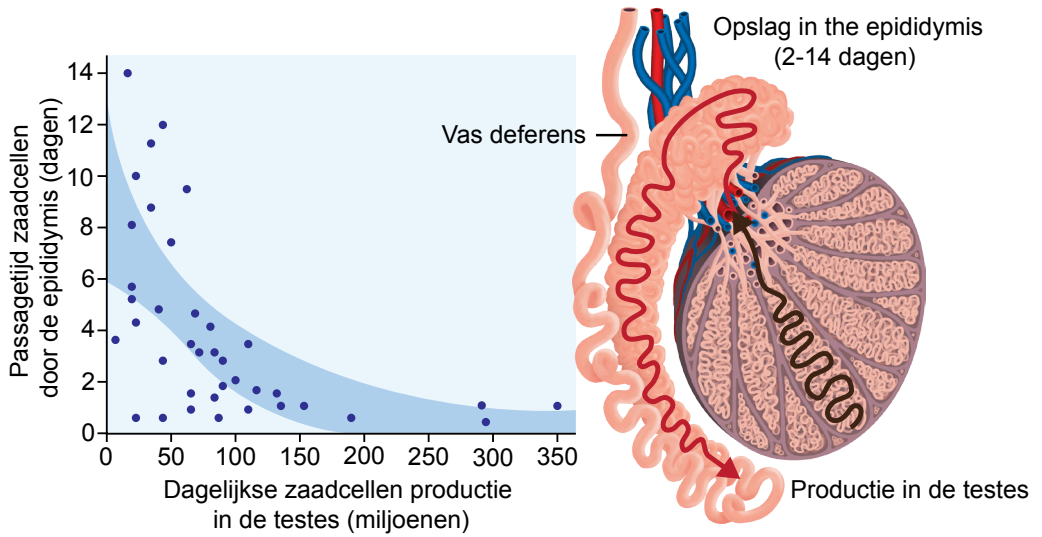


FIG 35

Een waardevolle grafiek uit het overzichtsartikel van Robert Amann uit 2009. De relatie tussen de dagelijkse productie aan zaadcellen en de passagetijd door de bijbal (de epididymis) is duidelijk. Bij een lagere productie neemt de variatie in de passagetijd sterk toe en daarmee de kans op beschadigingen aan het DNA door bijvoorbeeld **oxidatieve stress**. Rechts de globale anatomie van de testis, de epididymis (bijbal, het rode traject) en het begin van de vas deferens (de zaadleider). De afvoergangen uit de testis naar de bijbal staan bekend als de rete testis (zie ook fig 22).

12.9 Het spermioogram

Het resultaat van een zaadcelonderzoek volgens de criteria van de WHO wordt weergegeven in een **spermioogram** (tabel 5, fig 34). Een vuistregel is dat wanneer het aantal zaadcellen zakt, het spermioogram over de hele linie slechter wordt. De bewegelijkheid wordt minder, het aantal uiterlijk afwijkende zaadcellen stijgt en dat doet ook het aantal dode zaadcellen. Dit verschijnsel komt zo vaak voor dat het als syndroom een naam heeft gekregen: OAT, Oligo Astheno Teratozoöpermie. Bij als gevolg van vruchtbaarheidsproblemen voor een zaadcelonderzoek doorverwezen mannen vindt men heel vaak OAT (tabel 5, fig 36). Oligo is weinig, astheno

betekent bewegingloos, en terato staat voor misvormd. Deze drie parameters kan men in alle gradaties gecombineerd tegenkomen. Bewegelijkheid is geen zwart/wit begrip, er zit veel variatie in. Wanneer er geen beweging is, is de kans op celdood groot. In de volksmond wil de term “sloom zaad” nog wel eens langskomen. Dan is er in het hele ejaculaat minder zaadcel bewegelijkheid te zien. Met als grote inzet het inschatten van de kans op bevruchting werd en wordt er heel wat af vergaderd en gepubliceerd over het spermioogram. Tabel 5 geeft de minimale waarden die per parameter voor een fertiel ejaculaat zijn vastgesteld, maar zaadcellen geven hun geheimen moeilijk prijs. Figuur 34 geeft een grafische weergave van de belangrijkste spermioogram parameters voor zowel de hele populatie, als voor mannen die in staat bleken hun vrouw binnen 12 maanden te bezwangeren. De grote variatie in alle beoordelingscriteria is duidelijk. Dit is dan ook precies de variatie die in het fertiliteitslab vergroot wordt waargenomen. Wat gebeurt er fysiologisch met combinaties van lage waarden zoals je meestal vindt (tabel 5)? In de afgelopen 20 jaar zijn de criteria voor een normale morfologie (het uiterlijk) weer aangescherpt. Men spreekt nu over “strict criteria”, minimaal 4% van de zaadcellen moet aan deze strenge regel voldoen (tabel 5). Je vraagt je toch echt af wat de biologische betekenis van dit alles is. De morfologie van “de winnende zaadcel” wordt immers in de natuurlijke situatie nooit gezien en dus niet gekend. Ondertussen zijn er uit de IVF wereld zwangerschappen gerapporteerd na gebruik van zaadcellen die de strikte criteria niet hadden gehaald. Wanneer er voor een TESE-ICSI (H16) nogal gezocht moet worden naar een zaadcel in het testisbiopt, is het niet aannemelijk dat de voorgeschreven criteria exact worden toegepast. Het is al mooi wanneer je aan een begin van bewegelijkheid kunt vaststellen dat de zaadcel leeft. De resultaten van een zaadcelonderzoek hebben dus, behalve in gevallen waarbij het gaat om totale onbeweeglijkheid, erg sloom zaad, een voortdurend erg lage telling, en/of een uniform optredende morfologische afwijking, maar een beperkte voorspellende waarde voor de kans op een spontane zwangerschap op een wat langere termijn.

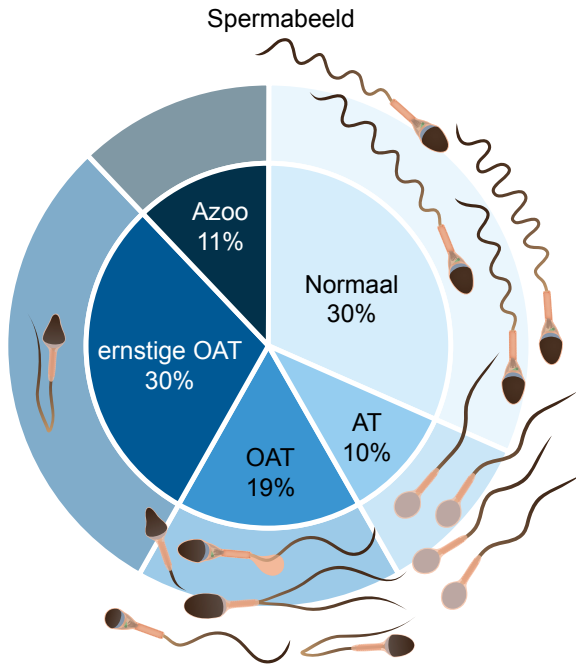


FIG 36

Een cirkeldiagram van zaadcel analyses van 26.091 naar het CeRA in Münster verwezen mannen, wanneer de oorzaak van de vruchtbaarheidsproblemen van het stel nog niet bekend zijn. De O van OAT staat voor oligo (weinig), de A voor astheno (geen beweging) en de T voor terato (afwijkende vorm). Bij AT is er sprake van bewegelijks- en vormproblemen. Bij de **azoospermen** (Azoo) wordt geen zaadcel gevonden. Dit beeld kan worden veroorzaakt door een obstructie in het afvoerende systeem (tot 40%), die voornamelijk in de bijbal te vinden is en veel vaker tijdens het leven ontstaat, dan dat het aangeboren is. Maar meestal (60% of meer) ligt het aan de staat van de **spermatogenese** waar een genetisch defect als oorzaak het meest voor de hand ligt. De bijdrage van azoospermie aan mannelijke infertiliteit wordt geschat op 10-15% (zie ook tabel 6). Deze tabel geeft een indruk van de huidige stand van de kennis omtrent de bijdrage van de genetica aan de verklaring van mannelijke in- en subfertiliteit. Bij de OAT mannen zijn er ook die met een andere partner wel vruchtbaar zouden zijn geweest.

Tabel 5 De grenswaarden van het **spermiogram** (met tussen haakjes het 95% betrouwbaarheidsinterval) voor een zwangerschap bij een jaar lang onbeschermd coitus.

Ejaculaat volume (ml)	1,4 (1,3-1,5)
Aantal zaadcellen (totaal x 10 ⁶)	39 (35-40)
Concentratie (zaadcellen x 10 ⁶ per (ml)	16 (15-18)
Totale beweeglijkheid (%) (voorwaarts en overig)	42 (40-43)
Voorwaartse beweeglijkheid (%)	30 (29-31)
Onbewegelijke zaadcellen (%)	20 (19-20)
Levende zaadcellen (%)	54 (50-56)
Morfologie, normale vorm (%)	4 (3,9-4,0)

Bij de diagnoses asthenozoospermie (onvoldoende beweeglijk) valt de waarde onder de grens van de tabel, voor een afwijkende morfologie (teratozoospermie) idem. Bij lagere aantallen bewegen de parameters beweeglijkheid en morfologie in de regel naar beneden mee. Dit is de basis van de veel voorkomende diagnose OAT (Oligo Astheno Teratozoospermie, zie ook fig 36 en tabel 6).

In 1999 omschreef de WHO de OAT conditie als meer dan 5 en minder dan 20 miljoen zaadcellen per ml. Bij een ernstige oligospermie zijn er minder dan 5 miljoen/ml. Sommige laboratoria hebben het over een extreme **oligospermie** (minder dan 100.000 zaadcellen per ejaculaat).

12.9.1 Heterogeniteit

Meestal neemt de heterogeniteit toe wanneer het aantal zaadcellen daalt. Aan het begin van deze eeuw hebben we in Nijmegen ook gekeken naar de variatie in de zaadcellen bij OAT mannen. Dit soort onderzoek is eigenlijk berucht moeilijk. Alhoewel het aantal publicaties over humane zaadcellen per jaar hoog is, heeft de vooruitgang in begrip daar jarenlang geen gelijke tred mee gehouden. Het feit dat de kern een zo compacte morfologie heeft (H12.6, fig 32) is hier de hoofdoorzaak van. Maar er zijn ingangen om het onderzoek te vergemakkelijken.

Gebruik van het anti-bloedstollingsmiddel heparine helpt bij het “ontspannen” van de kern, ook als de cel op een glaasje geplakt zit. Dit maakt het mogelijk om m.b.v. **immunofluorescentie** microscopie een indruk te krijgen van de hoeveelheid nucleosomaal chromatine (fig 32); is het meer dan je zou verwachten. Ook kun je met een klein fluorescerend molecuul dat chemisch

kan reageren met de SH-groep van het aminozuur cysteïne in de protamine eiwitten (H12.6, fig 32), de kernen doen oplichten. Zo kun je het vergrendelen van het chromatine volgen.

Hier is het zien van minder fluorescentie juist beter. Uit ons onderzoek bleek dat bij de OAT patiënten een kleine 50% van de spermaticiden in de testis het vergrendelen van het chromatine naar een compactere structuur niet had afgemaakt. Maar we vonden ook, en daar waren we helemaal niet naar op zoek, dat er in de bijbal van de OAT mannen nog iets heel anders aan de hand is. Het “crosslinken” van de SH-groepen van de protamine eiwitten ter verdere stabilisatie (H12.6, fig 32) vindt voornamelijk daar plaats. Het is een oxidatief proces dat ook te zwaar kan worden aangezet, en dat is wat we zagen. Bij het variabele verblijf van zaadcellen in de bijbal moet het chromatine gecontroleerd beschermd worden tegen oxidatieve stress door **vrije zuurstofradicalen** (die overigens als eerste op de celmembraan aangrijpt), en dat wordt kennelijk minder goed verzorgd wanneer er minder zaadcellen aanwezig zijn. Daar komen nog een paar bronnen van cellulaire onrust bij.

Wanneer een zaadcel in de testis niet wordt afgemaakt, zit er vaak nog een cytoplasmadruppeltje aan de staart (fig 32, 34). Ook dat veroorzaakt oxidatieve stress, net als de aanwezigheid van witte bloedlichaampjes in het aanstaande ejaculaat. Kunnen zaadcellen hierdoor ten prooi vallen aan een eigen verkozen dood, aan apoptose? De verzamelde mening is dat dat wel degelijk kan, met een voor de zaadcel eigen variant op dit belangrijke proces. Er is een kleuring voor, die gebruik maakt van het feit dat gedurende de apoptose de cel zijn eigen DNA kapot knipt. Kennelijk kan het enzym dat dit doet vanaf de kernmembraan aan het chromatine knabbelen. Het zal niet verbazen dat deze kleuring in een OAT ejaculaat veel meer, tot ongeveer de helft, aan positieve kernen laat zien tegenover 10% bij de “normale” mannen.

Al heel lang proberen behandelaars uit de fertiliteitskliniek de zaadcellen met een compactere kern te scheiden van zaadcellen met een losse pakking. Dat kun je doen door de cellen in een buis, met behulp van centrifugaalkracht in een snel ronddraaiende centrifuge, door een gradiënt met een oplopende dichtheid van Percoll te drukken. De meest compacte bereiken de bodem van het buisje en kunnen vanaf hier geoogst worden.

Omdat geduld een schone zaak is, de stress bij toenemende onvruchtbare perioden toeneemt, en we in een wereld leven waarin we van veel zaken slechts door één muisklik gescheiden zijn, zie je in het veld van fertiliteitsonderzoek en -adviesing momenteel parallel nieuwe maar heel verschillende trends opkomen. Zo zijn er bijvoorbeeld op de vrije markt apparaatjes verkrijgbaar die aan de mobiele telefoon gekoppeld kunnen worden, waarmee men zelf inzicht kan krijgen in de zaadcelproductie en kwaliteit. Anderzijds, is een select groepje van internationaal

opererende onderzoekers in hun eigen afgeschermd wetenschappelijke wereld nog steeds heel actief bezig om het raadsel van de zaadcelheterogeniteit te ontrafelen in een poging tot betere voorspellers van de vruchtbaarheid te komen.

12.9.2 DNA methylatie in zaadcellen

Met de differentiatie van de gonocyten naar de stamcel spermatogonia (H8), de latere stamcellen van de spermatogenese, begint het CpG methylatieniveau van het DNA te stijgen. Uiteindelijk leidt dit tot een situatie waarbij het DNA in zaadcellen zwaar is gemethyleerd (fig 11, 23). Het bepalen van de methylatie status (het **methyloom**) van het DNA in een populatie zaadcellen zou informatie kunnen geven over (a) het verloop van de ontwikkeling van de kiembaan in de embryonale en foetale testis, (b) over de geschiedenis van de genregulatie in de spermatogenese en, (c) een combinatie van beide, over de heterogeniteit van de zaadcelvorming in de testis. Ook de effecten van lichaamsvreemde stoffen op de methylatiestatus tijdens differentiatie worden soms in dit onderzoek meegenomen (H17). De groep van Jörg Gromoll aan het CERA (Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie) in Münster Duitsland focust op het feit dat zaadcellen voor selecties van CpG posities “methylatie heterogeen” zijn. Ze koppelen dat aan mannelijke onvruchtbaarheid en aan het **“mozaïeke”** karakter van de spermatogenese. Dat wil zeggen dat afwijkingen van het normale methylatiepatroon al in de stamcellen hun beslag hebben kunnen krijgen, daarmee voor het hele leven de reproductieve status van de afstammelingen van deze stamcel beïnvloedend. De groep van Douglas Carrell van de afdeling Andrologie van de universiteit van Utah USA nam een andere route en heeft gekeken naar de methylatiepatronen in zaadcellen bij mannen met een normaal spermiogram en mannen die de hulp van het fertiliteitslab nodig hadden om vader te worden. Zowel de tijd om de partner zwanger te maken als het “succesvol” zijn in het fertiliteitslab bleek samen te kunnen hangen met het methylatiepatroon van het DNA van de zaadcellen. Hiervoor werd dan gekeken naar methylatie op een aantal selecte posities in het genoom.

Al eerder was bekend dat de methylatie status van een ICR (zie H10 **genomische imprinting**, fig 27) gevoelig is voor een wankele spermatogenese. Bij een paternaal geïmprinte ICR is er dan een grotere kans op onvolledige methylatie terwijl die voor een maternaal geïmprinte ICR juist optreedt waar deze afwezig moet zijn. Een klinische toepassing heeft deze te denken gevende observatie niet.

Karakterisering van het methyloom van de zaadcel zal wel in belangstelling van onderzoekers blijven staan. Het kan leiden tot beter begrip van de embryonale ontwikkeling en de invloed van het milieu op de kiembaan. Hoever zijn we dan af van het moment waarop een techniek als deze kan dienen als diagnostische en prognostische indicator voor succes bij kunstmatige voortplantingstechnieken?

12.9.3 De X,Y en slecht zaad

In hoofdstuk 12.5.3 werd aangeroerd dat het inactief zijn van de transcriptie van de sex chromosomen in het “sex body” van de eerste meiotische profase essentieel lijkt te zijn voor de kwaliteit van het zaad. Zowel bij muis als mens worden hierbij nucleosomen grootschalig afgebroken en weer in een iets andere samenstelling opgebouwd (H12.5.2). Bij de mens gebeurt dit duidelijk minder drastisch dan bij de muis. Wanneer de scheiding tussen het “sex body” en het autosomale chromatine vervaagt (fig 37) en daarmee de transcriptie in het “sex body” toeneemt, dalen de zaadcelproductie en de kwaliteit (H12.5.3). Daarom is er een grotere kans om bij sub- en infertiele mannen Robertsonische en reciproke translocaties (fig 12) aan te treffen (H12.12.1, tabel 6). Zou variatie in de wijze en mate van inactivatie van het “sex body” iets te maken kunnen hebben met de grote heterogeniteit van de zaadcelpopulatie bij de mens?

Op de afdeling ontwikkelingsbiologie van het Erasmus Medisch Centrum in Rotterdam werd hier onder leiding van Anton Grootegoed op een moleculaire manier naar gekeken. Bij de chimpansee wordt de selectie voor een grote zaadcelproductie toegeschreven aan het parings-systeem, waarbij competitie tussen zaadcellen van verschillende mannen uit een leefgemeenschap, op weg naar de te bevruchten eicel, heeft geleid tot grote testikels, grote ejaculaten en wellicht ook een betere prestatie per zaadcel. De chimpansee heeft ook veel minder variatie in de vorm van de kop van de zaadcel.

De mogelijkheid dat de prestatie van zaadcellen samenhangt met hoge of lage expressie van een selecte groep van genen bracht Anton en medewerkers er toe om eens te gaan kijken naar de expressie van genen op de sex chromosomen in testikels van mens en aap. Wat ze vonden was dat het omlaag brengen van de transcriptie tijdens de spermatogenese bij de chimpansee wat beter gecontroleerd werd uitgevoerd dan bij de mens. Dan verwacht je in dit opzicht ook minder variatie tussen de spermatocyten van de chimpansee in vergelijking tot die van de mens, en ergo meer homogeniteit in de ejaculaten. Zijn de geslachtschromosomen hier dan toch bij betrokken?

12.9.4 DNA schade in zaadcellen

Het DNA van zaadcellen kan beschadigingen oplopen. Dit kan gebeuren bij het inpakken van het DNA tijdens de door protamine bepaalde herstructurering van de kern van de zaadcel (H12.6, fig 32), maar nog waarschijnlijker tijdens het verblijf in de bijbal. Dat is zeker het geval als dit verblijf langer duurt, zoals bij een geringere aanmaak van zaadcellen het geval is (H12.8, fig 35). Daar kan oxidatieve stress door **vrije zuurstofradicalen** een rol bij spelen, alhoewel de afvoerende buis er een verdedigingsapparaat voor heeft. De mogelijkheden om de structurele kwaliteit, de intactheid, van het DNA te bepalen, zijn voor de zaadcellen nogal beperkt. De mate van schade kan dus nooit met een hoge graad van gevoeligheid worden vastgesteld. Voor achtergebleven DNA schade zoals dubbelstrengs breuken kan de eicel als zygote dat wel (H13.5.2). Met de beschikbare *in vitro* laboratoriumtests voor DNA schade karakteriseert men het DNA uit de hele celpopulatie of een opgezuiverde fractie daaruit. Daarna probeert men te voorspellen wat de "embryonale ontwikkelingskracht" van het zaad van de patiënt is. Bij de meest betrouwbare techniek hiervoor laat men het DNA vanuit de kern migreren o.i.v. een elektrisch geladen veld. Wanneer er DNA breuken zijn en dus chromosomale fragmenten zijn ontstaan bewegen die, omdat DNA negatief geladen is, naar de plus pool. Het uit de kernmatrix (fig 32) gemigreerde DNA kan dan na aankleuring worden gekwantificeerd. Bij apoptotische zaadcellen zal dit beeld het meest duidelijk zijn. De waarde van een dergelijke bepaling voor de moleculaire integriteit van het DNA uit de hele celpopulatie van het ejaculaat is jarenlang in twijfel getrokken. Een in 2017 verschenen meta-analyse, gebaseerd op 41 studies, toonde aan dat de aldus op een grove manier vastgestelde instabiliteit van het DNA van een zaadmonster wel degelijk voorspellende waarde heeft voor de kans op een doorgaande zwangerschap. Het is hierin niet de hoofdvariabele, de kwaliteit van de eicel is veel belangrijker (H11.2, H11.5, H13.5.3, H16.3.2).

12.10 Dalende tellingen

In 1992 werd de wereld opgeschrikt door de publicatie van een studie uit Denemarken die over de voorgaande 50 jaar een forse daling van het aantal zaadcellen per ejaculaat rapporteerde. Deze studie heeft lang stof doen opwaaien. Zelfs in 2013 werd hier nog op hoog niveau over gedebatteerd, men vertrouwde de uitkomsten van de studie niet. Met een groot overzicht van de spermatellingen uit de periode 1973-2011, waarin 185 publicaties en metingen bij bijna 43.000 mannen zijn samengevat, wordt in 2017 het pleit beslecht. Het maakt niet veel uit of je

kijkt naar de concentratie of naar de totale hoeveelheid, de daling in deze periode beweegt zich rond de 50%, met een dalingstempo van iets van 1,4% per jaar. De auteurs van deze in Human Reproduction Update verschenen publicatie benadrukken, dat daling optreedt in de hele westerse wereld: In Europa, USA, Australië en Nieuw Zeeland. Maar in China wordt deze trend ook waargenomen. De discussie over de dalende zaadcelproductie in de westerse wereld is in 1992 op gang gekomen door toedoen van Niels Skakkebaek, die nu in de tachtig is. De bron van de Deense zorgen kwam niet uit het IVF lab, maar vanuit de oncologie en de geslachtsontwikkeling. Als een soort van *opus majus* heeft de groep rond Skakkebaek alles in 2016 nog eens op een rij gezet, een exercitie die in 2021 nog uitgebreider is herhaald. Een aantal trends geven inderdaad aanleiding tot de ongerustheid. Er wordt een samenhang gezien met de geslachtsdifferentiatie en met het reprogrammeren van de kiembaan. In relatie met dit laatste proces, is het opmerkelijk dat de incidentie van testiculaire kiemcel kanker bij relatief jonge mannen (14-44) de laatste drie decennia een oplopend patroon vertoont. Bij ongeveer 9 per 100.000 mannen in Europa wordt deze vorm van kanker gevonden. Kankercellen ontstaan hierbij uit prenatale kiemcellen, waarbij in de bevestiging van hun status als “stamcel in spe” fouten zijn gemaakt. Het **pluripotente** aspect van deze cellen blijft kennelijk nog te dominant, waardoor de kans op een kiemcel neoplasie groter wordt (H8, box 2). Een eenduidige “driver” mutatie, oorzakelijk en gemeenschappelijk voor dit type tumoren, is nooit gevonden. Mutaties spelen overigens verder wel hun bekende rol in het tot ontwikkeling komen van kiemceltumoren. Bekende andere risicofactoren zijn het niet goed indalen van de testikels (cryptorchidie) en onvruchtbaarheid.

Skakkebaek betreft afwijkingen in de ontwikkeling van de testis en de afvoergang van het mannelijk urogenitale systeem, met als kenmerken de stijgende tendensen bij hypospadias, (de urineleider komt bij jongens te snel naar buiten) en cryptorchidie, in zijn analyse van de dalende spermatellingen. Uit een cocktail van bevindingen, die allemaal met de ontwikkeling van de testis te maken hebben destilleerde Skakkebaek zijn levenswerk, het definiëren van het “Testicular Dysgenesis Syndrome” (TDS), een testis die embryonaal en wellicht ook daarna in het risicogebied zit. In deze analyse speelt het begrip “**endocrine disruptor**”, een onderzoeksgebied op zichzelf (en te groot voor dit boek) een rol. Maar misschien daarom komt het in het hoofdstuk over **epigenetische** overerving, hoofdstuk 15, weer terug. Niels Skakkebaek ziet de testis (en de prenatale ontwikkeling ervan) vooral als een orgaan waarop de belasting door milieufactoren een duidelijke impact heeft en hij is hierin niet de enige.

12.11 Heeft een lage zaadcelproductie gezondheidsaspecten?

Wanneer de spermatelling laag is, staat dat dan los van andere lichaamsfuncties? Dat kan maar hoeft niet zo te zijn. Toen door de technische vooruitgang binnen de kunstmatige voortplantingstechnieken een minieme opbrengst aan testiculaire zaadcellen (TESE, H16.1, H16.3.1) in principe de bevruchting mogelijk maakte, verschenen er in de literatuur publicaties (zo rond 2000) waarin men zich afvroeg of de waargenomen steriliteit wel helemaal op zichzelf stond en of er geen relatie was met andere medisch-fysiologische problemen. Daarna is het een hele tijd stil geweest, maar in de afgelopen jaren zijn er grotere epidemiologische studies gepubliceerd, die relaties met andere klinische problematiek laten zien. Als eerste duikt ook weer op dat een slecht functionerende testis een risico is voor teelbalkanker. Als tweede wordt weer bevestigd, dat een grote lichaamsomvang geen positieve voorspeller is van de zaadcelproductie. Maar het zegt weinig over de zaadcelbewegelijkheid.

Er zijn nu, op het moment van schrijven, drie publicaties die laten zien dat de spermaproductie en ook de beweeglijkheid van het zaad, goede voorspellers zijn van de algehele gezondheid. Bij de groep van mannen die in aanmerking kwam voor spermaonderzoek werd een verband gevonden met een hogere kans op een ziekenhuisopname en met een verkorte levensverwachting. De kennelijke slechtere gezondheid bij deze mannen kon worden gecorreleerd aan problemen in het cardiovasculaire systeem en het voorkomen van diabetes (typen 1 en 2). De hamvraag is natuurlijk of dit “nature” of “nurture”, of wellicht een combinatie van beide is. Met “nature” bedoelen we in deze context, dat genen die in de testis functioneren ook betrokken zijn bij overige gezondheidsaspecten. Dat lijkt een redelijke aanname vanwege de grote aantallen genen die bij elk kenmerk betrokken zijn. Dit maakt overlappende effecten, in meerdere weefsels of organen tegelijkertijd, meer dan waarschijnlijk. “Nurture” komt in hoofdstuk 17 nog aan bod, wanneer omgevingseffecten op de sperma productie vanuit een meer toxicologische invalshoek worden aangestipt. Zoals eerder gezegd ligt in dit boek daar de nadruk niet op. Recentelijk is vanuit China ook het microbiom van de genitale tractus bij de man geassocieerd met een verstoorde fertilititeit, alweer demonstrerend dat letterlijk ieder biologisch mechanisme er een effect op kan hebben.

12.12 Genetische oorzaken van verstoorde zaadcelvorming

Tot op heden is er relatief weinig progressie gemaakt in het opsporen van de veronderstelde genetische oorzaken van een verstoorde of suboptimale zaadcelvorming (tabel 6). Dat er,

eigenlijk vanzelfsprekend een genetisch aspect moet zijn werd mooi zichtbaar in een Engels onderzoeksproject dat in 1994 werd gepubliceerd. Daarin keken ze in een niet al te grote populatie naar de broers van mannen die een fertilitetskliniek hadden bezocht terwijl er bij hun vrouwen geen enkele aanwijzing voor een verminderde vruchtbaarheid was gevonden. Van die broers had 17% ook een fertilitet hulpvraag, terwijl dat bij geen der broers van de mannen in de controlegroep het geval was. Het gevonden verschil is hogelijk significant. Om in de spermatogenese verder te komen met genetisch onderzoek is het nodig eerst meer te vertellen over de manifestaties van infertiliteit op histologisch niveau.

In hoofdstuk 12.2 werd beschreven dat het typeren van de humane spermatogenese aan de hand van de histologie geen sinecure is. Helemaal moeizaam is het bij mannen waarbij de spermatogenese een minder optimaal verloop kent. Bij vruchtbaarheidsproblemen is er immers sprake van een glijdende schaal, variërend van totale afwezigheid van spermatogenetische cellen tot een situatie, waarin wel zaadcellen in de bijbal en ook in het ejaculaat belanden. In de eerst situatie heeft men het over het “Sertoli cell only syndrome” (SOS). Wanneer de spermatogenese in een bepaald stadium stopt, (zie H12.5.3 bij het uniform in werking treden van een checkpoint) spreekt men over een “maturation arrest”. Dat arrest kan dus deels of volledig zijn, afhankelijk van de genetische conditie die eraan ten grondslag ligt. De spermatogenese kan lokaal (focaal) aanwezig zijn alsof er een stamcelprobleem is (geweest) dat hier en daar is opgeheven. Tenslotte praat men in de oudere literatuur over hypospermatogenese; de stamcellen doen overwegend wel hun werk, maar toch is er gedurende de hele spermatogenese verlies van cellen. Naast een **oligospermie** (tabel 5, 6, fig 36) zijn er in de kliniek twee soorten van **azoospermie** (fig 36), de obstructieve en de niet-obstructieve. De obstructieve, bijvoorbeeld als gevolg van een ontsteking in de bijbal, past hier eigenlijk niet of nauwelijks. De kans op een genetische achtergrond is veel geringer en wordt hier niet behandeld.

Bij een niet obstructieve azoospermie, een probleem waarmee minstens 1 op de 200 mannen mee te maken heeft (zie tabel 6 voor een schatting), kan het histologische beeld nog steeds heel variabel zijn. In ongeveer 50% van deze gevallen zijn er wel zaadcellen in de testis aanwezig. Bij een fertilitetsbehandeling met behulp van een TESE (testiculaire sperma extractie) kunnen deze cellen dan worden opgezocht, of kan men met zekerheid constateren dat er echt niets te vinden is.

Tabel 6 Genetisch diagnose van de **spermatogenese** bij mannelijke infertiliteit (uitgezonderd hormonale aspecten en afwijkingen aan de afvoergangen).

Type mutatie	Azoospermie (0,7%) * Oligospermie (6,9%) *	*Asthen- en teratozoospermie 1% ****	Populatie incidentie (tabel 4)
Y deleties	3,3-9,1% (6,8%), meestal infertiele mannen die variëren van SOS tot mild oligosperm		?
Sex chromosomen: voornamelijk XXY	12,6-16,2% van de azoosperme mannen		0,16%
Reciproke translocaties	azoospermie 0,9% oligospermie 0,6%		0,14%
Robertsonische translocaties	azoospermie 0,09% oligospermie 1,6%		0,12%
Gendefecten	Azoospermie ** 1,2% N genen = 31 Oligospermie *** N genen?	50%	?

* De aannamen bij het samenstellen van deze tabel zijn dat 1 op de 7 paren problemen heeft met zwangerschap. In 50% van deze paren speelt een mannelijke bijdrage, van verminderd vruchtbaar tot onvruchtbaar (rond 7% van de mannen). Het schijfdiagram van figuur 36 is als uitgang genomen voor de verdeling tussen **azoosperme** mannen, **oligosperme** mannen en mannen met een morfologie of een bewegelijkheidsprobleem. Bij de azoosperme mannen (een frequentie van één op de honderd wordt vaak in de literatuur genoemd) is er gecorrigeerd voor andere oorzaken (bijvoorbeeld een obstructie in de bijbal, 30-40%). Bij de oligosperme mannen zullen er zeker zijn met een verminderd vruchtbare partner. De telling kan ook tijdelijke verlaging aangeven.

** Bij een azoospermie vertonen de meeste aangedane genen een **recessief** oververingspatroon. Om de kans op het vinden van de mutatie te vergroten richten de onderzoekers zich op een helder **histologisch** beeld zoals een uniform optredende stop in de spermatogenese ("maturation arrest"). Daarvan waren eind 2020 12 genen bekend waarvan zeker de helft ook betrokken bij de vrouwelijke **gametogenese** (met name de **meiose**). Het inzicht in de genetische achtergrond van vooral azoospermie stijgt omdat het onderzoek door gaat, en er nu "trio

sequencing" (H3.2) wordt toegepast. Een recent gerapporteerd onderzoek vanuit het Radboudumc kwam zo op 29 waarschijnlijk aan de infertiliteit bijdragende mutaties op een totaal van 192 in 185 patiënten (in meerderheid azoosperm en voor het overige zwaar oligosperm). Voor de vergelijking tussen de patiënt en de ouders werd **WES** toegepast. Bij deze analyse gaat men uit van een **dominant** effect van het door de mutatie minder of niet presterende allel.

*** De genetische analyse van oligosperme mannen waar een grote variatie in de histologische beeld van de testis te vinden is, is nog maar net begonnen.

**** Bij deze genetische diagnoses zie je een uniform beeld: afwijkingen in de staart/bewegelijkheid (astheno) of de afwezigheid van het kopkapje (het **acrosoom**, een globospermie, een vorm van teratozoospermie).

12.12.1 Chromosoomafwijkingen

Bij ongeveer 1 op de 1000 mannen zijn in de testis niet of nauwelijks spermatogenetische cellen te vinden. Dan hebben we te maken met het SOS syndroom van de vorige paragraaf. De meest voorkomende oorzaak hiervan is het aanwezig zijn van 2 X chromosomen. Met de Y erbij levert dat XXY aan geslachtschromosomen op, het karyotype dat hoort bij het Klinefelter syndroom (H3.4, tabel 4). Spermatogonia kunnen namelijk op de een of andere manier niet met 2 X chromosomen uit de voeten. Dat zou kunnen komen omdat er op de X nogal wat genen liggen die met de spermatogoniale vermenigvuldiging te maken hebben en dosiscompensatie door X chromosoom inactivatie (box 4) niet mogelijk lijkt. Een teveel aan eiwitproduct van deze genen kan even erg zijn als een gebrek eraan. Waarom vind je dan bij een deel van de Klinefelter mannen toch kleine haardjes van spermatogenese in de testis, tot zaadcellen aan toe? Kennelijk raakt er tijdens de delingen van de stamcel spermatogonia of de voorlopers ervan wel eens een X chromosoom verloren. Zo ontstaat er een kloon van XY dragende stamcellen met normale differentiatiekansen. Hoe klein die XY klonen ook zijn, met TESE kunnen in tot 50% van de Klinefelter mannen zaadcellen gevonden worden. De kansen op nageslacht zijn niet anders dan bij mannen die om een ander reden een niet obstructieve azoospermie hebben (H16.3.2).

Bij mannen die nog wel wat sperma produceren, en die in de OAT categorie vallen (fig 36) worden meer structurele chromosoomafwijkingen gevonden zoals Robertsonische en reciproke translocaties (H3.4.1, tabel 6, fig 12, 37). Problemen met de meiotische chromosoomparing met

als gevolg dat ongepaarde chromosoomsegmenten zich met de assemblage van het “sex body” gaan bemoeien (H12.5.3, H12.9.3, fig 37) is daar de oorzaak van. De frequentie van dit soort chromosoomafwijkingen is bij mannen met vruchtbaarheidsproblemen dan ook duidelijk verhoogd.

12.12.2 Y deleties

In 1976 verscheen er een opvallend artikel van onderzoekers uit Pavia, de oude universiteitsstad ten zuiden van Milaan. Het was ook niet de eerste keer dat er op reproductiegenetisch gebied een belangrijke mededeling uit de Povlakte kwam: de Sertoliceel werd al in 1865 vernoemd naar Enrico Sertoli, werkzaam in Milaan maar afkomstig uit Pavia. De wetenschappers uit Pavia rapporteerden in hun publicatie dat een door de lichtmicroscop zichtbare verkorting van de lange arm van de humane Y (fig 38) gepaard ging met steriliteit. Om deze bevinding op waarde te kunnen inschatten heb je kennis nodig van het DNA landschap van het Y chromosoom. Die is er nadien gekomen, maar de Y bleek wel een harde noot om te kraken. In 1996 werd meer duidelijk toen werd gerapporteerd dat er drie regio's op de lange arm van de Y specifiek betrokken waren bij of een totale azoospermie of een variabele oligospermie. De groep van Peter Vogt uit Heidelberg, Duitsland, duidde deze regio's, van het **centromeer** naar het **telomeer** lopend, aan met de AZFa, AZFb en AZFc (fig 38), maar kennis over het speciale karakter van het DNA in deze gebieden ontbrak nog. De reden waarom er met de toenmalige stand van het DNA onderzoek hierin niet een twee drie duidelijkheid kwam, lag besloten in de genetische structuur van het Y chromosoom, dat vol “**copy number variation**” zit (H3.3). Het lab van David Page op het MIT (Massachusetts Institute of Technology) in Boston zat op tijd op dit onderwerp. Het verder ontrafelen van de rol van de humane Y bij infertiliteit vond dan ook in belangrijke mate op dat laboratorium plaats. Een doorbraakpublicatie over de onderzoeksresultaten van een team van 40 auteurs, met als laatste David Page en o.a. Sjoerd Repping van het fertiliteitslaboratorium van het toenmalige AMC, verscheen in 2003 in het tijdschrift Nature. Hierin werd beschreven dat op de lange arm van de humane Y 8 regio's liggen waarin de DNA volgorde gespiegeld is (fig 38). Een dergelijke structuur staat bekend als een palindroom. Hier bedoelt men mee dat DNA basenvolgorde in twee of meervoud in twee oriëntaties voorkomen (omgekeerd en niet). De verwachting is gerechtvaardigd dat dit voor het Y chromosoom een evolutionair voordeel biedt. In het basis DNA motief van een dergelijk palindroom liggen verschillende genen die met de spermatogenese te maken hebben. Vanwege de chromosomale palindroomstructuur komen deze genen als regel in meerdere kopieën voor. Bij de mens, en ook bij de mensapen en

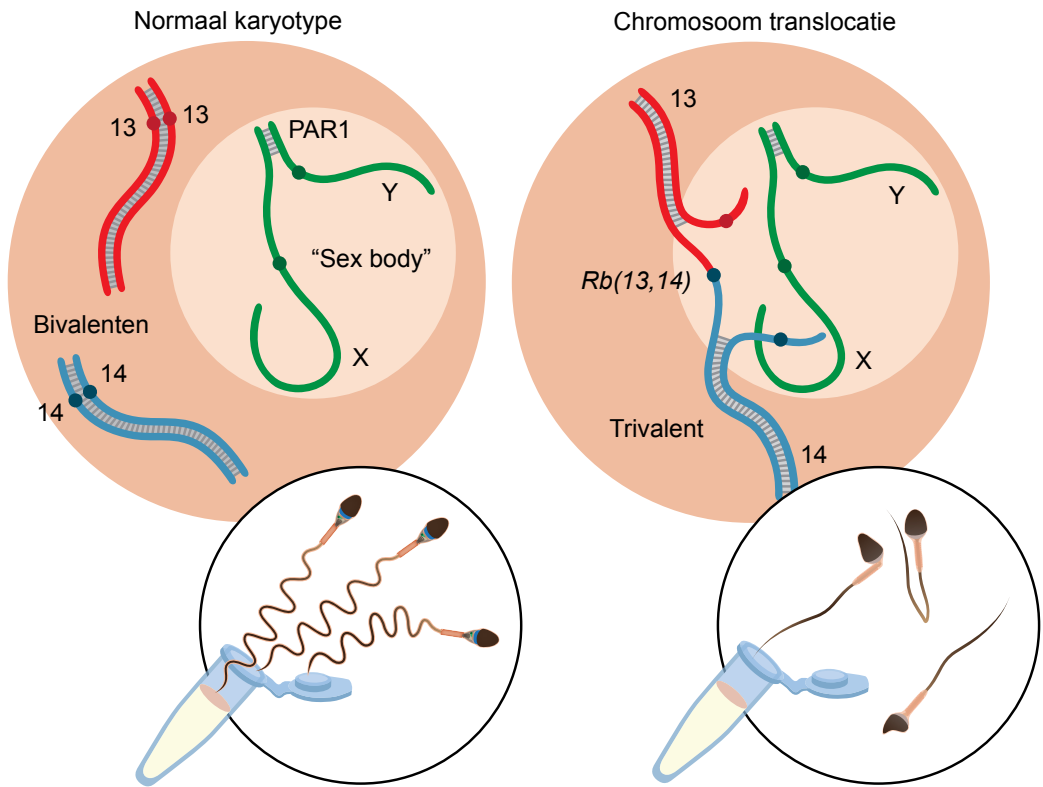


FIG 37

Problemen bij de **meiotische chromosoomparing** komen vaker voor bij dragers van een chromosoomafwijking, zoals reciproke en Robertsonische translocaties (fig 12). Dit leidt tot een verminderde sperma telling en kwaliteit (van een **azoospermie** tot een **oligospermie** (OAT), tabel 5 en 6, fig 36). Het opzoeken door ongepaarde **autosomale** chromosoom segmenten van de grotendeels ongepaarde **sex chromosomen** is daar debet aan. Dit verstoort zowel het uitschakelen van de **transcriptie** van het "**sex body**" als de gewenste transcriptie van de ongepaarde autosomale segmenten. PAR staat voor pseudo autosomale regio, waarvan de voornaamste (PAR1) hier weergegeven wordt (zie ook fig 38).

de andere aapachtigen (primaten), is de gerichtheid van in het Y chromosoom gelegen genen op mannelijke fertiliteit opvallend. Een consequentie van deze homologie binnen de Y is dat er in het “sex body” haarspeldachtige structuren in het chromosoom gevormd kunnen worden, tussen de “benen” waarvan ongewenste recombinatie kan optreden (H12.5.1). Hierdoor raken genkopieën die in deze “haarspeld structuren” liggen verloren. Men spreekt van AZFa, -b en -c deleties. Bijna altijd is daar door de microscoop niets van te zien en wordt moleculaire DNA technologie gebruikt om ze aan te tonen. In tabel 6 wordt een indruk gegeven van de negatieve gevolgen hiervan voor de mannelijke vruchtbaarheid. Het genetisch onderzoek naar de AZFa, -b en -c deleties wereldwijd is een mooi voorbeeld van een wetenschapsterrein dat steeds complexer wordt om uit te leggen (fig 38), maar dat wel de luiken openzet naar het begrijpen van het evolutionaire bestaan van “onze Y”. Zo stelt modern DNA onderzoek ons nu in staat om op wereldschaal vast te stellen dat de evolutie van deze “multi copy” genen op het Y chromosoom sneller gaat dan van de autosomale “multi copy” genen, iets, dat gezien hun bijzondere positionering en bovengenoemde mechanismen geheel in de lijn van de verwachting ligt. De bijzondere recombinatiegebeurtenissen die het Y chromosoom kan ondergaan kunnen, zij het in een minderheid ervan, ook van voordeel zijn vanwege het effect ervan op de gendosis.

Alleen wanneer er hele grote stukken, via recombinatie tussen de verwante DNA volgorden, als een ringvormige structuur uit het chromosoom worden gewipt ontstaat er een klinisch beeld. De deleties voor de AZF a en -b regio's (fig 38) leiden zo goed als altijd tot “Sertoli cell only” (SOS, de a deletie) of tot een volledige blokkade van de spermatogenese (de b deletie). Voor een complete AZFc deletie varieert het beeld van een SOS tot een ernstige oligospermie. Het bepalen van de status van de AZF gebieden behoort dan ook tot de standaard “work up” bij de vruchtbaarheidsdiagnostiek. Door de wat ingewikkeldere structuur van de AZFc regio kunnen daar door ongewenste recombinatie vaker dan bij de andere twee regio's, kleine deleties ontstaan. De gevolgen hiervan variëren van azoosperm tot een normale spermatogenese. Bij genetici staat dit fenomeen bekend als de invloed van “het restgenotype”, het individuele genoom dat kennelijk in staat is om de gevolgen van deze kleinere deleties te maskeren. Vanwege de genetische variatie in de populatie is dit niet bij iedereen mogelijk.

Wanneer in de kliniek een AZFc deletie wordt opgepikt is dit meestal het gevolg van een *de novo* mutatie, opgetreden in de meiotische cel die de succesvolle zaadcel voortbracht. Maar een fertiele vader, drager van deze mutatie, kan dus ook een onvruchtbare zoon voortbrengen als die deze zelfde mutatie heeft geërfd, maar daarop anders reageert.

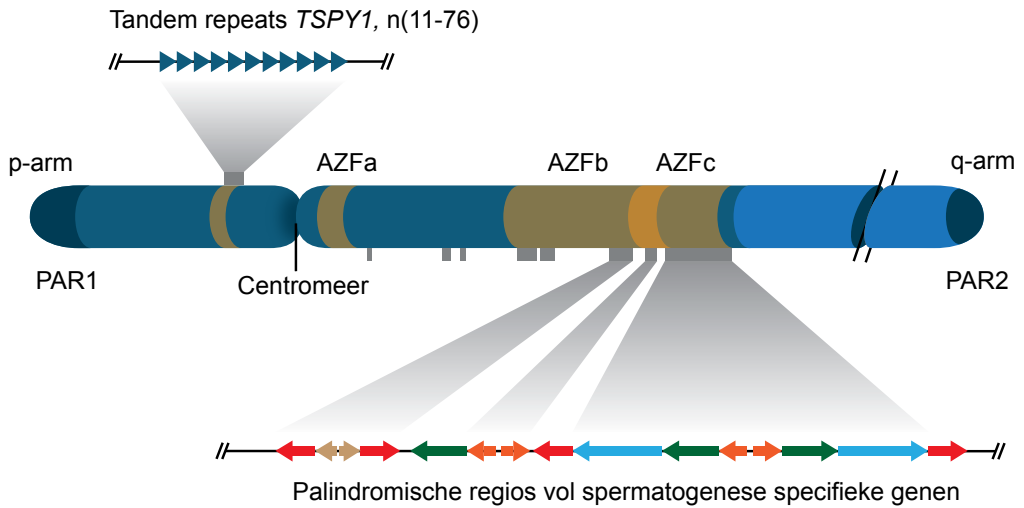


FIG 38

Het specifiek mannelijke deel van de Y bevat 9 “multicopy” **genen** die hoofdzakelijk gehuisvest zijn in 6 regio's die georganiseerd zijn als een palindroom. In de figuur zijn er 3 van weergegeven. De expressie van deze genen is testis specifiek. Het totaal aantal voor eiwit coderende genen op de Y is klein, er liggen er 16 in de PAR1, 4 in de PAR2, en 23 in het specifiek mannelijke deel. Zonder dat er sprake is van een klinisch fertiliteitsbeeld is er al grote variatie tussen mannen in het aantal kopieën per gen. De organisatie van deze genen, waarvan sommigen ook familieleden op de **autosomen** hebben, is een mooi voorbeeld van de oneindige complexiteit van het functioneren van ons **genoom**. NB: de PAR regio's zijn **homoloog** aan de einden van het X **chromosoom** (zie ook fig 15).

In de begintijd, na de ontdekking van de relatie tussen de Y deleties en de zaadcelproductie, kwam op een lezing hierover een grafiek langs met op de X-as het aantal generaties en op de Y-as de fractie mannen met een geheel of gedeeltelijke AZFc Y deletie. Wanneer je niets doet, dus niet op zoek gaat naar zaadcellen om bij IVF/ICSI in te zetten, zie je een horizontale rechte lijn: de aanmaak van nieuwe mutaties is even groot als de afvoer van mutaties door onvruchtbaarheid, er is een evenwicht.

Maar wanneer je de dragers genetisch in ieder geval gedeeltelijk redt via de hulp van het IVF laboratorium, kan de deletie zich in de populatie verspreiden, en zo in frequentie toenemen. Omdat niet iedere man met deze mutatie kinderen krijgt zal er ergens na vele generaties op een hoger niveau een nieuw evenwicht ontstaan. Dit is voer voor populatiegenetici en ook voor behandelaars.

Zouden die vlot geschreven krantenartikelen over het einde van het Y chromosoom door voortdurend DNA verlies ergens dan toch gelijk hebben? Ons evolutionaire bestaan duurde al lang genoeg om een dergelijk scenario bewaarheid te laten worden. Toch is het Y chromosoom niet verloren geraakt. Integendeel, de humane Y heeft zich gewapend door gebieden, belangrijk voor de spermatogenese, te dupliceren. Het kleine bedrijfsrisico van “illegitimate recombination” is daarbij kennelijk voor lief genomen. Op populatieniveau merk je van het kleine verlies aan mannelijke fertiliteit niets, er zijn tenslotte ruim voldoende mannen om de bevolking in stand te houden.

12.12.3 Mutaties op gen niveau

Naast de hersenen, waar voor het complexe functioneren vele genen nodig zijn, wordt de testis altijd genoemd als een orgaan waarvoor dat ook geldt. Van 2274 genen, iets meer dan 10% van het totaal aantal eiwit-coderende genen, is een verhoogde expressie in dit orgaan vastgesteld (2020). Hiervan zijn er grofweg 500 als echt testis specifieke genen aangemerkt (H12.5.2). De zogenaamde “target”, het deel van het genoom waarin mutaties-met-gevolgen kunnen optreden, is dus voor de testis, evenals voor de hersenen, opvallend groot.

De zoektocht naar de mannelijke fertiliteitsgenen is, gestimuleerd door knockout muizenmodellen met aantrekkelijke fenotypen, al enige tijd geleden begonnen. Wanneer je een uit dergelijk onderzoek verkregen lijst van kandidaatgenen samenstelt en daarmee een weinig scherp gedefinieerde patiëntenpopulatie op mutaties in deze genen screent, bleek deze benadering maar zeer beperkt succesvol. In 2017 werd vanuit het Radboudumc verslag gedaan van een dergelijke zoektocht. Bij 1112 zonder aanwijsbare oorzaak azoosperme of ernstig oligosperme mannen werd in 101 vanuit het muizenonderzoek bekende genen naar de genetische oorzaak van de infertiliteit gezocht. Dat leverde slechts een opbrengst van 1-1,5% aan genetische diagnoses op.

Een meer efficiënte manier om te zoeken naar fertiliteitsmutaties is te kijken naar een uniform optredende afwijking van de morfologie van de humane zaadcel, bijvoorbeeld een ontbrekend acrosom (een globospermie) of een afwijking aan de staart (tabel 6, fig 36). Daarna ga je bij de

muis te rade of er genetische modellen bestaan voor dit fenotype. Dit literatuurzoekonderzoek kan kandidaatgenen opleveren, waarop de patiënt verder onderzocht kan worden. Deze aanpak werkt en momenteel kun je op deze manier in ongeveer 50% van de patiënten een gendiagnose stellen (tabel 6). Het fenotype kan uitgebreid worden tot een kenmerkend histologisch beeld, bijvoorbeeld voor meiotische cellen die in de val van een checkpoint lopen (H15.5.3). In Rotterdam bij Willy Baarends op de afdeling ontwikkelingsbiologie van het Erasmus MC hebben ze deze benadering in een serie van 33 niet obstructieve azoosperme mannen toegepast. Ze screenen op mutaties in 175 genen die bij mens en muis voorkomen en bij de muis in homozygoot gemuteerde toestand tot dit histologische fenotype leiden. Dat leverde twee “hits” op, allebei voor een gen dat actief is in de meiose en dan ook de vrouwelijke kiembaan treft. Uit wereldwijde samenwerking zijn nu meer van dergelijke genmutaties gevonden. Betrokken onderzoekers hebben zich verenigd onder de naam “International male infertility genomics consortium” (web adres <http://infertilegenome.org>). Dit illustreert het belang dat wordt gehecht aan kennis omtrent de oorzaak van de verstoorde spermatogenese bij de man. Voor een idee van de huidige stand van het inzicht naar de genetische achtergronden van mannelijke infertiliteit, verwijs ik naar tabel 6.

Momenteel wordt bij het zoeken naar de rol van mutaties bij een afwijkend fenotype veel voortgang geboekt met hulp van een techniek die wordt aangeduid met de naam “trio sequencing” (H3.2, H11.3, H18.1). De aanname hierbij is dat de causale mutatie in de kiembaan van een der ouders, of anders in het prille begin van de embryonale ontwikkeling, is ontstaan en dat deze **dominant** vererft. De bij de patiënt gevonden mutatie komt dus niet in DNA uit somatische weefsels bij de ouders voor en moet een gen getroffen hebben dat celbiologisch past bij het ziektebeeld. Deze aanpak is in de afgelopen 10 jaar in Nijmegen op de afdeling genetica van het Radboudumc sterk op de kaart gezet en is nu ook voor onderzoek aan mannelijke infertiliteit beproefd. De eerste vindingen wijzen op de betrokkenheid van genen die (kunnen) functioneren bij de spermatogenese. De hiervoor benodigde bewijsvoering verloopt echter veel moeizamer dan bij een vergelijkbare aanpak die gericht is op de hersenen. Waarom is dit het geval? Het blijkt dat de fertiliteitsgenen (meestal het paternale gen) die zo in beeld kwamen een “missense” mutatie (box 1) slecht kunnen verdragen: ze waren vaak gevoelig voor **haplo-insufficiëntie**. Maar met het concept dat in de kwantitatieve genetica wordt gebruikt (H6) kun je de genetische basis van infertiliteit ook verklaren. In dit model wordt de sub- en infertiliteit veroorzaakt door het in de patiënt samenkomen van een aantal minder gunstige allelen voor de spermaproductie. Een dergelijk beeld past ook het in het algehele plaatje van de olopende “mutational load” en daarover meer in hoofdstuk 18.1.

12.13 Oudere vaders

Wanneer over het effect van de leeftijd op de kans op voortplanting wordt geschreven, gaat het meestal niet over de man. Je kunt nu plagend (maar wel naar waarheid) opmerken dat dat komt omdat de meeste onderzoekers op dit gebied nog steeds man zijn. Een andere reden kan zijn dat wanneer je wetenschappelijk wat dieper wilt graven, zaadcellen tot nu toe geen gemakkelijk onderzoeksobject zijn (dit hoofdstuk).

Natuurlijk is ook bij mannen de zaadcelproductie en de kwaliteit van het product eindig. Het moment waarop dat tot fertiliteitsproblemen leidt komt sneller naderbij naarmate de uitgangssituatie slechter is. In de literatuur valt te lezen dat de productie tussen een leeftijd van 20-30 jaar en 60-70 jaar met tweederde terugloopt. Een OAT man (tabel 5) die in de kliniek wordt opgespoord kan best eerder in zijn leven normaal vruchtbaar zijn geweest. Getallen over de afnemende vruchtbaarheid zijn vaak van epidemiologische aard. De leeftijd van de vrouw en de man zijn meestal gekoppeld. Zijn mannen niet gemiddeld drie jaar ouder (?) en wat is de spreiding? De invloeden van mannelijke en vrouwelijke veroudering zijn dus verstrengeld. Dat en andere factoren die de statistiek belasten, zijn mogelijke oorzaken van de relatieve schaarste aan overzichtsartikelen op dit gebied. Data vanuit de USA die met statistische zorgvuldigheid zijn gecomponeerd, geven voor mannen die jonger dan 25 jaar zijn aan, dat een kleine 80% van hen hun partner binnen de 6 maanden zwanger maakt. Het vergelijkbare (dus gecorrigeerde) getal voor mannen die ouder zijn dan 45 is 53%. Ook spontane abortussen kunnen vaker statistisch aan de vader worden gekoppeld wanneer deze ouder is.

Natuurlijk is er heel wat naar de zaadcellen van oudere mannen gekeken. Een minder volumineus ejaculaat maakt niet meteen een lagere concentratie aan zaadcellen. Wel een lagere beweeglijkheid en ook minder zaadcelkoppen die aan de hoge morfologische eisen voldoen die er vanuit de kliniek aan worden gesteld, maar stelt de natuur even hoge eisen?

Levert een hogere leeftijd van de vader een verhoogde kans op een genetische afwijking op? Een bepaald inzicht hierin is al tamelijk oud. Lionel Penrose, die al bij het effect van de maternale leeftijd op de kans op een kind met Down syndroom ter sprake kwam (H11.4.1), publiceerde in De Lancet in 1955 ook dat hij een paternaal leeftijdseffect waarnam bij het spontaan verschijnen van een grote achterstand in de lengtegroei (achondroplasie). De oorzaak hiervan is een dominante mutatie in het gen FGFR3 (fibroblast growth factor receptor type 3). Toevalligerwijze komt dit gen tot expressie in de stamcel spermatogonia en nog toevalliger verschaft deze mutatie een delingsvoordeel. Het gevolg is dat klonen van sneller delende cellen in de tijd een grotere

bijdrage leveren aan de zaadcelpopulatie, waardoor in het nageslacht van vaders met ergens de FGFR3 mutatie in hun stamcellen er in de tijd een steeds grotere kans is op het verschijnen van dit fenotype. Gelukkig gebeurt dit niet vaak, het risico op achondroplasie is 1/15.000 geboorten. Dat stijgt tot 1/1250 wanneer de vader tussen de 50 en 54 jaar oud is.

Behalve van Penrose was er nog een publicatie in de jaren 50 die een relatie legde tussen ziekte bij het nageslacht en de leeftijd van de vader. In 1958 publiceerde Johanson in een klein cohort de verdenking van betrokkenheid van de oudere vader bij het ontstaan van schizofrenie in het nageslacht. Nu gaan, met inbegrip van bipolariteit en autisme, grote stukken van de reviews over de genetica van dit soort aandoeningen hierover. Met het huidige inzicht zijn ze genetisch allemaal aan elkaar verwant. Bij schizofrenie is het relatieve risico voor vaders ouder dan 55 ongeveer 6 (vergeleken met vaders van rond de 25). In een groot Nederlands onderzoek uit 2011, geleid door oud Wageningen student Roel Ophoff, komt autisme er uit als het grootste leeftijd gerelateerde risico, gevolgd door schizofrenie. De grote vraag van dit moment is wat daar achter kan zitten. Is het allemaal *de novo* mutagenese op het niveau van het gen? We weten nu dat nieuwe mutaties op het niveau van de base voor het grootste gedeelte in de mannelijke kiembaan ontstaan (tabel 3) en in ongeveer 20 jaar verdubbelt het mannelijke aandeel (tabel 3). De theoretische verklaringen hierachter zijn aan het slot van hoofdstuk 12.3 al genoemd (zie ook tabel 3). Van de rond de 45 basenpaar mutaties die op de leeftijd van 30 jaar per generatie van de vader aan de volgende generatie worden doorgegeven, zitten er ten hoogste een paar in een exon, onvoldoende om zelfs in het geval van een verdubbeling de vergrote kans op schizofrenie mee te verklaren. Of kan er ook nog een epigenetisch aspect aan zitten omdat bijvoorbeeld bij een dalende zaadcelkwaliteit het DNA minder goed wordt ingepakt en van instructies wordt voorzien (H15)? Heel erg degelijk is hier bij mijn weten nog nooit naar gekeken, maar natuurlijk wel bij de rat met de te voorspellen uitkomst: op oudere leeftijd neemt het aandeel nucleosomaal DNA (H12.6) toe. Zonder twijfel zal toekomstig moleculair genetisch en chromatine gericht onderzoek hier een beter licht op laten schijnen.

Het totale beeld van een toename van de nog steeds relatief kleine risico's wordt compleet wanneer er ook naar kinderanker wordt gekeken. Bij vaders ouder dan 36 jaar neemt het risico voor hun kind met een factor 1,63 toe vergeleken met vaders jonger dan 25.

Tenslotte is er nog een bonus: omdat er bij het grotere aantal chromosoomverdubbelingen van de stamcel spermatogonia **telomerase** aanwezig is, zijn de telomeren (H2.3.3) van de chromosomen die door de oudere vader worden doorgegeven langer dan die van een jongere

vader. Of de nakomelingen daardoor ook ouder worden is weer een andere discussie. De paternale telomeren zijn bij de bevruchting sowieso langer dan die van de maternale chromosomen (H13.6).

Bevruchting en klievingsdelingen

13.1 Inleiding

Bij de ovulatie bevindt de eicel zich in de metafase van de 2^e **meiotische** deling. De **spoelfiguur** ligt verscholen onder de celmembraan in de buurt van het eerste poollichaampje (fig 39). Over hoe de zaadcellen na de paring, geslachtsgemeenschap, samenleving, coitus of (kunstmatige) inseminatie in het oviduct belanden zijn vele pagina's volgeschreven, al dan niet voorafgegaan door degelijk onderzoek. Veel van dat onderzoek is al oud, en een deel ervan kan de tand des tijds heel goed doorstaan.

De bevruchting vindt plaats in het ampullaire gedeelte van het oviduct, aan de kant van het ovarium. De zaadcellen komen natuurlijk van de andere kant, door het isthmusgedeelte van het oviduct (fig 39). Als alles goed is gegaan zijn ze op het moment van ovulatie aanwezig, maar wel in kleine aantallen. De bevruchting verloopt vervolgens als een fascinerende trits van bijzondere gebeurtenissen. Het begint met de vereniging van de **gameten** door celfusie waardoor de **zygote** ontstaat (fig 42). Aan het eind van de celcyclus van de zygote liggen de **chromosomen** van vrouw en man in de metafase van de eerste klievingsdeling (fig 42). Daarna komen de twee sets chromosomen samen in de kernen van het 2-cellige **embryo** (fig 43). De dynamiek in het gedrag van de chromosomen en met name de veranderingen in het **chromatine** zijn vooral aan de mannelijke kant enorm. Hier volgt een beknopt verslag van onze huidige inzichten in het hele proces.

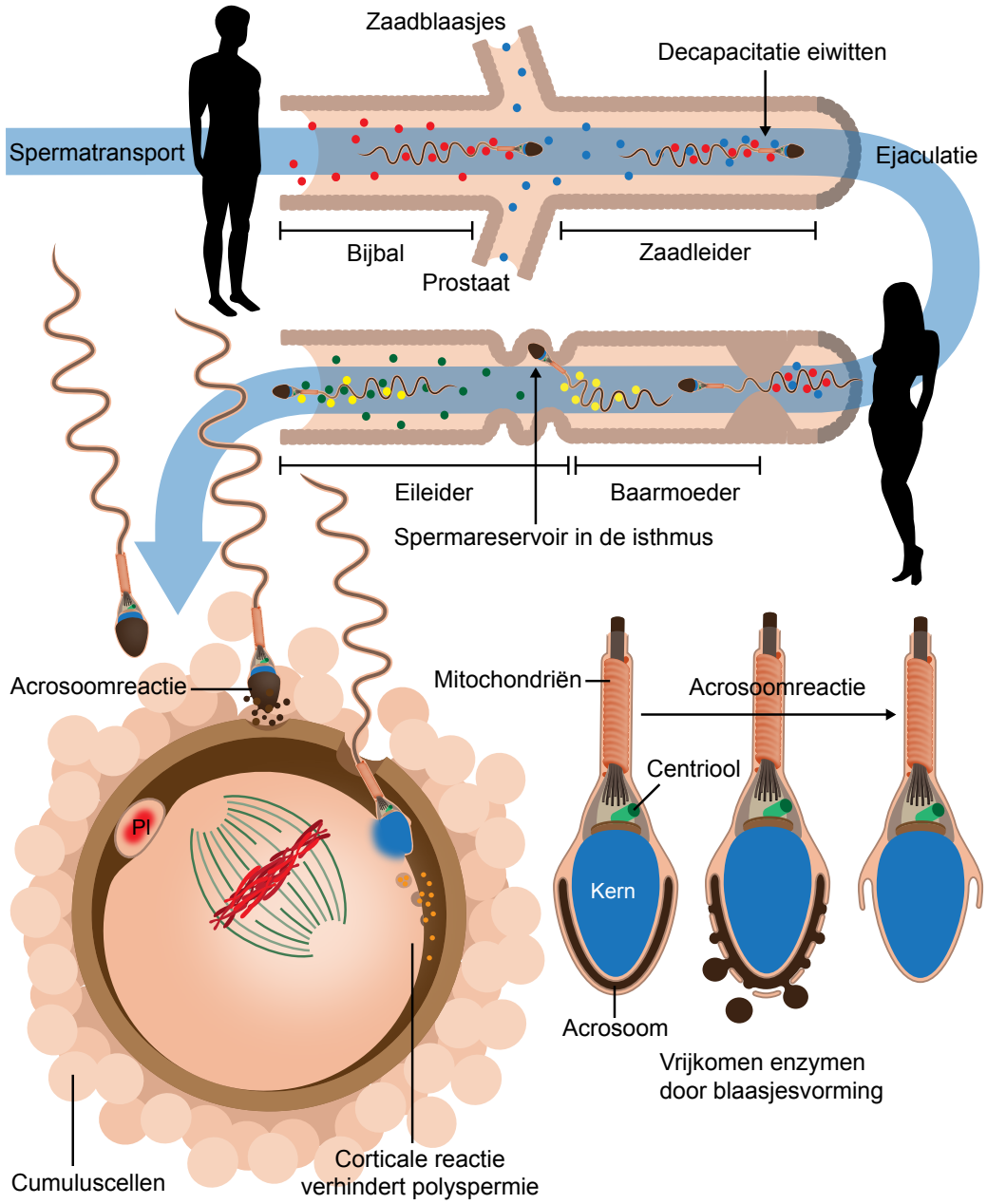


FIG 39

Overzicht van het spermatransport van ejaculatie tot de fusie van de **gameten** in het ampullaire gedeelte van de eileider, dat het begin ervan vormt. Hoe langer zaadcellen in het vrouwelijk geslachtsapparaat het bevruchtend vermogen behouden, hoe groter de kans op zwangerschap per cyclus is. Het voornaamste middel daartoe is het uitstellen van de **capacitatie** in het spermareservoir waarvan het bestaan bij de mens hier wordt aangenomen. De rode bolletjes, eiwitten die uitgescheiden worden door de wand van de buis in de bijbal, dragen bij aan de rijping van de zaadcellen. De blauwe bolletjes stellen eiwitten voor die bij ejaculatie met de secreten van de prostaat en de zaadblaasjes meekomen en werken als capacitatieremmers (de decapacitatie eiwitten). Deze raken bij passage door de baarmoedermond, de cervix, verloren en worden vervangen door de capacitatieregulerende eiwitten van het vrouwelijk geslachtsapparaat (de gele bolletjes). Tenslotte komen er vanuit het **epitheel** van de eileider bij de isthmus, wanneer de ovulatie naderbij komt, eiwitten vrij die de capacitatie stimuleren (de groene bolletjes). Wanneer de ovulatie nog niet aanstaande is dragen eiwitten in het isthmus gedeelte van het oviduct bij aan het uitstellen van de capacitatie.

Cumuluscel expansie vergroot de trefkans in de ampulla (zie ook fig 28, 29). Ook de **acrosoomreactie** wordt in deze figuur weergegeven. Bij deze reactie fuseert de wand van het **acrosoom** met de celwand waardoor de inhoud ervan vrij komt. Bij de mens neemt de zaadcel het centriool (fig 3) mee, hier in groen en blauw weergegeven. Recent is er nog een tweede centriool ontdekt, verstopt in het begin van de staart, waarvan de functie nog niet opgehelderd lijkt. Na de membraanfusie tussen de “corticale granules” en de wand van de eicel komt de inhoud vrij waardoor de **zona pellucida** (licht bruin) zo verandert dat de kans op polyspermie sterk vermindert. Deze corticale reactie begint bij de plaats van de celfusie. De ruimte tussen de zona en de wand van de eicel staat bekend als de perivitelline ruimte. PI, eerste poollichaampje dat snel in regressie gaat (zie ook fig 13). Tot aan de activatie van de eicel is ze in de metafase van de 2^e meiotische deling.

13.2 Sperma transport

Toen ik me zo eind 60-er jaren begon in te lezen was het al een vaststaand feit dat het transport van het sperma vanaf de cervix (de baarmoedermond) naar het begin van de eileider voornamelijk tot stand komt door de werking van baarmoeder. Bij het varken kan dat al een kwartier na de inseminatie voor elkaar zijn, en de varkensbaarmoeder is lang! Bij een konijn wordt de afstand naar de eileider in ongeveer 5 minuten overbrugd. Ook bij de laboratoriumknaagdieren gaat het snel. In zijn recente overzicht getiteld "Copulatory and Postcopulatory Sexual Selection in Primates", vermeldt Alan Dixon dat bij het voluit gaan van de humane zaadcellen, met een topsnelheid van 7 inch (ongeveer 18 cm) per uur, ze er op eigen kracht toch op zijn minst 45 minuten voor nodig zouden hebben om het begin van de eileider te bereiken. Met hulp van baarmoedercontracties zal het bij de mens echter, net als bij de andere zoogdieren veel sneller gaan, binnen enkele minuten volgens de literatuur. Het kleine volume van de baarmoederholte (100 μ l) zal daarbij helpen. Bij landbouwhuisdieren is veel bekend over de vorming van het depot aan zaadcellen dat de eileider in de richting van de ampulla gaat bevoorraden: rond de miljoen zaadcellen op de overgang van de baarmoeder naar de eileider bij het varken en bij het rund in de plooiën van de wand aan het begin van de eileider (in het isthmus gedeelte, fig 39). Hierna zal blijken dat er ook bij de mens sterke aanwijzingen zijn voor het bestaan van zo'n reservoir.

13.3 Sperma heterogeniteit

De populatie zaadcellen in een ejaculaat is in principe heterogeen. Dit geldt in het bijzonder voor de mens (H12.9.1). Dan is er ook heterogeniteit in de kans op bevruchting. Halverwege de zeventiger jaren rapporteerde de groep van J Cohen uit Birmingham over een proef met konijnen, waarmee hij op dit verschijnsel attendeerde. Een kleine hoeveelheid sperma dat het oviduct had bereikt werd geogst en gemengd met een overmaat vers sperma, waarna er KI werd toegepast. Het sperma dat het oviduct al had "gezien" was van een konijngrijze ram en de overmaat van een witte albino ram. Ook de voedster was albino. Tot hun verbazing was het sperma dat aan een tweede reis begon veel effectiever. Het percentage konijngrijze nakomelingen was namelijk aanzienlijk hoger dan verwacht op grond van de fractie "konijngrijze zaadcellen" in het voor KI gebruikte mengsperma.

De mate waarin heterogeniteit van sperma tot uiting komt wordt sterk bepaald door het vrouwelijk geslachtsapparaat, dat je kunt opvatten als een sorteermachine. Toen we in de jaren 70

in Wageningen een muis met een chromosoomafwijking ontdekten, die weinig en slecht sperma produceerde, konden we dit fenomeen als een van de eersten bestuderen. Na dekking was de worpgrootte van deze muizen lager, maar helemaal steriel waren ze zelden. Bij de zaadcellen van normale muizen vind je weinig variatie in kop en staart, maar bij de mannetjes met de chromosoomafwijking was de morfologische heterogeniteit aanzienlijk (vergelijk met fig 37). Spoelden we de zaadcellen na de paring uit de eileider van het vrouwtje, dan was de variatie een stuk minder dan in de baarmoeder of in het mannelijk geslachtsapparaat zelf. De beweeglijkheid was ook beter. Zoals meestal bij wetenschappelijk onderzoek leverden deze observaties gelijk ook weer vragen op. Wordt er tijdens de overgang van de baarmoeder naar het oviduct soms tegen afwijkingen van de kop geselecteerd? Is er sprake van competitie op basis van de beweeglijkheid of is het verschijnsel een combinatie van beide?

13.4 Gameten en het "fertile window"

Al jaren is bij laboratorium- en landbouwhuisdieren bekend dat het reproductief erg onhandig is om de eicel te laten wachten op de zaadcel. In m'n studietijd was ik erg onder de indruk van het werk van RHF Hunter. Deze onderzoeker werkte op de ARC "reproductive physiology unit", Huntington Road in Cambridge, een plaats waar op het gebied van onderzoek naar de voortplanting alles jaren eerder gebeurde.

Bij zijn onderzoek aan gelten (H11.5) induceerde hij de ovulatie met HCG (H11.3). Omdat de bronst (de periode waarin vrouwelijk dier het mannelijke tot de paring toelaat) bij varkens relatief lang duurt en je aan het begin ervan spuit, ben je de LH piek voor (het ovulatie inducerende hormoon van het varken zelf, fig 29). De eicellen komen dan na ongeveer 40 uur vrij uit de Graafse follikels (fig 29). Ongeveer 6 uur na de inseminatie heeft zich op de overgang van de baarmoeder naar het oviduct een reservoir van bij benadering een miljoen zaadcellen gevormd. Dit reservoir blijft daar 24 uur zitten. Ronald Hunter bestudeerde het effect van het tijdstip van insemineren t.o.v. het tijdstip van ovuleren. Bij inseminaties tussen de 6 en 10 uur na de ovulatie zag hij dat het percentage bevruchte eicellen begon af te nemen, van 95 naar 70%. De fractie bevruchte eicellen dat zich tijdens de klievingsdelingen (fig 43) niet normaal gedroeg begon ook toe te nemen, van een paar tot wel 25%. Zo'n 8 uur na de ovulatie neemt het vermogen van de eicel om na bevruchting aan een normale ontwikkeling te beginnen al af.

Ook bij de mens staat de reproductie er veel beter voor wanneer zaadcellen op het moment van de eisprong in de buurt van de ingang van het oviduct aanwezig zijn. Er zijn een paar grote studies van rond de eeuwwisseling die dit duidelijk aantonen. Voor een vrouw zijn er twee manieren om het moment van ovulatie bij benadering vast te stellen: via het bepalen van een temperatuurcurve of via het meten van de afvalproducten van **oestrogenen** en progesteron in de urine. De door de follikel geproduceerde oestrogenen zijn op hun top op het moment van de LH piek. Daarna begint de follikel ook met de productie van progesteron, die na de ovulatie door het gele lichaampje wordt overgenomen (fig 28). De ovulatie valt rond de 36 uur na de LH piek en dit moment kan geschat worden uit de verhouding van de **metaboliëten** van oestrogenen en progesteron in de urine (fig 29). Met behulp van deze methode is vastgesteld dat er binnen de cyclus een ruime marge is in het moment van ovulatie en daardoor in de kans op zwangerschap (fig 40). De temperatuurmethode, die iets minder nauwkeurig is maar ook gebruikt kan worden om het moment van ovulatie te schatten berust op het feit dat rond de LH piek de basale lichaamstemperatuur wat lager is. Daarna stijgt ze tot een plateau dat 2-3 dagen na de ovulatie wordt bereikt. De ovulatie vindt dan ongeveer halverwege de stijging tot het plateau plaats.

In 2002 publiceerden onderzoekers uit Padua in samenwerking met een begaafde biostatisticus uit Reseach Triangle Park, North Carolina USA de resultaten van een groot onderzoek naar de relatie tussen ovulatie en conceptie. Er deden 782 voor zover bekend gezonde echtparen aan mee, die alleen natuurlijke methoden gebruikten om hun vruchtbaarheid te reguleren. Soms ontstaat er dan toch een zwangerschap maar daar ging dit onderzoek niet over.

Het moment van ovulatie werd geschat met behulp van de temperatuurmethode en men moest natuurlijk opgeven op welke dag men geslachtsgemeenschap had gehad. De resultaten waren uitzonderlijk consistent (fig 41). De vruchtbaarheid stijgt vanaf 5 dagen voor de ovulatie en piekt 2 dagen ervoor. Daarna en ook op de dag van de ovulatie neemt de kans op zwangerschap sterk af. Het effect van het verouderen van de eicel is in figuur 41 duidelijk zichtbaar. Het "fertile window" (fig 40) wordt door twee variabelen bepaald. Ten eerste de kans op ovulatie en ten tweede de maximale overlevingsduur van de zaadcellen aan het begin van de eileider (de meest waarschijnlijke locatie voor overleven). Voor die maximale overlevingsduur zal er als de uitkomst van een interactie tussen man en vrouw ook weer variatie optreden.

De vruchtbaarheid is maximaal bij vrouwen tussen de 19 en 26 jaar. Bij vrouwen van 35 jaar en ouder is de vruchtbaarheid zo ongeveer gehalveerd. Als je de vruchtbaarheid ziet als een para-

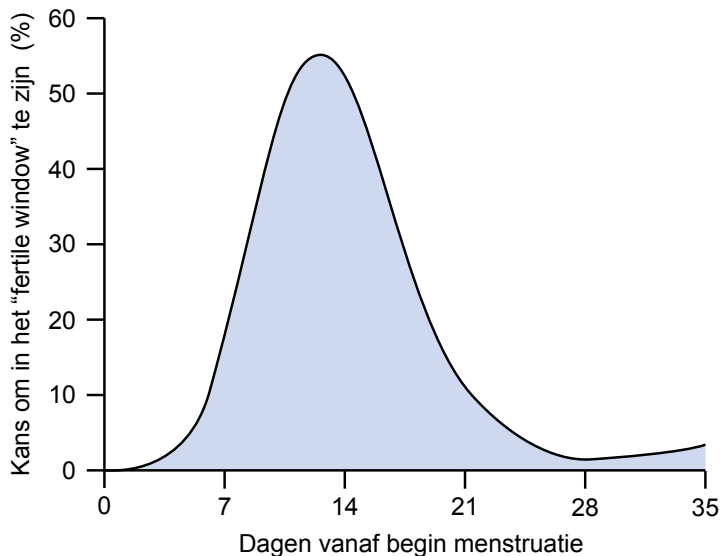


FIG 40

Voor het maken van deze grafiek is de ratio tussen **metabolieten** van oestrogenen en progesteron in ochtendurine gebruikt voor het voorspellen van de LH piek. De ovulatie vindt ongeveer 36 uur erna plaats (aan het eind van de folliculaire fase van de cyclus). Op basis hiervan kan de kans bepaald worden dat de vrouw zich in het vruchtbare gedeelte van de cyclus, het zogenaamde "fertile window" van ongeveer 6 dagen bevindt, de 5 dagen voor de ovulatie en de dag van de ovulatie zelf (de Y as). In de periode voorafgaand aan de ovulatie zijn zaadcellen in staat om te overleven in het vrouwelijk geslachtsapparaat (fig 39, 41).

meter voor een koppel, dan weten we dat op oudere leeftijd een groter leeftijdsverschil met de man (wanneer die bijvoorbeeld 5 jaar of meer ouder is) de prognose negatief beïnvloedt.

In alle situaties is het van voordeel wanneer de zaadcellen rond de 2 dagen voorafgaand aan de ovulatie aanwezig zijn. Een eicel zal daarbij natuurlijk geen onderscheid maken tussen zaadcellen ingebracht d.m.v. gemeenschap of intra uterine inseminatie (IUI), een

vruchtbaarheidsbehandeling. Zou een te kort interval tussen inseminatie en ovulatie mogelijk hebben bijgedragen aan het geringe succes (rond de 10% per cyclus) van IUI over de jaren?

13.5 De bevruchting

Zaadcellen zijn wanneer ze in het spermareservoir in het isthmus gedeelte van het oviduct belanden nog niet tot bevruchten in staat, ze moeten eerst **capaciteren** (fig 39). Bij definitie wordt hieronder verstaan dat de zaadcellen nu in staat zijn tot de **acrosoomreactie** (fig 39). Deze reactie treedt normaal op wanneer de zaadcel contact maakt met de **zona pellucida** en is nodig voor de bevruchting (fig 39, 42).

Gecapaciteerde zaadcellen hebben ook een andere staartbeweging, met een grotere en snellere uitslag. Daardoor zie je, wanneer je er bij de muis door de microscoop naar kijkt, de staart in de vorm van het cijfer 8 verschijnen. Deze op gang gebrachte hyperactiviteit verhoogt de kracht van de voortbeweging en ook de zwemsnelheid. Eenmaal gecapaciteerd is er voor de zaadcel geen weg terug en is z'n levensduur beperkt. De capacitatie met hyperactiviteit is nodig om de eicel, omgeven door een laag nu in los verband levende cumuluscellen, te bereiken en eraan te hechten (fig 39). De transitie van granulosa- naar cumuluscellen begint al in de tertiaire follikel (fig 28). De eicel speelt hierbij een actieve rol.

Tussen de cumuluscellen wordt een matrix opgetuigd van eiwitten verrijkt met suikermoleculen, die voor de zaadcellen te penetreren is (fig 39, 42). Het vergroot a.h.w. het doelwit voor de zaadcel. De penetratie van deze laag cellen is op te vatten als een soort van op twee na laatste hindernis test. Het overwinnen van de zona pellucida is de op een na laatste. De gebeurt onder een flauwe hoek en uit de vervormingen die hierbij zichtbaar optreden leiden onderzoekers af dat de zaadcel wel degelijk kracht aanwendt om met de kop onder de zona uit te komen (fig 39, 42). Daar komt de celmembraan van de zaadcel tegen de celmembraan van de eicel aan te liggen, waarna ze kunnen fuseren (fig 42). Rond 1970 waren er al elektronenmicroscopische plaatjes van dit proces. De fusie van de gameten vindt plaats in het ampullaire gedeelte van de eileider (legenda fig 39). Dit is de eerste stap in het bevruchtingsproces, dat pas voltooid is wanneer na de eerste klievingsdeling de maternale en paternale chromosomen in de kernen van het 2-cellige embryo verenigd zijn (fig 42, 43).

Spelen de eiwitten die met het ejaculaat meekwamen dan nog een rol? Men denkt van wel omdat er eiwitten in zitten die de capacitatie bemoeilijken. Want wanneer dat gebeurt is de

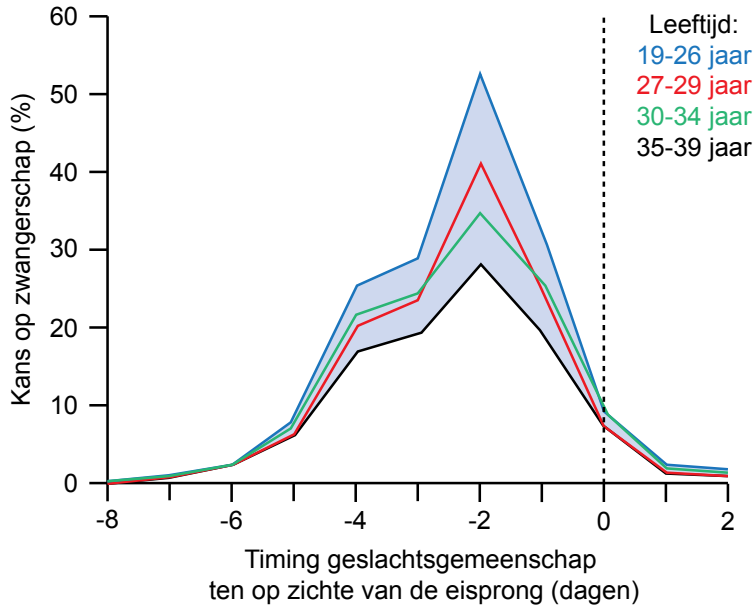


FIG 41

De relatie tussen geslachtsgemeenschap, ovulatie en vruchtbaarheid. De leeftijd is die van de vrouw.

eindfase van het leven van de zaadcel bereikt. Ook het vrouwelijk geslachtsapparaat is er in eerste instantie op ingericht de capaciteit te reguleren (fig 39) en meestal te vertragen. Er zijn echter nog geen samenhangende inzichten over de vraag of dit tijdens de “wachtfase” van de zaadcellen een echt selectieve barrière vormt en hoe dit dan werkt. Maar wanneer de ovulatie aanstaande is verdwijnen de vrouwelijke remmers van de capaciteit en worden de zaadcellen gestimuleerd (fig 39). De bewegelijkheid wordt vergroot en de zoektocht naar de eicel begint. In 2009 publiceerde een groep van Duitse onderzoekers een completer beeld van de ontmoeting van de gameten. Hiervoor bestudeerden ze het oviduct van de koe *in vitro* en konden het proces filmen in een opengesneden eileider. Alle stappen van de bevruchting, inclusief het slaan van de trilharen op de **epitheel**cellen van de wand van de eileider, konden zo duidelijk worden gevolgd. De trilharen helpen bij het verplaatsen van de eicel(len) met cumuluscellen naar uiteindelijk de isthmus wanneer de bevruchting uitblijft (fig 39). Ook de zaadcellen maken naast hun eigen

Spermakop met acrosoomreactie (frontale doorsnede)

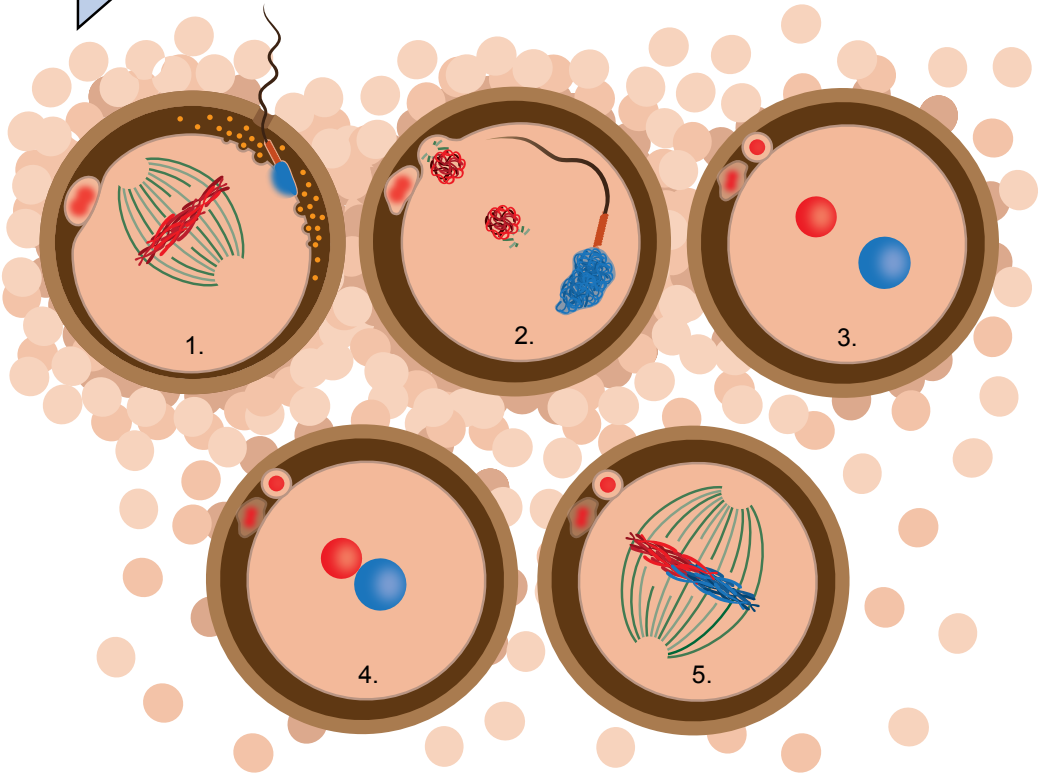
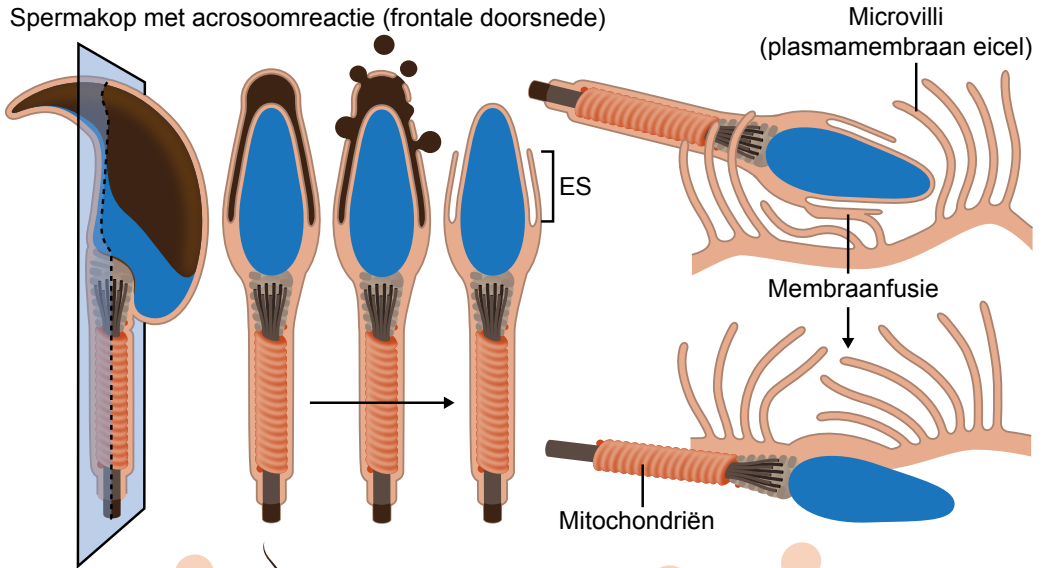


FIG 42

Volgorde van de ontwikkelingen in het maternale en paternale **chromatine** bij de bevruchting in de muis. In principe verlopen de gebeurtenissen in de **zygote** bij de mens op identieke wijze maar langzamer (zie de tekst van H13.5.2; zoogdieren verschillen in deelaspecten maar niet in de principes). In stadium 1 wordt de eicel geactiveerd en loopt de 2^e **meiotische** deling af. In stadium twee, 30 minuten na binnenkomst van de kern van de zaadcel, is de verandering van een protamine structuur (fig 32) naar een **nucleosomale** structuur in volle gang. Drie tot maximaal 4 uur na binnenkomst is het maternale en paternale chromatine verpakt in de pronucleï (3). In stadium 4 liggen de pronucleï tegen elkaar aan en vindt de **DNA replicatie** plaats. Stadium 5 illustreert de metafase van de eerste (**mitotische**) klievingsdeling waarbij de maternale en paternale **chromosomen** (nog) niet door elkaar heen liggen. Het panel rechtsboven laat in een vergroting de membraanfusie tussen zaadcel en eicel zien. De fusie, waarvan steeds meer moleculaire details ontrafeld worden, wordt geïnitieerd vanuit het zogenaamde equatoriale segment (ES) van de wand van de zaadcel. Bij de mens is het aanleveren van het centriool (fig 3) toebedeeld aan de zaadcel (fig 39). Ook de weinige mitochondriën van de zaadcel en de staart gaan mee naar binnen. Daarom is bij mens ICSI het mee-injecteren van de staart noodzakelijk. Bovenin wordt de **acrosoomreactie** nog een keer (zie ook fig 39) zichtbaar gemaakt in de bijzondere spermakop van de muis. De spiraal verbeeldt de mitochondriën (H14) in het zogenaamd “midpiece” van de zaadcel.

bewegelijkheid ook gebruik van de peristaltiek van de spiercellen in de wand van het oviduct. Hoe een eileider transport in twee tegengestelde richtingen kan stimuleren om de ontmoeting tussen de gameten mogelijk te maken, was al eind 60-er jaren een van de grote raadsels in de reproductiebiologie.

In de Duitse *in vitro* studie werd waargenomen dat hyperactivatie en dus capacitatie afhankelijk was van de aanwezigheid van het eicel- cumuluscel complex: door de vergrote bewegingskracht kwamen de zaadcellen los van de crypten in de wand van het oviduct. Samenvattend kun je zeggen dat de aanwijzingen dat de cyclus en in dit geval ovulatie, het lot van de mannelijke gameet sterk beïnvloedt, zich opstapelen. Hoe intrigerend dit onderzoek ook is, het blijft zich op

een relatief bescheiden niveau afspelen met een groeiende rol voor ook moleculaire observaties bij landbouwhuisdieren.

Waarom zou het voor bevruchting van voordeel zijn om zaadcellen twee dagen in de wacht te zetten (fig 41)? Dit kan helpen in de zaadselectie zou je denken, maar een ander reden speelt mogelijk ook een rol. Wanneer zoals bij de mens **oestrisch** gedrag evolutionair zou kunnen verdwijnen en de ovulatie “verborgen” is, zijn mannen wiens sperma langer in het vrouwelijk geslachtsapparaat overleeft, in het voordeel. Dit kan een reproductiekenmerk zijn waarop natuurlijke selectie aangrijpt. Aan de andere kant hebben vrouwen die zwanger willen worden natuurlijk baat bij een man met in haar lichaam langlevende zaadcellen. Dan is natuurlijke selectie op kenmerken van het vrouwelijk geslachtsapparaat die de overleving bevorderen ook mogelijk.

Al vele tientallen jaren wordt er geschreven over lokstoffen die het eicel cumulus complex (fig 29) zou afscheiden om de zaadcellen de weg te wijzen. Bekend is natuurlijk dat ten tijde van de bevruchting er maar weinig zaadcellen rond dit complex aanwezig zijn. De eicel mag maar door een enkele zaadcel bevrucht worden en daar draagt een hoge concentratie aan zaadcellen niet toe bij. Gelukkig zijn er mechanismen om **triploidie** ontstaan door de bevruchting met twee zaadcellen te vermijden. Selectie van een heel beperkt aantal zaadcellen door een chemische lokstof (een “attractant”) kan er daar eentje van zijn. Bij levensvormen die gebruik maken van bevruchting buiten het lichaam is chemotaxis, bewegen op basis van een lokstof heel bekend. Maar ook bij zoogdieren waarbij interne bevruchting plaatsvindt zijn er aanwijzingen voor. In de literatuur gaat ook bij de mens de aandacht uit naar reuk- en smaakreceptoren. Dit onderzoeksveld is nog steeds actief. Voor een inkijk in de stand van het onderzoek en de voorgestelde moleculair biologische mechanismen, zie de literatuurlijst.

13.5.1 Eicelactivatie en de zona reactie

Wat er in de eicel gebeurt wanneer de fusie tussen zaadcel en eicel voltooid is, mag wel tot de meest wonderbaarlijkste biologische verschijnselen worden gerekend. Het oorspronkelijke eicelprogramma loopt nog omdat de 2^e meiotische deling niet is afgemaakt (fig 39, 42). Deze deling vindt pas plaats wanneer de zaadcel de op slot staande celcyclus in de eicel heeft geactiveerd. Rond het eind van de 90-er jaren werd duidelijk dat de eicel hiervoor, op aangeven van de zaadcel, een aantal pieken (“spikes” in het jargon) van calcium ionen (Ca^{2+}) produceert. Deze pieken zijn in beeld gebracht en kunnen ook kunstmatig worden gemanipuleerd. In 2001

publiceerde Jean Pierre Ozil van het INRA Instituut te Jouy-en-Josas, zuidelijk van Parijs, intrigerende observaties aan konijnenembryo's die zich op geleide van toegediende Ca^{2+} spikes **parthenogenontisch** hadden ontwikkeld tot dag 11,5 van de draagtijd van ongeveer 30 dagen. De onderzoekers zagen dat het regime van toediening na transplantatie in een draagvoedster een effect had op de ontwikkeling van deze onbevlekt ontvangen embryo's.

Het heeft op dit thema, de embryologische implicaties van de eicelactivatie, nooit publicaties geregend, maar in 2017 rapporteerden de INRA onderzoekers een heel intrigerende vinding. De kernvraag is natuurlijk of gebeurtenissen, die in het allereerste begin van het zygote stadium plaats vinden, gedurende de rest van het leven nog een weerslag kunnen krijgen. In Jouy-en-Josas volgden ze het patroon van de Ca^{2+} spikes na ICSI (intracytoplasmatische sperma injectie) bij de muis, een technologisch hoogstandje. Rond 3 tot 4 uur na binnenkomst van de zaadcel, wanneer de pronucleï net zijn gevormd (fig 42), stoppen deze spikes. Voor het *in vitro* verblijf tot aan de embryotransplantatie in uiterlijk het 2-cellige stadium werden twee verschillende, in de onderzoekswereld geaccepteerde, kweekmedia gebruikt (H13.7). Deze variatie in kweekomstandigheden had een groot effect op het aantal spikes, maar niet op het aantal jonge muizen die na transplantatie werden geboren. Wel zagen de onderzoekers langetermijneffecten van de verschillende samenstellingen van het kweekmedium en de daarbij optredende spikes op het vetweefsel (significant bij vrouwtjes) en op de hersenontwikkeling (zie ook H16.6). Een opmerking, die je in de vele artikelen over de vroeg embryonale ontwikkeling bij herhaling tegenkomt, is dat de periode van zygote tot de innesteling tot de gevoeligste behoort, die er in de **kiembaan** te vinden is. De bevindingen in het muizenartikel uit 2017 bevestigden deze visie dus volledig.

Een andere vroege reactie van de eicel op de fusie met de zaadcel treedt op in haar celmembraan. Deze verandering leidt er onder andere toe dat opvolgende spermatozoa de zona pellucida niet meer kunnen doorboren. Onder de celwand gelegen kleine blaasjes, "cortical granules" geheten, fuseren met de celmembraan en legen hun inhoud in de ruimte tussen de membraan en zona (fig 39, 42) waardoor deze ondoordringbaar wordt. Dit proces werkt niet altijd perfect. Zo'n 1% van de niet verouderde eicellen van het varken worden door meer dan 1 (meestal 2) zaadcellen bevrucht. Ook in de IVF schaaltes gaat het wel eens fout, met rond de 3% aan disperme bevruchtingen en triploïdie als resultaat. In de spontane abortussen uit het materiaal van de Boués in Parijs (H3.4.2) kwamen toch nog behoorlijk wat triploïde spontane abortussen voor, die voor ongeveer twee derde van paternale oorsprong waren.

13.5.2 Chromatine veranderingen en DNA herstel

Simultaan met het afmaken van de 2^e meiotische deling wordt de kern van de zaadcel uitgepakt. Deze verliest bij dit proces zijn vorm. Bij de muis begint de zaadcelkern aanvankelijk te transformeren in een soort van vliegend tapijt (fig 42) om daarna weer samen te trekken. De protamine kerneiwitten (H12.6, fig 32) worden in hoog tempo van het **DNA** verwijderd. Lokaal blijven er nog kleine resten met een nucleosomale structuur over, omdat die bij het “remodelen” van het chromatine tijdens de spermiogenese zijn overgeslagen (H12.6, H15.2.4, fig 8, 32). Het tempo waarin de **nucleosomen** worden teruggevormd is eveneens spectaculair. Het hele proces start al wanneer de sperma kern begint te decondenseren en neemt bij de muis slechts een paar uur in beslag. Ook moeten zowel de paternale als de maternale chromosomen weer netjes omsloten worden door een kernmembraan (fig 42). Tot het moment van vorming van deze pronucleï is dan, zoals in de vorige paragraaf vermeld, nog maar een paar uur verstreken. Na 5 uur bij de muis en 8 uur bij de mens begint de DNA synthese in de cellulaire S-fase (fig 4) om het chromosomale DNA te kopiëren. Kort hierna (fig 4) lossen de kernmembranen op en kan de eerste mitotische deling beginnen. We zijn bij de muis dan rond de 17 uur verder en bij de mens is het na ongeveer 23 (+/- 1 uur) uur zover. Voor laatstgenoemde inschatting is kennis afkomstig van de IVF praktijk (mens) gebruikt. Voor de muis weten we dat de timing en de afloop van het hele bovenstaande proces *in vivo* en *in vitro* vrijwel identiek verloopt.

Zoals in hoofdstuk 9 al is vermeld gaat de grote ombouw van het paternale chromatine gepaard met het “resetten” van het chromatinegeheugen. De mooiste illustratie hiervan is het actieve verlies van cytosine methylering (fig 11, 23). DNA repair speelt hier een rol bij (BER, fig 33). Het vermogen van de eicel om DNA schade te repareren (H11.3) is na de ovulatie nog steeds aanwezig. In de beginjaren van de 21^e eeuw kregen we in Nijmegen de kans om beter naar de stabiliteit van DNA in de zygote van de muis te kijken. Uit een Nature Reviews Genetics publicatie uit 2000 van de bekende Amerikaanse geneticus James Crow, en eerdere rapportages uit 1988, hadden we al aanwijzingen voor een veel grotere bijdrage van de vader aan het optreden van structurele chromosoomafwijkingen bij de mens (tabel 4). Bij het Nijmeegse onderzoek kwam de signaleringsfunctie van gammaH2AX voor een dubbelstrengs DNA breuk prima van pas (H5.1, tabel 1). Voor de detectie van deze breuken pasten we **immunofluorescentie** toe. Verder hadden we de beschikking over muizenstammen die genetisch defect waren voor het herstel van dubbelstrengs DNA breuken, en konden we het hele proces van schade inductie tot schadeherstel in de tijd volgen met behulp van muis IVF. Om dubbelstrengs DNA breuken aan

te brengen gebruikten we routinetechnieken met bestralen van het sperma voorafgaand aan de IVF, het toepassen van lage doses van specifieke chemotherapeutica of andere stoffjes die het DNA beschadigen, en tenslotte het bestralen van de zygoten op speciale momenten, bijvoorbeeld aan het begin van de S-fase. We wisten hoeveel zygoten er na een behandeling deelden tot 2-cellige embryo's en ook hoeveel chromosoomafwijkingen er met behulp van de technieken uit de **cytogenetica** in de metafase van de eerste klievingsdeling te zien waren (H3.4, fig 3, 42).

Na de chromatineverandering in de kop van de zaadcel kort na de fusie met de eicel, zagen we tussen de 0 en 4 dubbelstrengs DNA breuken, ongeveer 18x meer dan worden gezien worden in een fibroblast, een bindweefselcel. Zaten deze breuken er al of zijn ze het gevolg van de chromatinerevolutie, die zojuist heeft plaatsgevonden? We denken het laatste. Vergeleken met fibroblasten zijn zaadcelkernen door hun compacte structuur wel tot 15 x zo ongevoelig voor de door ioniserende straling veroorzaakte dubbelstrengs DNA breuken. Je kunt zaadcellen dus echt bombarderen met straling, ze bevruchten nog steeds, maar hun ongevoeligheid verandert volkomen wanneer ze eenmaal in de eicel zitten, alhoewel juist daar weer DNA herstel is (fig 33). Al in 1974 rapporteerde Tony Searle en zijn collega's vanuit Harwell dat *de manier om bij de muis stammen te krijgen met reciproke translocaties* (fig 12), het kort voor de dekking bestralen van het mannelijke geslachtsapparaat is. Het onderwerp veerde een paar jaar daarna weer op toen Waldo Generoso van het National Laboratory in Oak Ridge Tennessee in 1979 ontdekte dat wanneer hij mannetjesmuizen belastte met **mutagene** stoffen en ze meteen daarna bij de vrouwtjes zette, het van het genotype (verschillende inteeltlijnen) van die vrouwtjes afhing hoeveel schade die stoffen hadden toegebracht. Zijn conclusie was dat eicellen van de ene inteeltlijn veel betere DNA reparateurs waren dan eicellen van een andere.

In Nijmegen konden we, doordat we eicellen hadden van moedermuizen met een reparatie defect voor dubbelstrengs DNA breuken (fig 33) zien hoe en wanneer tijdens het functioneren van de zygote deze systemen actief waren. Ruwweg zijn er twee mechanismen te onderscheiden. Het ene mechanisme, "non-homologous end joining" (NHEJ), is "quick and dirty" (fig 33). Het andere mechanisme werkt heel precies en is gebaseerd op het mechanisme van de **homologe recombinatie** (H 5.1 fig 14, HRR fig 33). Het NHEJ systeem pakt de dubbelstrengs breuken, die met de zaadcel mee komen aan. De eicel heeft na 3-4 uur ongeveer 80% van de breuken hersteld, maar is daarbij wel slordig. Ook is het NHEJ systeem in de eicel, vergeleken met bijvoorbeeld dat van witte bloedlichaampjes *in vitro*, niet heel ijverig. Er zijn breuken die, waarschijnlijk omdat ze te complex zijn, domweg niet worden gerepareerd. Het HRR systeem wordt naast het NHEJ systeem actief wanneer de DNA replicatie in de S-fase start (fig 33, 4).

Hoe we ook keken, steeds was de situatie in de mannelijke kern wat zorgelijker dan in de vrouwelijke kern, al kon de variatie tussen deze via superovulatie (H11.3, H16.3.2) verkregen eicellen best groot zijn. De ene eicel was duidelijk beter in staat om de “mannelijke problemen” het hoofd te bieden dan de andere. Dat het repareren van het DNA van de zaadcel (H12.9.4) belangrijk is in zowel de natuurlijke situatie als ook voor de praktijk van de IVF (H16.5), realiseerde men zich al in de vorige eeuw. Robert Edwards schreef er met een medewerker in 1996 een eerste overzichtsartikel over.

Altijd wanneer je met een nieuwe aanpak een grotendeels onontgonnen gebied betreedt ontdek je bijzondere dingen. Een van de stofjes die we gebruiken om het DNA van de zygote onder druk te zetten (4-Nitroquinoline 1-oxyde, 4NQO), bootste zo goed en kwaad als het ging het effect van ultraviolette (uv) straling na. Wanneer dit stofje werd toegepast op zygoten, ontstaan uit de moeders met een defect in HHR, regende het al bij hele lage concentraties reciproke translocaties (fig 12). Dit bevestigt het idee dat de zygote een bron is van nieuwe structurele chromosoomafwijkingen in de populatie (H16.5, tabel 4).

Momenteel staan de dubbelstrengs DNA breuken in de zygote weer volop in de aandacht van wetenschappers, vanwege de nieuwe mogelijkheden voor “gene editing” in de kiembaan met behulp van het CRISPR-Cas systeem. Het bij deze techniek gebruikte Cas enzym/gids-RNA complex veroorzaakt, op een gerichte locatie specifieke wijze, ook een dubbelstrengs DNA breuk (box 3). Het correcte herstel hiervan is natuurlijk essentieel voor het welslagen van de gewenste DNA verandering in het gen dat “geëdit” moet worden.

Terugkijkend lijkt het erop dat in de evolutie het repareren van dubbelstrengs DNA breuken in de zygote niet erg hoog op de prioriteitenlijst stond. Dat geldt echter niet voor ieder type schade.

Eerder in dit boek besprak ik dat door metabole activiteit **vrije zuurstofradicalen** vrij kunnen komen die schade berokkenen aan allerlei cellulaire structuren waaronder het DNA (H12.9.1, H12.9.4, H14, fig 33). Door de evolutie heen hebben cellen zich hiertegen gewapend door het beschikbaar hebben van beschermende antioxidantia en radicaal-neutraliserende enzymsystemen. Een simpel molecule dat een grote rol speelt bij de bescherming tegen zuurstofradicalen en het hierbij vaak gevormde H₂O₂ (waterstofperoxide) bestaat uit drie aminozuren: glutaminezuur, cysteïne en glycine. Het wordt aangeduid met de naam glutathion (afgekort GSH, de S is de zwavel op de cysteïne en in de gereduceerde vorm zit hieraan een waterstofatoom, de H). De SH-groep van het cysteïne speelt de sleutelrol in de anti-oxidatie werking. Na contact met b.v. H₂O₂ ontstaat tijdelijk de geoxideerde vorm van GSH, GSSG, dat daarna door andere systemen

in de cel weer teruggebracht kan worden in de gereduceerde vorm. De te bevruchten eicel in de metafase van de 2^e meiotische deling heeft van nature al een hoog gehalte aan GSH omdat dit ook een rol speelt bij de transformatie van de kern van de zaadcel in de mannelijke pronucleus. Deze hoge concentratie blijkt nu dus ook belangrijk voor het beheersen van het evenwicht tussen oxidatie en reductie en daarbij ook voor schade in de cel. Een bijkomende betekenisvolle factor is dat het zuurstofgehalte in de vrouwelijke reproductieve tractus relatief laag is. Wanneer oxidatieve schade toch nog optreedt en baseveranderingen in het DNA teweegbrengt wordt dit in de zygote voornamelijk getackeld door het BER systeem (fig 33). De groep van John Aitken, afkomstig uit Edinburgh en nu verbonden aan de universiteit van Newcastle in Australië leverde hiervoor enige jaren geleden het bewijs. Op de oxidatieve DNA schade, die in de bijbal kan zijn ontstaan (H12.9.1) en dus via de zaadcel wordt ingebracht, kun je als eicel dus maar beter voorbereid zijn. Kennelijk is er op de eicel evolutionaire selectiedruk geweest om zowel (a) oxidatieve stress te kunnen beheersen m.b.v. het glutathion systeem als ook (b) oxidatieve DNA schade van voornamelijk paternale oorsprong te kunnen repareren. Het bij dit laatstgenoemde proces gebruikte BER systeem blijkt tevens betrokken te zijn bij het na binnenkomst van de zaadcel verwijderen van de methylgroep aan de CpG dimeren in het paternale DNA (H9, fig 11, 23). Een mooi voorbeeld van “multitasken” in de celstadia van de vrouwelijke kiembaan.

Toen we door het eigen onderzoek aan de muis eenmaal een goede indruk hadden gekregen van de hoeveelheid dubbelstrengs breuken in het DNA van de zaadcelkern, zoals die na de entree in de eicel te zien zijn, lag de weg open voor een kijkje in humaan sperma. In Japan was in de 90-er jaren al een soort van inzicht verkregen door een humane zaadcel via ICSI in een eicel van de muis te brengen, waarop de eicel geactiveerd raakt (H13.5.1). Niets houdt de ontwikkeling van de pronuclei dan nog tegen (fig 42). Voordat de eerste klievingsdeling begon, verhinderden de Japanse onderzoekers de opbouw van de spoelfiguur met behulp van colchicine (H3.4). De fusie van de gameten had wel plaatsgevonden maar de fusie van hun kernen niet. In een onvoltooide bevruchting kon men zo de chromosomen van de muis naast die van de mens zien liggen en bestuderen, en was tevens een ethisch ontoelaatbaar experiment (een mens-muis embryonaal hybride) nog net voorkomen.

Voor ons doel was het voldoende te zien dat de muizeicel na ICSI het chromatine van de humane zaadcel uitpakte. Door de verandering in een nucleosomale structuur was het mogelijk om met behulp van immunofluorescentie op gammaH2AX te zien hoeveel dubbelstrengs DNA breuken dat opleverde. In deze “pilot study”, net genoeg voor het verkrijgen van een

vingerwijzing, onderzochten we een paar mannen met slecht zaad, en twee mannen met een normaal **spermiogram** (H12.9).

We zagen de dubbelstrengs DNA breuken ook hier, en ongeveer in dezelfde orde van grootte als bij de muis. Wel was het aantal breukloze spermakernen bij de drie zwakzadige donors wat minder dan bij de normale controles. Deze hele gerichte aanpak om in de context van de eicel het aantal dubbelstrengs DNA breuken te bepalen, is zeer bewerkelijk en proefdier intensief. Voor een praktijkgerichte toepassing zoals het karakteriseren van DNA schade in zaadcellen is het niet geschikt.

13.5.3 De “maternal to zygote” overgang

Deze overgang, het essentiële concept voor het begrijpen van de start van de embryonale ontwikkeling, kwam in hoofdstuk 11.2 al onder de kop “ontwikkelingen in de eicel” voor het eerst langs. Een selecte groep van genen, waarvan het aantal nog niet precies bekend is, is er verantwoordelijk voor. Het aanleggen van een voorraad van **mRNA transcripten** van deze zogenaamde “maternal effect” genen vindt relatief laat in het rijpingsproces van de eicel plaats. Het principe van de rol van de eicel bij het op gang helpen van de embryonale ontwikkeling is al langer in meer detail bekend voor het fruitvliegje (*Drosophila*) en de klauwpad (*Xenopus*). Voor alle genoemde organismen is de productie van mRNA van de “maternal effect” genen essentieel. Terwijl tijdens de klievingsdelingen de mRNA voorraad van de eicel slinkt, start de **transcriptie** op het embryonale genoom en worden de mRNA moleculen geproduceerd die de embryonale ontwikkeling overlappend met activiteit van de “maternal effect” eiwitten verder helpen. Zie het als een soort van aflossing van de wacht, waar deze genen een grote rol bij spelen. In een korte publicatie in Nature Genetics uit het jaar 2000 werd er voor het eerst bij muizen gewag van gemaakt. De vrouwtjes muizen in deze korte publicatie waren **homozygoot** voor een mutatie in het **gen Mater** (-/-). Ze hebben een normale cyclus van een dag of 5. De eierstokken zien er helemaal normaal uit en de eicellen ook. De paringen verlopen normaal, maar een zwangerschap ontstaat er niet. De mutatie is **recessief**, de +/- vrouwtjes zijn compleet normaal. Met de mannelijke vruchtbaarheid heeft *Mater* niets te maken, het gen komt alleen in de eicellen in het ovarium tot expressie. De embryo's van de -/- moeders sterven in het 2-cellige stadium af. In 2016 was inmiddels een totaal van 44 genen bekend, die aan eenzelfde patroon voldoen. Ze hebben geen rol in de mannelijke kiembaan maar wel een rol vanaf het zygote stadium als gevolg van transcriptie tijdens de oogenese. Het zijn er zeker meer, onderzoekstechnisch is dit

geen makkelijk gebied maar het ontwikkelt zich wel. Celbiologisch gezien is de verandering van een eicel die de 2^e meiotische deling af gaat maken naar een zygote die zich in twee gelijke helften op zal splitsen gigantisch (fig 42, 43). We weten nu dat de maternale effect eiwitten, zoals zoveel eiwitten, in grotere complexen (modules) werken. De momenteel best beschreven module heeft de naam Subcortical Maternal Complex (SCMC) en werd in 2008 door een groep Chinese onderzoekers uit Beijing ontdekt. Het eiwit van het archetypische maternale effect gen *Mater* maakt er ook deel van uit. Dit eiwitcomplex dat uit tenminste 6 of meer leden bestaat en domicilie houdt onder de celmembraan, is bij verschillende processen betrokken. Het stuurt de veranderingen van het cytoskelet, helpt in het reorganiseren van celorganellen (fig 2) en in het voorbereiden van het paternale en maternale chromatine om genen tot expressie te kunnen brengen. Andere maternale effect genen, zoals *Trim28* (fig 24) zijn betrokken bij het behoud van de DNA methylering in de “imprint control regions” (ICRs) van clusters geïmprinte genen (genomische imprinting, H10, fig 27) of het repareren van DNA. *Trim28* is een extreem voorbeeld van een eiwit dat als een verbinder van functies in een groot complex werkt (fig 24). In dit geval hebben deze functies allemaal te maken met het reguleren van het chromatine (fig 24).

Nog een ander en laatste voorbeeld van deze fascinerende groep van genen, hoe ze als integrators van celbiologische processen werken, en nodig zijn om de embryonale ontwikkeling vlot te trekken is *ATRX*. *ATRX* is een bij muis (*Atrx*) en mens op het X chromosoom gelegen gen dat opgepikt is vanwege het veroorzaken van een ernstige genetische aandoening met de ingewikkelde naam “alpha thalassaemia/mental retardation syndrome X-linked” (een thalassaemie is een afwijking aan het hemoglobine). In de OMIM (H4.2) is het te vinden onder nummer 300032. Het door dit gen gecodeerde product functioneert als een DNA helicase, een eiwit dat de dubbele helix kan ontwinden, bijvoorbeeld ten dienste van de transcriptie. Bij het bestuderen van een muizenmodel voor deze ziekte, waarvan de resultaten in 2015 werden gepubliceerd, bleek het *Atrx* gen in de oogenese tot expressie te komen. Mutatie leidde na de bevruchting tot een stop in de ontwikkeling tijdens de klievingsdelingen: het is een maternaal effect gen. De onderzoekers zagen bij het gelijkschakelen van het chromatine van de paternale en de maternale chromosomen in de zygote verschijnselen aan het **heterochromatine** bij de **centromeren**. Ook bij het “managen” van dubbelstrengs DNA breuken klopte er iets niet. Zo blijkt *Atrx* betrokken te zijn bij het verhinderen van chromosomale instabiliteit (CIN). Dit fenomeen is, zoals we in hoofdstuk 16.3.1 zullen zien een nachtmerrie in het IVF lab. De driedelige functies van *Atrx*: de betrokkenheid bij (a) chromatine modelering, (b) het participeren van de maternale chromosomen in de spoelfiguur en (c) het heel houden van de chromosomen tijdens de eerste celcycli van het jonge

embryo, illustreren op prachtige wijze dat het op elkaar afstellen van cellulaire processen een levenskenmerk is. Hieraan tornen beschadigt het prille leven.

13.5.4 Afwijkingen bij de bevruchting

Tijdens de meiose, de bevruchting en tijdens de klievingsdelingen geldt de wet van Murphy: alles wat mis kan gaan, zal ook mis gaan. Een relatief veel voorkomende fout is **triploïdie**. Zoals we zagen kan dit een gevolg zijn van een bevruchting door 2 spermatozoa (H13.5 en H13.5.1). Een andere route naar triploïdie en het verschijnen van drie pronucleï loopt via een afwijkende 2^e meiotische deling van de eicel. In dit geval wordt er geen 2^e poollichaampje gevormd (fig 42) en verschijnen de daarvoor bestemde chromosomen in een 2^e vrouwelijke pronucleus. Dit gebeurt in het IVF lab nog wel eens bij een ICSI bevruchting (frequentie hiervan is ongeveer 1%). Andere afwijkingen zijn veel zeldzamer en wetenschappelijk gezien spectaculairder.

Mijn eerst doctoraalstudente, begin 70-er jaren, keek naar de bevruchting van eicellen bij muizen die waren geselecteerd op vruchtbaarheid. Ze zag iets dat we daarna nooit meer waar hebben genomen. De 2^e meiotische deling had kenmerken van de eerste klievingsdeling aangenomen. Er waren nu twee eicellen, met ieder de helft van het cytoplasma, ontstaan en beide waren bevrucht. Het individu dat zich hieruit kan ontwikkelen is een **chimaer**, want er ontstaat een embryo bestaand uit een mengsel van cellen met twee verschillend genotypen, die niet uit één zygote zijn ontstaan. De meeste chimaeren zullen het gevolg zijn van twee fuserende zygoten of klievingsstadia (fig 43), ook een zeer zeldzame gebeurtenis. Desalniettemin komen ze bij de mens voor. Bij genetische verschillen tussen lichaamscellen die wel uit één zygote zijn ontstaan praten we over een **mozaïek**. Dit komt aan het begin van de embryonale ontwikkeling (je praat dan over de klievingsdelingen, fig 43) veel voor, iets waar we door de praktijk van de IVF nu meer vanaf weten (H16.3.1). Bovendien is iedere vrouw feitelijk een mozaïek als gevolg van X chromosoom inactivatie (box 4).

Door DNA onderzoek op enkele **blastomeren** van het rund en de mens, is nog een andere opzienbarende abnormaliteit gevonden. Tijdens de eerste klievingsdeling, eventueel voorafgegaan door afwijkingen bij de bevruchting, belandden de vrouwelijke chromosomen allemaal in de ene blastomeer en de mannelijke chromosomen allemaal in de andere. Aldus ontstaat er een mengvorm met aspecten van een **gynogenont** en een **androgenont** (H10). Deze situatie gaat samen met blastomeren die naast **diploïd**, ook triploïd en **haploïd** kunnen zijn. Natuurlijk wordt de ontwikkeling van dergelijke embryo's afgebroken (H10). Afwijkingen bij de bevruchting

leiden meestal niet tot nageslacht maar een heel zeldzame keer, bijvoorbeeld bij een chimaer, kan dat wel.

13.6. De klievingsdelingen

Door de ontwikkeling van de IVF bij de mens is de belangstelling voor het verloop van de klievingsstadia en het delingsgedrag van de blastomeren natuurlijk enorm gegroeid (fig 43). Omdat dit in hoofdstuk 6 weer aan bod komt besteden we er hier minder aandacht aan (fig 43). Bij alle goed onderzochte zoogdieren, de muis, de rat en de landbouwhuisdieren, is het achterop raken van cellulaire delingsactiviteit in pre implantoire embryo's geen goed teken: er is wel degelijk een spoorboekje (fig 43). Ook tijdens de vroege zwangerschap wordt de omgeving van het embryo in sterke mate hormonaal gereguleerd.

Oponthoud door problemen tijdens de DNA replicatie of mitotische celdelingen is ongewenst. Zoals we al in hoofdstuk 11.5 zagen is vroeg embryonale sterfte een vaak voorkomende gebeurtenis. Selectie van de fitte embryo's heeft daarbij prioriteit boven het redden van embryo's die achterop raken. Werken de "cell cycle checkpoints" (fig 4, en dus de **DDR** en de uitvoering daarvan kost tijd) dan helemaal niet meer naar behoren in het vroege embryo? Onderzoek bij de muis heeft aangetoond dat het hiervoor benodigde gereedschap wel aanwezig is, maar net als in de meiose staat het aanvankelijk niet zo scherp afgesteld. Daarbij zijn er ook nog verschillen tussen soorten, de muis doet het tijdens de klievingsdelingen in dit opzicht wel beter (H13.6.1). In hoofdstuk 16.3.1 komen we terug op de chromosomale chaos, die door ontregeling van klievingsdelingen in het menselijke embryo kan ontstaan: het heeft veel met de praktijk van de IVF van doen, omdat er een direct verband is met pre en vroeg post implantoire sterfte.

Vanaf het zygote stadium is niet alleen de correcte verdeling van de chromosomen over de dochter blastomeren belangrijk. Ook de telomeerlengte van de individuele chromosomen moet al in het pre implantatie stadium nauwkeurig gereguleerd worden omdat de paternale en maternale chromosomen in dit opzicht sterk verschillen. In pre implantatie embryo's komt **telomerase** activiteit (H2.3.3) langzaam op en piekt in het **blastocyst** stadium (fig 43). Daarna neemt het langzaam af tot het telomerase gen na de geboorte niet meer wordt afgelezen.

Tijdens de spermatogenese is telomerase royaal aanwezig en actief (H12.13), maar tijdens de oogenese wordt veel minder tot geen activiteit waargenomen. Het hierdoor veroorzaakte verschil in **telomeer** lengte tussen de maternale en paternale chromosomen is in het jonge embryo

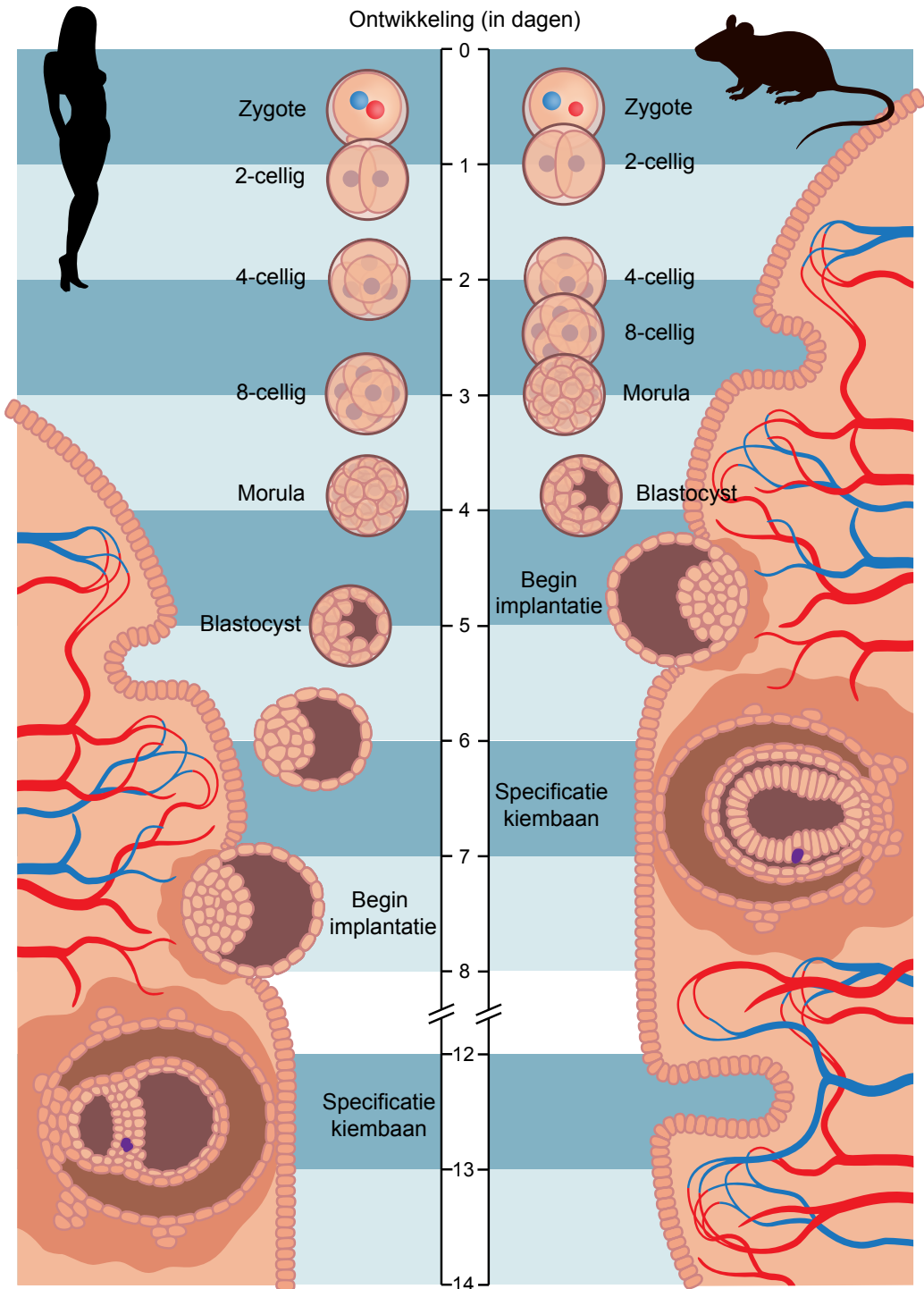


FIG 43

Een vergelijking tussen de tempo's van de klievingsdelingen, via het **blastocyst** stadium en implantatie tot aan het ontwikkelen van de kiembladen (de gastrulatie) en het verschijnen van de eerste **primordiale kiemcellen** (in donkerpaars) in muis en mens. Tijdens het 8-cellige stadium zijn de contouren van de **blastomeren** op een gegeven moment niet meer afzonderlijk waarneembaar. Ze kruipen naar elkaar, toe, het contact ertussen wordt intensiever: men spreekt nu over compactie. In de vroege blastocyst begint het onderscheid zichtbaar te worden tussen de “**inner cell mass**” waaruit iets later de **epiblast** en dus het **embryo** zal ontstaan, en de omhullende cellen van de trofoblast. De **zona pellucida** is als een dikke lijn weergegeven.

dus groot. Misschien daarom is er in het pre implantoire embryo ook een ander, op recombinatie gebaseerd mechanisme actief, om telomeren te verlengen. Hierdoor wordt het lengteverschil tussen de paternale en maternale telomeren uiteindelijk opgeheven.

13.6.1 Is de eicel overbemeten?

Ja, de eicel is qua omvang en inhoud overbemeten. Er mag best wat misgaan tot aan de ontwikkeling tot blastocyst (fig 43). Pas daarna is er behalve groei in aantal cellen, ook weer sprake van groei in massa.

Rond 50 jaar geleden al werd in de ARC “reproductive physiology unit” te Cambridge, de vraag gesteld hoeveel embryo's er uit een zygote zouden kunnen worden verkregen. Het maximaal haalbare bij het schaap bleek een vierling te zijn, ontstaan uit een hele serie 8-cellige embryo's die na verwijdering van de zona pellucida uit elkaar waren “gemanipuleerd” in 4 stuks 2-celligen. Vervolgens plaatsten de onderzoekers deze 2-cellige embryo's terug in lege zona pellucida's van geovuleerde eicellen. Omdat goede kweekmedia in die jaren voor de embryo's van landbouwhuisdieren ontbraken, kweekte men de gevulde zona's verder in de afgebonden eileiders van een schaap in het juiste stadium van de cyclus. De zo verkregen vroege blastocysten werden daarna in de baarmoeder van een derde ooi getransplanteerd. Een dergelijke benaderingswijze, het zoeken naar het verst ontwikkelde blastomeer stadium in combinatie met de kleinste hoeveelheid cytoplasma, die ontwikkeling van een compleet leven nog toestaat, wordt wel omschreven als “proof of principle”. Even later werd de proef in hetzelfde instituut bij het rund

herhaald. Daar stopte het maken van monozygote meerlingen bij een drieling, wat overigens niet bewijst dat een vierling niet mogelijk was geweest. Bij de rhesusaap heeft een kwart embryo al eens tot een geboorte geleid en in het IVF lab van de vrije universiteit van Brussel, o.l.v. professoren Liebaers, van Steirteghem, Tournaye en Devroey, konden uit een bevruchte eicel van de mens vier normaal uitzijende blastocysten worden opgekweekt. Helemaal onbegrijpelijk is dat ook weer niet. Eeneiige tweelingen komen bij de mens in 0,3% van de spontane geboorten voor en ook eeneiige vierlingen worden heel heel soms geboren.

Bij de muis is er ook ruim voldoende onderzoek gepleegd naar de capaciteit voor het produceren van monozygote meerlingen. Het blijft bij een tweeling steken, wellicht omdat de eicel iets kleiner is en ook minder dooiermateriaal bevat (ze zijn helderder). Heel lang werd aangenomen dat de 8 cellen voorafgaand aan de compactie (fig 43) gelijk en dus volledig **totipotent** zijn. In een recente publicatie uit de groep van Michele Boiani te Münster wordt beschreven dat niet in elk 2-cellig embryo het succes van een “ieder voor zich ontwikkeling” even groot is. Dat was maar in een derde van de grote serie embryo's het geval. Bij de overigen kon maar één van de twee zich tot een blastocyst ontwikkelen. Het echte embryo ontstaat wanneer de “**inner cell mass**” in late blastocysten zich opdeelt in een cellaag, het primitieve endoderm, en een groepje cellen dat als epiblast bekend staan en waar het uiteindelijke embryo uit ontstaat (fig 43). Normaal zijn er aan het begin zo'n 9 van, maar hoeveel daarvan zijn er minimaal nodig? In 2016 kwam er alweer uit Cambridge aanvullend wetenschappelijk inzicht. Door in de deling van 4 naar het 8-cellige stadium het checkpoint voor de goede hechting van de chromosomen aan de spoelfiguur (fig 4) te remmen ontstonden in ongeveer 2/3^e van de blastomeren afwijkingen van het diploïde aantal. Dat is te veel voor een normale embryonale ontwikkeling. Maar verdun je die fractie met 50% door een nieuw 8-cellig embryo (een chimaer) te maken waarin 4 onbehandelde blastomeren uit een controle embryo participeren, dan lukt het wel. Naar schatting kunnen 2 tot 3 cellen in het 8-cellige embryo chromosomaal abnormaal zijn zonder dat de ontwikkeling van het embryo in gevaar komt. Er kan dus in de eerste dagen het een en ander misgaan, zonder dat daarbij de kans op een doorgaande zwangerschap wordt verspeeld (zie ook H16.3.1).

13.7 *In vitro* technieken

In vitro onderzoek aan het metabolisme van muizenembryo's startte in de jaren 60 met het onderzoek van Ralph Brinster van de veterinaire faculteit van de universiteit van Philadelphia, USA. Deze groep ontdekte dat een muizenembryo tot aan het 8-cellige stadium alleen maar

pyruvaat (product van de glycolyse) als energiebron kan gebruiken. Pas vanaf het 8-cellige stadium kan ook glucose gemetaboliseerd worden.

Voor de samenstelling van de media die werden gebruikt om blastocysten uit zygoten of uit 2-cellige embryo's te kweken werden twee "recepten" gebruikt, die niet wezenlijk van elkaar verschilden. In de USA had onderzoeker Wes Whitten van het Jackson lab in Maine zijn naam verleend aan het Whitten medium en in de UK werd de Britse variant Whittinghams medium genoemd. Beide media bestonden uit relatief simpele zoutoplossingen met een buffer voor de zuurgraad (bicarbonaat, de bruistabletten van de slijter) en CO₂ in de lucht erboven voor het evenwicht. Als eiwitbron daarin werd albumine uit bloedplasma van het rund gebruikt, in allerlei zuiverheden te koop. Nadien zijn deze media nog weer verder ontwikkeld, en werden er onder meer aminozuren aan toegevoegd. Deze meer complex samengestelde media werden onder meer door Jean Pierre Ozil bij zijn onderzoek naar eicelactivatie gebruikt (H13.5.1).

Henry Leese van de universiteit van Hull UK heeft zich jarenlang beziggehouden met het metabolisme van pre implantoire embryo's tot aan het blastocyst stadium *in vitro*. Van hem komt de "quiet embryo hypothese". Grond voor deze hypothese zijn de overtuigende aanwijzingen voor een bijna slaapachtig bestaan van het embryo in de eerste dagen van zijn of haar ontwikkeling. Zoals hiervoor in hoofdstuk 13.6.1 al opgemerkt is er geen toename van de celmassa tot aan de vroege blastocyst. Bij de initiële celdelingen wordt het bestand aan mitochondriën, evenals dat van de andere celorganellen, telkens weer verdeeld. De cellulaire energiebehoefte in het vroege embryo is daarom relatief laag. Ook gaat ook geen energie verloren aan communicatie tussen de individuele blastomeren, die tot in het 8-cellige stadium autonoom zijn. Toch is regulatie van de energievoorziening een complex proces en te specialistisch voor een verdere behandeling hier.

Alle experts zijn het erover eens dat de klievingsstadia gevoelig zijn voor externe invloeden. Toch is het een algemeen gedeelde observatie dat er in deze periode geen celselectie plaatsvindt. **Apoptose** is nog niet zo zeer aan de orde en wordt pas effectief in het blastocyst stadium (fig 43).

In 2003 publiceerde een Wageningse oud AIO Marleen Boerjan samenwerkend met de groep van Ann van Soom uit Gent een studie naar het effect van de zuurstofconcentratie op de *in vitro* ontwikkeling van runderembryo's, toen nog niet algemeen werd geaccepteerd dat het verstandiger is dat niet onder atmosferische omstandigheden te laten plaatsvinden, dus niet bij 20% zuurstof maar op een niveau van maximaal 5%. In 2012 verscheen er vanuit het IVF lab van toen nog het AMC in Amsterdam een Cochrane database review over het effect van 5% zuurstof

versus 20% in de mondiale IVF praktijk bij de mens. De conclusie is duidelijk, laag zuurstof verbetert de "take home baby rate". Henry Leese stelt dat we anno 2013 nog geen goed idee hebben van de omstandigheden in het oviduct ten tijde van het transport van de klievingsstadia naar de baarmoeder (fig 43). Maar wat in ieder geval bekend is, is dat zuurstof daar aardig buiten de deur wordt gehouden. Dat wisten we ook al van de tot Graafse follikels uitgroeïende tertiaire in het ovarium (fig 29).

Nature 1965 bevatte een publicatie van Robert Edwards, waarin werd aangetoond, dat wanneer je eicellen bevrijd uit antrale follikels, het meïose arrest (H11.1) wordt opgeheven en ze zich kunnen ontwikkelen tot het dan volgende ruststadium in de metafase van de 2^e meïotische deling (fig 39, 42). Later zou hij wereldberoemd worden door in 1978 met de medicus Patrick Steptoe aan de wieg te staan van de IVF als fertiliteitsbehandeling bij de mens. Dat werd 3 jaar voor zijn dood in 2010 gewaardeerd met de Nobelprijs voor fysiologie/medicijnen. Steptoe was toen al overleden. In 1968 vanuit Wageningen als veeteeltstudent op buitenlandse stage op de afdeling Tierzucht und Haustiergenetik van de Georg August Universität in Göttingen ten zuiden van Hannover, gaven ze me deze publicatie, met als opdracht om de proef van Edwards bij het rund te herhalen. Het laboratorium had op het gebied van het werken met eicellen maar een beperkte ervaring. Maar de onderzoekomgeving was vele malen grootser dan alles wat er toen in Wageningen op dit gebied voorhanden was. Er waren tijdelijke medewerkers uit Iran, Egypte en Tsjechoslowakije. Postdoc Franz Ellendorff was zojuist teruggekeerd van de Cornell Universiteit in de staat New York, en helemaal in de ban van wat de hersenen allemaal niet deden, wanneer het op voortplanten aan kwam. Onder leiding van Prof Dr Dr Diedrich Smidt werden proeven bedacht, boeken geschreven en per automobiel congressen binnen Duitsland bezocht, met een overnachting in een echt hotel. Er was bier en taart, en avondproeven waren normaal in de ruimte waar ter ere van de bekende Göttinger dwergvarkentjes een klein operatietheater was ingericht.

De runderovaria nodig voor mijn proef kwamen uit het lokale abattoir dat in de vroege morgen van de maanden januari tot maart in de laatste uren van de nacht fietsend te bereiken was, een met een zoutoplossing gevuld thermosvat bungelend aan het stuur, terwijl de sneeuwsporen van de toen al overvloedig aanwezige auto's na opvriezen de tocht een avontuurlijk karakter verleenden. Daar aangekomen was het zaak de sympathie van de keuringsveearts te winnen. De slachters werden per rund betaald, en dat uitte zich in

een moordend tempo, waarbij zodra er een plek vrij was, het volgend slachtoffer in een staat van opperste stress werd binnen geleid en met de pen werd geschoten. Wanneer de koe aan de achterpoten omhoog werd getakeld en opengesneden, verscheen er een grote kruiwagen, waarin na een paar flinke halen de ingewanden verdwenen. Het apart houden van de baarmoeder met eileider en eierstokken vereiste een extra handeling en kostte in principe tijd. Met behulp van de keuringsarts lukte het in deze kakofonische wereld door te dringen en na enige tijd waren er slachters die floten wanneer de baarmoeder met eierstokken aangevlogen kwam en letterlijk uit de lucht geplukt kon worden. Als dank nam je dan een fles Bokma uit Nederland mee. Terug in het laboratorium prikte je de grote follikels aan en begon het zoeken naar de eicel cumuluscel complexen (H13.5). Die werden in follikelvocht in de kweek gezet. De volgende dag kon je dan kijken of de meiose weer op gang was gekomen. Dat was een stuk moeilijker om vast te stellen dan het door Bob Edwards in Nature was opgeschreven, hoe vaak je die korte publicatie ook las. De hiervoor benodigde technieken waren maar minimaal op het lab aanwezig, en zelf het wiel uitvinden was maar heel gedeeltelijk aan de orde. Toch kreeg ik wel de indruk dat er iets met de eicellen gebeurde, plus het geloof dat je beter naar een plek kunt gaan waar ze de techniek helemaal beheersen (H19), anders loop je eeuwig achter de feiten aan. Maar die eicellen waren ongelooflijk mooi, dat alle leven daaruit voort komt en dat alweer een Engelsman, prof C.R. Austin uit Cambridge, er in 1961 een heel boek over kon schrijven met een lading celbiologie erin, iets waar we toen in Wageningen als veeteeltstudenten nog nooit van hadden gehoord.

Mitochondriële overerving

Mitochondriën (fig 2) zijn celorganellen met een nogal variabele vorm en grootte van 0,5-10 μm en worden ook wel aangeduid met het koosnaampje mito. Vrijwel iedere cel heeft ze. Ze hebben een heel centrale betekenis voor de cel waar allerlei facetten aan kleven. De meest bekende functie is die van de cellulaire energiecentrale, onmisbaar als ze zijn bij het benutten van zuurstof in de verbranding van pyruvaat en vetzuren voor de productie van ATP (adenosine trifosfaat). ATP is het betaalmiddel voor alle processen in de cel die energie kosten. Maar de cellulaire betekenis van mito's is dus veel breder. Ze doen aan steroid synthese, helpen in de opslag van calcium ionen, zijn betrokken bij de regulatie van **apoptose** en verzorgen ook de warmteproductie in warmbloedige dieren.

Aan de nu algemeen geaccepteerde verklaring voor het ontstaan van mitochondriën is de naam van de Amerikaanse bioloog Lynn Margulis verbonden. Zij heeft zo rond 1970 aannemelijk gemaakt dat in de tijden van het vroegste leven fusies hebben plaatsgevonden tussen een eencellig (oer)organisme en een simpele bacterie. Deze hypothetische fusiegebeurtenis staat nu bekend onder de term endosymbiose.

Aanvankelijk sterk bekritiseerd is voor deze ontstaansgeschiedenis veel aanvullend bewijs geleverd en is ze nu breed geaccepteerd.

Hoe staat het er momenteel voor met de nazaten van deze endosymbiotische samenlevingsvorm? Ieder mitochondrion in de cel is nu omhuld met een dubbele membraan (fig 2). Het binnenste membraan stamt af van wat ooit het membraan van de binnen komende bacterie was. Het buitenste membraan moet tijdens de fusie zijn ontstaan, want heeft kenmerken van het oermembraan van het eencellige organisme, dat als een soort van gastheer voor de bacterie

fungeerde. En tenslotte: een mitochondrion bezit een eigen **genoom**, gevormd door DNA dat nog steeds bacteriële kenmerken uit de oertijd draagt.

Er is een duidelijke taakverdeling tussen mitochondriaal **DNA** (mtDNA) en kern DNA. Het mitochondrion bevat meestal meerdere (2 tot 10) cirkelvormige DNA moleculen die, om daar structuur en functie aan te verlenen, door eiwitten gesteund worden. Deze DNA bindende eiwitten worden door genen uit het kerngenoom gecodeerd en na hun synthese vanuit het cytoplasma in het mitochondrion geïmporteerd. In zijn totaliteit is een mitochondrion opgebouwd uit wel 1500 verschillende eiwitten. Alle mitochondriën samen maken soms wel tot 10% of meer van de totale eiwitmassa van een cel uit. De regulatie van het aantal mitochondriën per cel vindt plaats door deling van het organel en wordt vanuit de kern gestuurd. Dit proces gebeurt onafhankelijk van het verloop van de celcyclus. Door insnoering wordt een mitochondrion overlans in tweeën gedeeld ("mitochondrial fission") en verdeelt het mtDNA ervan zich over de twee nieuwe mitochondriën. Het spreekt vanzelf dat de replicatie van het mitochondriële DNA tot meerdere kopieën per mitochondrion hieraan vooraf gaat. Dit gebeurt met op mitochondriële maat gesneden gereedschap waarvan het genoom van de kern het recept heeft en er de regie over voert.

Het cirkelvormige mitochondriële DNA, het mt genoom van de hier aan de orde komende diersoorten, verschilt erg weinig in omvang. Bij de mens is dit DNA 16,6 kb lang, waarvan het meeste coderend is. Het omvat 13 genen voor eiwitten en 24 genen voor **RNA** moleculen (22 tRNAs en 2 rRNAs) met een functie bij de **translatie** van die 13 eiwitten. Hiervoor bezitten mitochondriën zelfs hun eigen ribosomen. In die zin is het mitochondrion dus nog steeds zelfvoorzienend. De 13 eiwitten zijn subeenheden van 5 veel grotere eiwitcomplexen die tegen het binnenmembraan van het mitochondrion liggen en daar verantwoordelijk zijn voor een cascade van reacties, waarmee uiteindelijk de cellulaire energiebrandstof ATP wordt geproduceerd. Dit proces wordt meestal kortweg met de vakterm oxidatieve fosforylering (OXPHOS) aangeduid. Het merendeel van de eiwitten in de OXPHOS eiwitcomplexen en ook alle andere (bovengenoemde) 1500 eiwitten met een rol in o.a. de import van ionen, pyruvaat en vetzuren, metabole omzettingen, de mito en ribosoom vorming en de net vermelde mtDNA replicatie, worden vanuit de kern gecodeerd. Ze worden in het cytoplasma van de cel gesynthetiseerd en daarna in het mitochondrion geïmporteerd en op juiste wijze in het organel ingebouwd. In celtypen die sterk energiebehoefstig zijn, denk aan zenuwcellen en spiercellen, maar ook in cellen betrokken bij hormonale systemen, worden relatief veel mitochondriën gevonden en zijn ze ook actiever dan in cellen die in een soort van metabole rust verkeren.

De regulatie van mitochondriële hoeveelheden en hun activiteit is in de **kiembaan** (en tijdens de vroege embryogenese na vorming van een **zygote**) een uiterst complex proces. Gedurende de **oogenese** wordt een enorme populatie bestaande uit meerdere honderduizenden mito's aangelegd. In een eicel, die op zich al een ongewoon grote omvang heeft (H1), kan deze populatie wel tot 30% van het volume innemen. In de oocyt blijven de mitochondriën verantwoordelijk voor de ATP-voorziening via OXPHOS, maar ze krijgen de brandstof daarvoor (pyruvaat) aangeleverd vanuit de granulosa- en cumuluscellen. Tijdens de **spermatogenese** zie je een soort van omgekeerd proces. Door de complexe morfologische veranderingen wordt het volume van de uiteindelijke zaadcel ongeveer 40-50 x kleiner en raakt 80-90% van de oorspronkelijke hoeveelheid mito's verloren. De mitochondriën ondergaan daarbij stapsgewijze veranderingen in zowel de vorm als de positie in de cel. Als er tenslotte nog maar enkele tientallen tot een paar honderd mito's over zijn, hopen ze zich op achter de kop in het begin van de staart (in het zogenaamde "midpiece", fig 42). Tijdens het hele rijpingsproces blijven de mitochondriën actief in de OXPHOS gemedieerde ATP voorziening en krijgen de brandstof daarvoor vanuit de Sertolicellen aangeleverd als lactaat (dat ze zelf omzetten naar pyruvaat).

De levensloop en populatiedynamiek van mito's tijdens eicel- en zaadcelvorming verschilt dus sterk. Bij het begin van de bevruchting zijn ze bijna allemaal afkomstig van de eicel. Wat er daarna met de paternale mitochondriën gebeurt is ontdekt door Peter Sutovsky uit de USA: de eicel labelt de paternale mitochondriën door er een klein heel veel voorkomend eiwit, ubiquitine geheten, aan te hechten, waardoor ze ten prooi vallen aan de eiwitafbraakmachinerie van de cel. Het resultaat is dat ruim voordat er **blastocysten** zijn gevormd, de toch al weinige paternale mitochondriën zijn opgeruimd.

Na de zygotevorming raakt de enorme populatie aan maternale mito's tijdens de daaropvolgende klievingsdelingen steeds verder verdeeld over de **blastomeren** (H13.7). Omdat in deze vroege periode geen synthese van nieuw mtDNA, en dus geen biogenese van nieuwe mitochondriën plaatsvindt, zal het aantal per celdeling stapsgewijs afnemen. De cellulaire taken moeten natuurlijk wel worden vervuld. Ze blijven de energievoorziening met OXPHOS verzorgen en zijn ook betrokken bij enkele van de bovengenoemde andere fysiologische processen, die nodig zijn voor de regulatie van celdeling. Daar horen de grootschalige **epigenetische** veranderingen in het chromatine (H9) en de communicatie tussen cellen in het vroege embryo ook bij. Het is dan ook niet verwonderlijk dat, wanneer tijdens de oogenese hun aantal en staat van functioneren door veroudering en/of andere interne of externe oorzaken onder een bepaalde ondergrens zakt, dit de embryonale ontwikkeling in gevaar brengt.

Tijdens latere fasen van de vroege embryonale ontwikkeling komt de aanmaak van nieuwe mito's weer langzaam op gang. Bij de muis neemt het aantal mitochondriën per cel na de implantatie weer toe, wanneer de embryonale differentiatie in een stroomversnelling komt (fig 43).

De enorme variatie in metabole functies en levensloop van mito's in de verschillende cellen die deel uit maken van de kiembaan inclusief de vroege embryonale ontwikkeling, en dat gecombineerd met het feit dat mito's hun eigen genoom met zich meedragen, maakt het verhaal van hun overerving en genoom evolutie erg complex. Ook op het mitochondriële genoom is er namelijk wel degelijk mutatie-druk. Een van de belangrijkste oorzaken van mutaties in mtDNA komt van de basenschade die kan worden aangericht door vrije zuurstofradicalen (H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$). Omdat bepaalde OXPHOS eiwitcomplexen in het mitochondrion hiervan de voornaamste bron zijn, ligt het mitochondriële genoom a.h.w. altijd in de gevarenzone. Wel is de mate waarin DNA schade dreigt sterk afhankelijk van de metabole specialisatie en metabole activiteit van het type cel waarin ze voorkomen. Een van de modificaties die kan optreden door de inwerking van zuurstofradicalen op DNA is de vorming van 8-oxoguanine (fig 33). De concentratie hiervan die in DNA (mtDNA of kern DNA) wordt aangetroffen kan in het onderzoek gebruikt worden als maatstaf voor de mate van de aangerichte schade. Bij dit type analyse worden o.a. antilichamen gebruikt die 8-oxoguanine in het DNA kunnen herkennen (fig 33). Ook andere vormen van DNA schade, veroorzaakt door replicatiefouten of toxische stoffen, kunnen zich in mito's voordoen. Voor herstel van deze soorten van schade heeft het mitochondrion haar eigen gereedschap. De machinerie hiervoor is weliswaar opgebouwd uit kern-gecodeerde eiwitten, maar de werking ervan is duidelijk anders afgesteld dan voor herstel van DNA in de celkern. Wel zijn er functionele overeenkomsten, want bekende DNA herstelroutes zoals BER en NER (zie fig 33) zijn ook actief in mitochondriën, maar ogenschijnlijk minder effectief. Het mitochondriële DNA is namelijk behoorlijk mutatiegevoelig, bij zoogdieren met ruwweg een factor 20.

Hiervoor is al vermeld dat het mtDNA in vroege embryo's alleen van maternale oorsprong is. Wanneer je een idee hebt over de vermenigvuldiging van de mitochondriën tijdens de oogenese tot aan de rijpe eicel, en je weet de mutatiekans per mtDNA basepaar per kopieergebeurtenis, dan zou je een schatting kunnen maken van de toevoer van nieuwe mutaties per generatie. Maar dat is niet de manier waarop in de recente overzichtsartikelen over de genetische variatie van mitochondriën wordt nagedacht. De ingang die, althans voor de mens, meestal genomen wordt, heeft te maken met de waarneming dat bij 1 op de 5000 geboren en er sprake is van een ziekte die het gevolg is van een duidelijke mutatie in het mitochondriële DNA. Wanneer deze mutatie in

(meer dan) 60-80% van de mitochondriën van de eicel aanwezig is, en dit percentage tijdens ontwikkeling en groei in de lichaamscellen (**somatische cellen**) van het zich ontwikkelende individu gehandhaafd blijft, ontstaat het **fenotype**, dat gekenmerkt wordt door een ernstige metabole of fysiologische storing die bij deze mutatie hoort. Als de populatie van mitochondriën in een cel zowel mutant en niet-mutant mtDNA bevat, spreekt men van heteroplasmie (i.t.t. homoplasmie waarbij alleen de niet-gemuteerde of juist alleen een gemuteerde vorm aanwezig is). De nieuwe technieken om de DNA basenvolgorde te bepalen hebben duidelijk gemaakt dat homoplasmie veel minder normaal is dan gedacht, en eigenlijk zeldzaam is. Niemand blijkt namelijk zuiver “homoplastisch” zijn: altijd worden er in weefsels wel cellen aangetroffen met daarin een aantal mito's met een mutatie. Nog waarschijnlijker is dat er vaak kleine subpopulaties voorkomen met tezamen een spectrum aan verschillende mutaties.

Wat onderzoekers die zich met het doorgeven van mitochondriën aan de volgende generatie bezighouden sterk heeft verbaasd, is hoe weinig generaties het in beslag kan nemen om van het ene dominante mtDNA **genotype** in het andere te komen. Aanwezigheid van een paar mitochondriën met daarin een DNA verandering kan al voldoende zijn.

Dit zijn bevindingen die gedaan zijn bij schapen en Holstein-Friesian zwartbonte runderen van rond 1980. Om te verklaren hoe een nieuwe mutatie zo snel een dominante positie in kan nemen, is men met de “bottleneck hypothese” gekomen. Ergens in de vrouwelijk kiembaan is er sprake van een bottleneck waarin het aantal mitochondriën per cel zeer laag is. Wanneer deze cellen delen kan het toeval bij de distributie van verschillende mitochondriële genotypen over de dochtercellen een rol gaan spelen. Wanneer er dan een populatie ontstaat met een meerderheid van één bepaald mito DNA type, en dat “toeval” herhaalt zich nog een paar keer, kun je begrijpen waarom een verandering zo snel kan plaatsvinden. Wat is een reële schatting voor het aantal mito's tijdens de bottleneck en over welke fase van de kiembaan hebben we het dan? Een artikel hierover uit Cambridge met schattingen voor de **primordiale kiemcellen** van de muis verscheen pas rond 2008. De hierbij gebruikte techniek, bepalingen op basis van de sterkte van een DNA signaal, was toen pas met voldoende nauwkeurigheid ontwikkeld. Het tellen van mitochondriën m.b.v. de elektronenmicroscopie is veel te bewerkelijk. De bottleneck blijkt te zitten in de eerste stadia van de primordiale **kiemcellen**, waarbij een gemiddeld aantal van 450 mitochondriën per cel werd waargenomen, een aantal dat daarna voortdurend stijgt. Geholpen door verdere technische vooruitgang publiceerden groepen met een zwaartepunt in Cambridge in 2018 voor de mens een nog gedetailleerder beeld: hun schatting kwam nu uit op een aantal van 200 tot 400 mito's per primordiale kiemcel cel. De onderzoekers zagen daarin

nieuwe mutaties ontstaan en in aantal toenemen, terwijl ze ook vaststelden dat er selectie tegen ongunstige mutaties plaats vindt. Beide bevindingen helpen bij het proberen te begrijpen van het vloeibare landschap van het doorgeven van de genetisch informatie van mitochondriën van moeder op nakomelingen.

Het meest wonderlijke blijft dat de kenmerkende mutaties in het mtDNA, die als vingerwijzer voor de evolutionaire geschiedenis van de mensheid dienen (zoek op “mitochondrial Eve”), in een enkele kopieer of reparatie gebeurtenis hun beslag moeten hebben gekregen. Daarna moeten de mtDNA varianten zich vermeerderd hebben tot een situatie van dominantie in menselijke populaties. Hiermee kan het migratiegedrag van individuen uit deze populatie en van hun nageslacht worden gevolgd. Waarschijnlijk speelt bij de opkomst of verdwijning van kenmerkende mtDNA varianten binnen populaties ook bevoorrechting bij de replicatie of selectieve vernietiging van bepaalde mitochondriën nog een rol.

Het aantal ernstige ziekten waarvan de veroorzakende mutatie exclusief in het mitochondriële DNA zit is niet heel groot. Deze ziekten kunnen letterlijk uit de lucht komen vallen. Na maar een paar generaties van “verrijking” van mitochondriën met de oorzakelijke mtDNA mutatie, totdat er een voldoende hoog niveau van heteroplasmie is verkregen (zie hiervoor), kunnen ze manifest worden.

Epigenetische aspecten van overerving

15.1 Inleiding

Een oude leerstelling in de biologie gaat over de scheiding tussen **fenotype** en **genotype**. Dit betekent dat het fenotype zich niet kan bemoeien met het genotype: de informatieoverdracht loopt altijd van genotype naar fenotype. Deze stelling staat bekend als de Weismann-barrière en stamt uit 1893. We weten al enige tijd dat deze stelling toch een te eenvoudig beeld schetst van hoe overerving kan verlopen. In dit hoofdstuk zal ik daarom een poging doen om nieuwe kennis hierover nader toe te lichten.

In de kwantitatieve genetica geldt de formule $P = G + E$. Er bestaan geen andere invloeden op het fenotype P dan (a) de volgens de wetten van Mendel segregerende en recombinerende **allelen** van het **genenpakket** (gesommeerd als G) en (b) omgevingsfactoren (verpakt in de term E ; je kunt de formule nog uitbreiden met de interactie tussen G en E , bekend als genotype-milieu interactie). Deze twee invloeden worden uitgedrukt als bijdragen aan afwijkingen van het gemiddelde (H6.1, fig 17). De rekenaars houden hierbij echter geen rekening met eventuele andere manieren om informatie van de ene naar de volgende generatie over te brengen. Ze worden hierin gesterkt door de toepasbaarheid, bijvoorbeeld bij selectie experimenten, van de formules uit de kwantitatieve genetica voor kenmerken die op vele genen berusten (H6). Deze benadering is verwant aan wat in de genetica wordt aangeduid met de “modern synthesis” (die overigens uit 1942 stamt).

Hieronder wordt in de simpelste vorm verstaan dat de ideeën van Darwin (het belang van natuurlijke selectie) werden gecombineerd met de wetten van Mendel (waarmee wordt uitgelegd hoe genetische (allele) variatie binnen ouders tot uitdrukking komt in het nageslacht, H5.3).

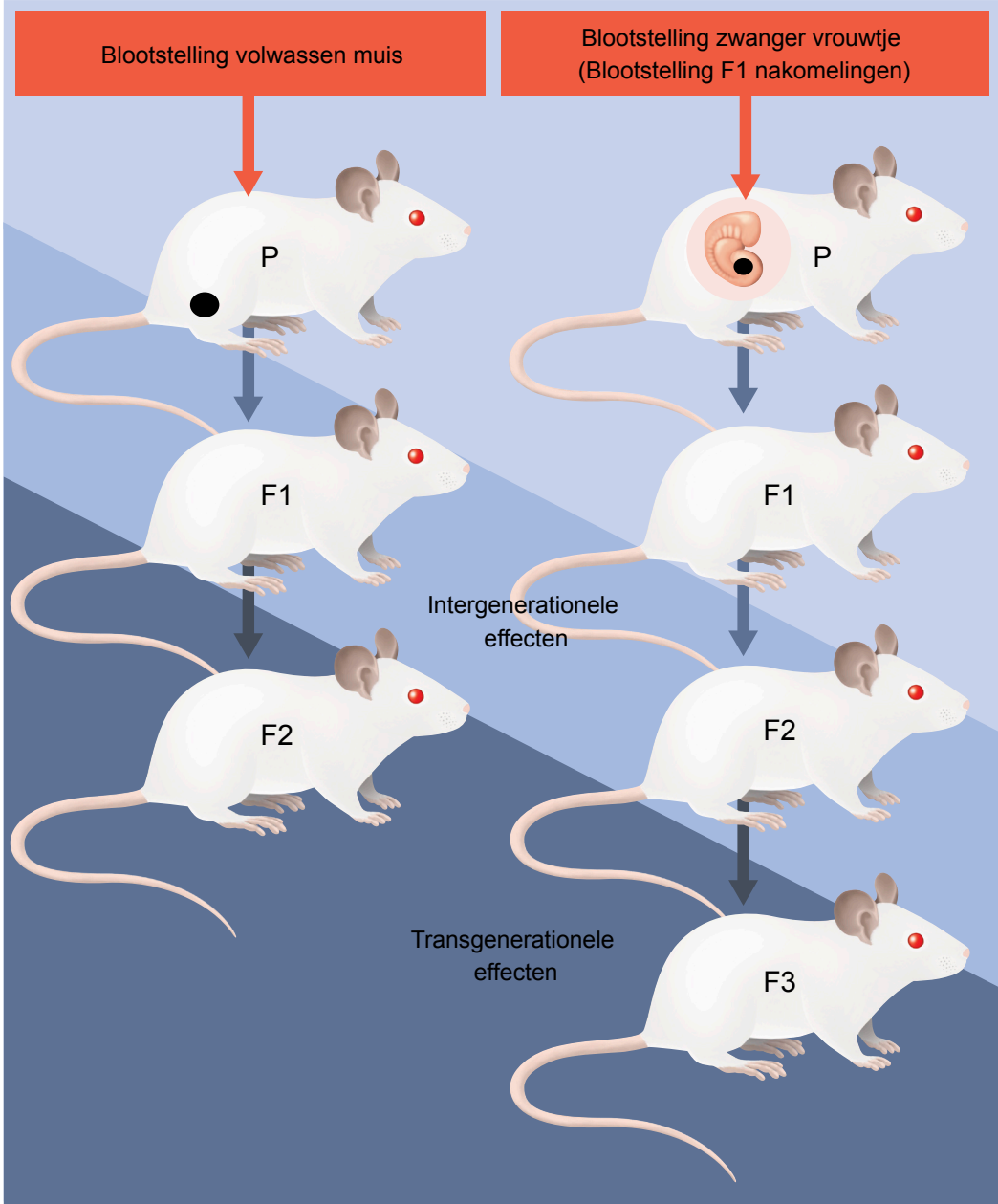


FIG 44

De P (van “parental”) is de “behandelde” generatie. Bij volwassen mannetjes gaat het om de blootstelling van de bij de **spermatogenese** (zwart) betrokken cellen, bij volwassen vrouwtjes over de **oogenese** in de follikels (idem). Wanneer het vrouwtje drachtig is gaat het bij deze proeven om de blootstelling van de **primordiale kiemcellen** tot en met de geslachtsdifferentiatie van de vroege gonade (H8, zwart). Bij een intergeneratieel effect heeft de **kiembaan** van de oudergeneratie (P) de stressor “gezien” (*i.e.* is bestraald of chemische behandeld). Bij een transgeneratieel effect heeft de kiembaan in de generatie later de directe invloed van stress niet meer ondervonden. Generatie P wordt ook wel F0 genoemd.

De genetische variatie die er tussen individuen bestaat is er een onderdeel van. Het impliceert ook dat het genotype interacteert met de omgeving om tot de fenotypische variatie te komen. Bij natuurlijke selectie selecteer je niet op **DNA** parameters maar op fenotypen. Hoe beter het fenotype het genotype voorspelt, hoe effectiever die selectie is. Maar dat opbouwen van genetische variatie, het ontstaan van nieuwe allelen, gaat langzaam (tabel 3). Dat houdt ook in dat wanneer de omstandigheden zich snel wijzigen, het voor organismen met een wat langer **generatie interval** niet mee zal vallen om via natuurlijke selectie (vlg. Darwin) zich aan de nieuwe omstandigheden aan te passen. Dit klemt des te meer wanneer de populatie klein en/of opgesplitst is. Experimenten met allerlei levensvormen (bijvoorbeeld het veel in het genetisch onderzoek gebruikte aaltje *Caenorhabditis elegans*) leverden het bewijs dat er additionele manieren zijn om informatie naar het nageslacht over te brengen, namelijk via het **chromatine** van de **gameten** en/of middels het “gebruiksrecept” van dat chromatine. Men heeft het dan over **epigenetische** intergeneratiele, of wanneer het meer dan één generatie aanhoudt, transgeneratiele overerving (fig 44). Vooral Eva Jablonka van de Tel Aviv Universiteit spant zich al jarenlang in om dit gedachtengoed te verspreiden. In haar publicaties geeft ze er bij allerlei vormen van leven voorbeelden van.

Een dergelijke wijze van overerving staat bekend als “soft inheritance”, en is mechanistisch dus volkomen anders dan de op de DNA basenvolgorde gebaseerde “hard inheritance”. Bij “soft inheritance” bestaat er geen uitsplitsing à la Mendel, maar is er wel sprake van een verschuiving van de fenotypische variatie in het nageslacht in een bepaalde richting, namelijk die van de

ouder. Ook kan het effect binnen enkele generaties weer worden teruggedraaid, het ebt weg en is dus reversibel. Omdat bij rat en muis (meestal inteeltlijnen) in deze experimenten bijzondere en vaak wat extremere milieuomstandigheden worden gebruikt, lijken deze dieren wel speciaal gevoelig te zijn voor “soft inheritance”. Schijnbaar bevestigt dit de oude ideeën over erfelijkheid die naar voren werden gebracht door de Franse bioloog Jean-Baptiste de Lamarck. Deze stelde, voordat Darwin zijn theorie van natuurlijke selectie publiceerde, dat kenmerken die tijdens het leven door de invloed van het milieu worden verworven overerfbaar zijn. Op die manier zou een bodybuilder extra gespierd nageslacht kunnen krijgen.

Dit gedachtengoed, waarmee feitelijk een draai van “nature” naar “nurture” wordt gemaakt, werd onder het Stalin regime in de Sovjet Unie door de bioloog Trofim Lysenko omgezet in een communistische ideologie, waarbij het bestaan van genen feitelijk werd ontkent. Alleen omgevingsfactoren werden nog erkend als bepalend voor de eigenschappen van plant en dier. De op deze waanideeën afgestemde pogingen om de voedselproductie in de Sovjet Unie te moderniseren door aanpassingen in de groei van gewassen, was één van de factoren die leidde tot een ongekende voedselcrisis en tot de dood van miljoenen inwoners. Wie weet is dat er wel mede de oorzaak van dat, zolang we niet meer weten over de mechanismen van epigenetische overerving, er in de literatuur en onder collega’s een wat zware sfeer over dit onderwerp kan hangen. Toch geven de resultaten bij proefdieren tot nu het onderwerp de wind in de rug. Dit komt vooral omdat de analysemogelijkheden van de methylatie van DNA (fig 11), **RNA** basenvolgordebepalingen en chromatine zo’n vlucht hebben genomen. Deze analysemogelijkheden, die steeds gevoeliger worden, kunnen bij de muis worden gecombineerd met (conditionele) **knockouts** en **knockins** (box 3) om achter de mechanismen van de epigenetische overerving te komen. Ook de milieu omstandigheden die zich lijken te lenen voor het vinden van epigenetische effecten in de overerving, zoals chemische verontreiniging, mentale stress en veranderingen in het dieet (en de daarbij horende fenotypen, zoals bijvoorbeeld obesitas), dragen bij aan de toegenomen belangstelling.

Ook nu kennen we niet alle details van de epigenetische verschijnselen die tussen de generaties spelen en blijven er meer dan genoeg vragen over. Hoe kan het recept voor chromatineveranderingen verankerd raken in de **kiembaan** van de volgende en opvolgende generatie? Toch zijn er bij muis en rat talloze aanwijzingen voor het bestaan van transgenerationale epigenetische overerving gevonden (fig 44).

15.2 Intergenerationele en transgenerationele epigenetische overerving bij proefdieren, de proefopzet

Het feit dat het embryonale chromatine in de kiembaan wordt “gereset” (H9, fig 23), eerst in de periode voor de implantatie, en dan nog een keer na het definiëren van de **primordiale kiemcellen**, werpt eigenlijk een wal op tegen een al te grote bemoeienis van het milieu met de “gebruiksaanwijzing” van het chromatine van de gameten (na te zijn doorgegeven aan de volgende generatie).

Toch zijn er experimentele benaderingen mogelijk waarmee epigenetische overerving geïnduceerd en bestudeerd kan worden. Vaak staat proefdiergebruik hierbij centraal en heeft het ontstaan van een patroon van epigenetische overerving in b.v. muis, rat of modelorganismen zoals de worm *C. elegans* of de vlieg *Drosophila* te maken met het uitoefenen van stress op de kiembaan. Om het label epigenetisch (en niet het label **mutatie**) opgedrukt te krijgen moet je er zeker van zijn dat het kiembaanstadium, en dus de cel waaruit het te bestuderen individu ontstaat, niet direct met de stressor in aanraking is geweest (fig 44). Vindt de behandeling plaats tijdens het embryonale stadium en is de moeder de F0 (of P van “parental”), dan heb je pas in de F3 bewijs voor een transgenerationeel epigenetisch effect. Behandel je de kiembaan van een volwassen dier, dan zie je dit effect al in de F2 (fig 44).

15.2.1 Eerste effecten in “outbred” ratten

Sinds 2005 wordt er door een Amerikaanse groep die met “outbred” ratten werkt, in een gestage reeks van publicaties aan dit thema gewerkt. Drachtige vrouwtjes worden behandeld in de embryonale periode tussen dag 8 en dag 14. Proeven gaan vaak door tot in de F4 (fig 44). De uitlees betraf in eerste instantie de algehele pathologie, en meestal werd de mannelijke kiembaan gevolgd. De stressoren, die een transgenerationeel epigenetisch effect opleveren, zitten vaak in de hoek van de endocrine beïnvloeding. Met bijvoorbeeld vinclozoline, een fungicide (en “**endocrine disruptor**”, H12.10) als “founding father” van dit type onderzoek, maar ook met BPA (ook een “endocrine disruptor”, H11.4.3, H12.10), en weekmakers in plastic (phthalaten, idem). Maar ook met een serie andere chemicaliën en behandelingen (voeding, stress) is dit transgenerationele en waarschijnlijk epigenetische effect dus op te wekken. Kortgeleden in 2019 is glyfosaat (“roundup”, een herbicide) ook op deze manier in de wetenschappelijke literatuur terecht gekomen. Een belangrijke variabele is de periode in de ontwikkeling van de kiembaan

waarin de stress wordt toegediend. Het lijkt erop dat de perioden die te maken hebben met het veranderen inclusief het “resetten” van het chromatine (H9, fig 23) het meest stressgevoelig zijn.

15.2.2 Het eerste muismodel: agouti yellow A^{vy}

Het eerste muismodel voor de detectie van transgenerationale epigenetische effecten is drager van een speciaal **dominant** allel voor het gen dat zorgt voor de wildtype kleur van de vacht (fig 45). Dit gen met de mooie naam agouti zorgt ervoor dat een muis muisgrijs is en een konijn konijngrijs. Ze zijn bijna altijd **homozygoot** voor het wildtype allel A . Het meest bekende andere allel heeft het symbool a . Dit **recessieve** allel zorgt voor een zwarte vacht. Vroeger zag je zwarte a/a konijnen gewoon in het bos en hopelijk komen ze nog wel in het wild voor. In 1962 werd er een nieuw dominant allel beschreven met de naam A^{vy} waarbij vy staat voor “viable yellow”. Dit allel ontstond door de actie van een **retrotransposon** dat via een RNA tussenstap net voor het **promotorgebied** van het A locus belandde (H2.3.3). Dit type retrotransposon, dat oorspronkelijk van virale oorsprong is, kan via een erin aanwezige DNA volgorde met een eigen promotoractiviteit, de regulatie van een nabijgelegen gen overnemen en dus anders dan normaal aansturen. Dit verklaart de omslag van de vachtkleur naar geel (fig 45). De retrotransposon insertie voorin het A locus dankt zijn promotoractiviteit aan een verdichting van CpG motieven in de DNA basenvolgorde, iets wat in veel promotorgebieden voorkomt en vaak hun “sterkte” beïnvloedt (H2.3.3).

Wanneer je in de vacht blaast van een grijze muis of konijn zie je van binnen naar buiten de kenmerkende ringachtige zones, van zwart naar geel en dan nog een zwart puntje: iedere haar heeft deze drie zones. Bij A^{vy} komt het zwart niet tot expressie. Het genotype van de “uitleesmuis” bij experimenten voor het ontrafelen van de “zachte kant” van overervingspatronen, die zich als het ware aan de blik van Mendel onttrekken, is A^{vy}/a (fig 45). Dit genotype is ingebracht in een inteeltlijn: je wilt immers zo weinig mogelijk storende genetische variatie die zou kunnen verhullen waar je naar op zoek bent. Vanuit het laboratorium van Emma Whitelaw in Brisbane Australië is de “gebruikswaarde” voor epigenetisch onderzoek van de A^{vy}/a muizenlijn in 1999 voor het eerst beschreven. Het is namelijk niet zo dat door het dominante A^{vy} nu iedere draager ervan geel is. De vachtkleur varieert van geel tot bijna niet van wildtype te onderscheiden agouti-grijs. Voor de statistische analyse worden er drie fenotypen gedefinieerd: geel, meer gespikkeld (“mottled”) en pseudo-agouti (fig 45). Vaders van elke soort produceren jongen met hetzelfde spectrum aan kleurschakeringen. Maar voor de moeders lag dat anders. Weliswaar

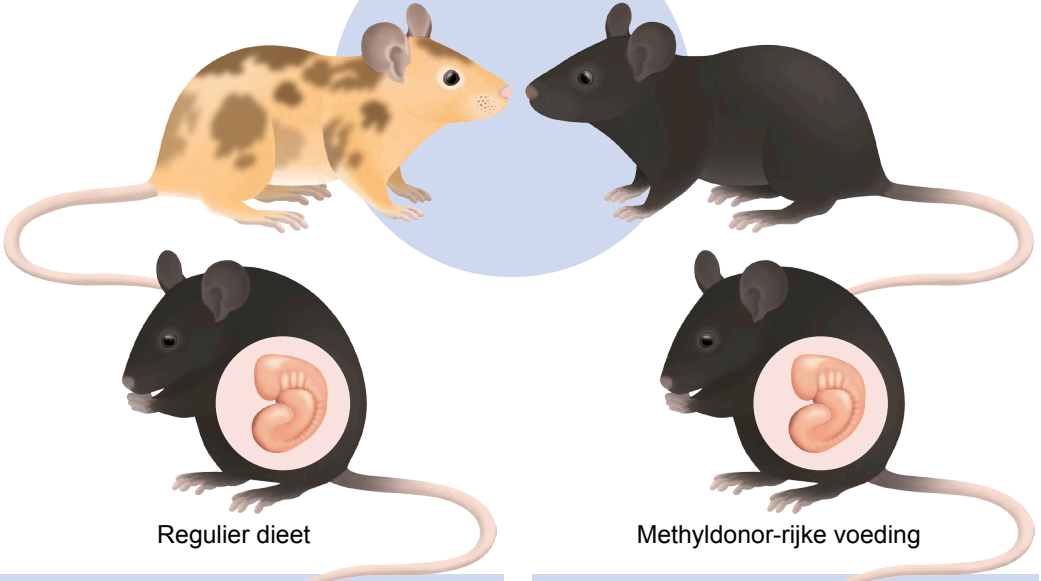
produceerde iedere moeder nog alle varianten, maar bij de grijze moeders tenderde dat meer naar grijs en bij de gele moeders meer naar geel. Bovendien erft deze tendens via de moeder over en dat is via de vader niet het geval. Waarom niet is onduidelijk.

Al snel bleek dat de vachtkleur te maken had met de methylatiegraad van het CpG rijke promotordeel van het retrotransposon. Bij zwaardere methylatie stond de promotor van dit stuk DNA uit en nam de nog intact zijnde promotor van het *A* allel de regulatie van expressie over (fig 11, 45). Dit leidde tot nakomelingen met een grijze vacht. Bij lichte methylatie is de “retrovirale” promotor dominant actief en zijn de muizen geel. Bij situaties waarin zowel deze retrovirale als ook de natuurlijke promotor in verschillende cellen werkzaam zijn, is een variabele uitkomst mogelijk en lijken de muizen grof gespikkeld (fig 45). De lokale chromatine structuurveranderingen die door de daar aanwezige histon code (H2.3.2, tabel 1) wordt gekenmerkt, zullen samen met de graad van methylatie op de CpG motieven in ieder van deze promotors uiteindelijk beslissen wat het expressieniveau van het *A* gen gaat worden. De mate van overactivatie van *agouti* in het *A^{vy}* allel kan dus variëren tussen de cellen in de haarzakjes van de muis. Het **mozaïeke** patroon van genexpressie over de vacht, dat kenmerkend is voor het gespikkelde (“mottled”) fenotype doet denken aan de uitkomst van X-inactivatie (box 4).

Maar waarom is het *A^{vy}* retrotransposon nog zo “wankelmoedig” m.b.t. z'n effect op de expressie van nabije genen? Eerder (H2.3.3, H9, H11.1, H12.5.2.) is aan bod gekomen dat vanaf de evolutionaire tijden, waarin door retrotransposons het bouwplan van het chromatine/DNA verder werd ontwikkeld, er ook een defensieapparaat moest worden opgetuigd om hun genetische activiteit onder de duim te krijgen. Dit was nodig om het geheel niet aan instabiliteit ten onder te laten gaan. Het *A^{vy}* retrotransposon dat het *agouti* locus “kaapte” is naar evolutionaire maatstaven gemeten nog betrekkelijk jong. Daardoor heeft het defensieapparaat van de cel kennelijk nog niet voldoende kansen gehad de nieuwe integratiepositie stabiel te inactiveren. Dit heeft tot gevolg dat ergens in de kiembaan van de moeder en/of in het jonge embryo, het chromatine rond het retrotransposon gebied niet volledig wordt “gereset” (H9). In de literatuur worden allelen waarvan de expressie via een epigenetisch mechaniek kan variëren wel aangeduid onder de term “metastable epialleles”.

Het *A^{vy}* systeem is gebruikt om omgevingsfactoren te testen op hun vermogen om, wanneer tijdens de dracht toegepast, het kleurenpalet onder de jongen te doen verschuiven (fig 45). Als eerste werd een dieet getest, dat de beschikbaarheid van methylgroepen vergroot (DNA methylatie, fig 11; histonmethylatie, H2.3.2, tabel 1, fig 8). Dit dieet bevat extra foliumzuur, vitamine B12,

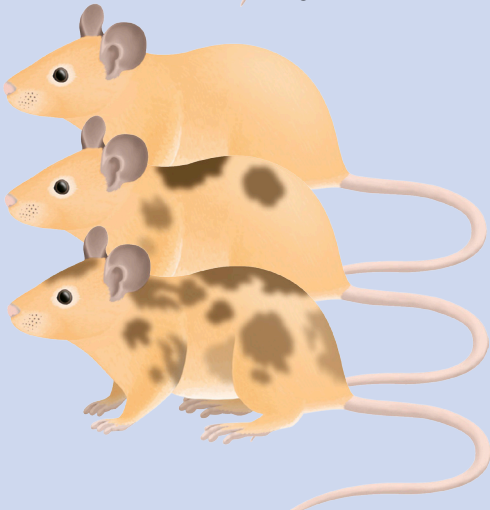
$A^{vy}/a \text{ ♂} \times a/a \text{ ♀}$



Regulier dieet

Methyl donor-rijke voeding

A^{vy}/a nakomelingen

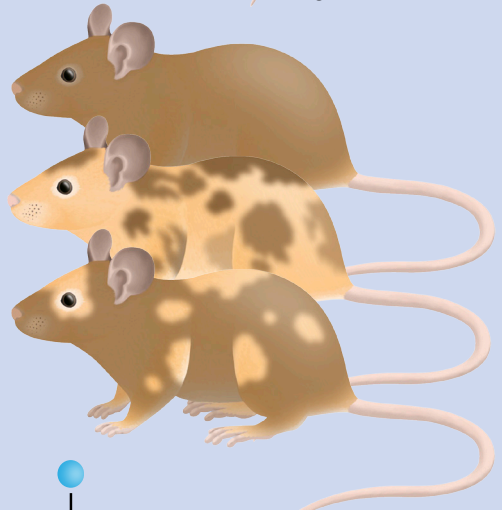


IAP

agouti

Verstoorde regulatie van het agouti gen en overproductie van het eiwit

A^{vy}/a nakomelingen



IAP

agouti

Methylatie van retrotransposon herstelt de normale expressie van agouti

FIG 45

De effecten van een methylgroep bevorderend dieet van de moeder op het nageslacht. IAP staat voor “intracisternal A particle”, een **retrotransposon** dat evolutionair nog niet helemaal functioneel oftewel neutraal is en een **promotor** functie kan hebben. Bij deze proef komt het A “viable yellow” (A^{vy}) **allel** van de vader die **heterozygoot** is. De moeder is **homozygoot** a/a en dus zwart. Alleen de nakomelingen die van de vader het **dominante** A^{vy} hebben geërfd worden getoond. De door de voeding van de moeder tijdens de dracht veroorzaakte variatie in de beschikbaarheid van methyl donors wordt zichtbaar als een verandering in het spectrum aan kleurvarianten. Verlaagde niveaus van CpG methylatie (fig 11) van het retrotransposon maakt deze min of meer actief hetgeen de regulatie van het agouti **gen** verstoort. De promotoractiviteit die het transcriptieniveau van het A^{vy} agouti allel bepaalt is verhoogd en dit leidt tot overproductie van de agouti genproducten (eerst RNA, dan eiwit). In de normale situatie komt het geel maar tijdelijk tot expressie, en vormt zich het gele bandje in de haren van de wildtype vacht. Hoe actiever het A^{vy} allel is, hoe geler de jongen zijn en hoe minder gemethyleerd deze promotor is (waardoor de promotor van het A allel (wildtype agouti) overstemd wordt). Het effect is een generatie later nog zichtbaar, waarschijnlijk omdat de **kiemcellen** voor het genereren van deze generatie al in de aan de variabele voeding onderhevige **embryo's** aanwezig zijn (er is sprake van een intergeneratieel effect, zie fig 44).

choline en betaine. Wanneer de moeder (de F0) rond de dracht (en tenminste van dag 8 tot dag 15) hiermee werd gevoerd, werden de muizenkinderen (de F1) gemiddeld donkerder (fig 45). Het effect hield aan tot in de F2, waarschijnlijk omdat de **kiemcellen** voor die generatie zich tijdens de dieetperiode al in de gevoelige fase van chromatine verandering bevonden (fig 45). Wanneer m.b.v. eenzelfde protocol getest werd op het effect van het pseudo-oestrogen BPA, werden de muizen lichter. Maar wanneer genisteïne, de oestrogeenachtige stof uit soja, werd toegediend werden de muizen donkerder. De moleculaire achtergronden van deze verschillende effecten zijn niet bekend. Hoe relatief helder het beeld van de gemethyleerde retrovirale CpGs ook lijkt, daarmee kan de overdracht van het fenotype naar de volgende generatie niet worden verklaard. In de eicellen wordt deze methylatie ruwweg bewaard, maar in de **blastocysten** is ze vertrokken (H9, fig 23) om daarna weer terug te komen.

15.2.3 Een rol voor kleine stukjes RNA (sncRNA) in de transgenerationale overerving.

Uit het voorgaande blijkt dat CpG methylatie de overdracht van de activiteit van de A^{vy} promotor niet kan verklaren, hoe aantrekkelijk dat idee ook is. Uit de recentere literatuur blijkt dat ook heel andere mechanismen een rol kunnen spelen. De eerste publicatie die bij de muis een licht wierp op de rol van sncRNA kwam uit in 2006 maar werd daarna een beetje vreemd bekeken omdat het zo revolutionair was. Het *Kit* gen (coderend voor een zogenaamde tyrosine **kinase** receptor) speelt een rol bij signaaloverdracht van buiten de cel naar binnen. Op deze manier is het betrokken bij vele functies. Wanneer er maar één **locus** actief is verschijnt er een fenotype waarvan een bepaald aspect er hiertoe doet: bij een overigens grijze muis zijn de voetjes en het topje van de staart wit. In het onderzoek van de groep van Mino Rassoulzadegan uit Nice werd gebruik gemaakt van een transgeen muizenmodel, waarin één *Kit* allel buiten werking was gesteld door een stukje bacterieel DNA met behulp van genetische manipulatie aan het begin van het gen te plaatsen (zie box 3). In deze muizen werd van dit allel een (te) lang **mRNA** gemaakt dat weliswaar ook de basenvolgorde van het Kit eiwit bevatte, maar dit mRNA werd niet vertaald. Net als bij muizen met maar 1 *Kit* allel hadden ook deze muizen witte sokjes en een witte staartpunt. Wanneer deze transgene muizen werden teruggekruist op normale wildtype muizen, en de mutatie werd doorgegeven, had een groot deel van de nakomelingen zoals verwacht weer witte sokjes en een witte staartpunt. Maar dat gebeurde, zij het in wat mindere mate ook wanneer de mutatie niet werd doorgegeven en de betreffende ouder (die zowel man als vrouw kon zijn) twee normale *Kit* allelen hadden. Na een aantal generaties terugkruisen waren de witte voeten en staartpunt verdwenen, via de mannelijke lijn wat sneller dan via de vrouwelijke.

Uiteindelijk richtte het onderzoek zich op de spermatogenese van mannetjes die drager waren van het abnormale *Kit* allel. In de zaadcellen vonden ze een sterk verhoogde hoeveelheid *Kit* RNA. In een vervolgstap ontdekten ze dat twee afvalproducten van dit RNA, na injectie in de **zygote**, al leidden tot het fenotype (de witte staartpunt en sokjes). Deze kleine stukjes RNA werden geïdentificeerd als miRNAs. Ze hebben een typerende korte lengte van 19-23 bp. Van deze klasse van RNAs zijn er vele, ze horen bij de “small non coding RNAs” (sncRNAs) waartoe ook de piRNAs van 26-32 bp horen (H12.5.2). De normale biologische rol van deze kleine RNA moleculen is dat ze d.m.v. basepaarhomologie binden aan een doel-mRNA molecuul (de “target”) en deze daarmee labelen voor afbraak. Het bijzondere van de ontdekking van de *Kit* specifieke miRNAs is dat ze, wanneer ze bij de bevruchting in de zygote zijn ingebracht, de werking van een *Kit* gen gedurende de hele ontwikkeling en voor de rest van het leven kunnen dwars-

bomen. Dit principe kan dan ook weer naar de erop volgende generatie worden doorgegeven, maar uiteindelijk wel met een verdunneffect. Er is hier sprake van een transgenerationeel effect (fig 44).

Na deze eerste publicatie over kleine RNA moleculen, die als een soort van overdraagbare regelfactor tussen de generaties fungeren volgden er meer. Een recenter voorbeeld, gepubliceerd door een onderzoeksgroep van Isabelle Mansuy uit Zürich (2014), betreft epigenetische effecten die veroorzaakt worden door geestelijk ongerief, angst en trauma. Jonge muizen werden na de geboorte, maar voordat ze op de gebruikelijke leeftijd van drie weken bij de moeder vandaan werden gehaald, gestrest door ze weg te halen bij de moeder in combinatie met het plagen van de moeder zelf. Het onderwerpen van proefdieren aan deze vorm van stress is een standaardprotocol in het neurologisch hersenonderzoek. Het onderzoek concentreerde zich op zowel de “getraumatiseerde” mannelijke nakomelingen (de F1) en tevens op hun zoons (de F2). De mannetjes van beide generaties bleken door de mand te vallen in allerlei standaard testen voor depressie en angst. We hebben dan te maken met intergenerationele epigenetische effecten. M.b.v. verder moleculair onderzoek werden in het sperma van de in hun jeugd belaste mannelijke nakomelingen specifieke sncRNA moleculen (miRNAs en piRNAs) aangetroffen die er normaal niet zijn. Wanneer RNA na isolatie en zuivering uit het sperma van deze mannetjes d.m.v. micro-injectie werden ingespoten in de mannelijke pronucleus (fig 42) van controle zygoten, waren de nakomelingen getraumatiseerd. Ook dit wijst op een rol van sncRNA moleculen in de transmissie van het gedragsfenotype.

Angst en depressie worden vaak in één adem genoemd. In gedegen recent onderzoek uit China (2021) werd gebruik gemaakt van een standaard chronisch “milde stress” protocol (lawaaï, licht en het omdraaien van de dag en de nacht, dat 5 weken lang dagelijks op een onvoorspelbare manier werd uitgevoerd). Daarna werd nagegaan of het depressie fenotype dat bij mannelijke muizen werd geïnduceerd, kon worden overgedragen op het nageslacht. Dat bleek inderdaad het geval maar daar stopte de transmissie: een intergenerationeel effect. De onderzoekers konden bewijs leveren voor de betrokkenheid van miRNA's in de zaadcel bij dit effect.

Deze observaties ondersteunen dat bepaalde kleine RNA moleculen, die met de zaadcel mee komen, kandideren voor een mechanisme van epigenetische informatieoverdracht. Hier volgt er nog een laatste voorbeeld. In 2012 werd ontdekt dat de zaadcel van de muis rijk is aan een speciale klasse van tRNA moleculen (fig 9) en wel een verkorte vorm ervan tsRNA genoemd (30-40 basen). Wanneer deze fractie, die dan afkomstig is van mannetjes die gevoerd zijn met een dieet dat veel vet bevat, in de zygote wordt geïnjecteerd, wordt de metabole verstoring waar

de vader aan lijdt doorgegeven. Nog intrigerender is de observatie uit 2018, dat de effectiviteit hiervan afhangt van een enzym dat specifiek een methylgroep op tRNA plaatst. De precieze moleculaire details van de informatie overdracht naar de volgende generatie, worden echter tot op heden niet goed begrepen. Er verschijnen zelfs al overzichten over de sperma RNA code, waarin gespeculeerd wordt over de inter- en transgenerationele effecten van sncRNAs afkomstig uit sperma op de embryonale ontwikkeling. Naast de tsRNAs wordt ook rsRNA (aan ribosomaal RNA verwante moleculen) (box 1, fig 9), als een eventueel boodschappermolecule genoemd. Ook zaadcellen van de mens zijn rijk aan dergelijke klassen van kleine RNAs, er worden vergelijkbare patronen van tsRNA moleculen gevonden. Ze blijken te reageren op het dieet, in dit geval een week veel suiker eten. Deze Zweedse onderzoeksgroep (2019) ontdekte en passant dat kleine tRNA moleculen van mitochondriële oorsprong ook op het dieet reageren, en zo biedt nog een laag van potentiële informatieoverdracht van de zaadcel naar het embryo zich aan. Het zal niet lang meer duren voordat deze micro RNA moleculen in een onderzoek setting een onderdeel van een spermabeoordeling zijn.

15.2.4 Spelen histonen een rol in de epigenetische overerving?

Het meest doorwrochte onderzoek over de betrokkenheid van **post translationele modificatie (PTM)** van **histonen** bij epigenetische overerving, is uitgevoerd in een samenwerking tussen de medische faculteit van de McGill Universiteit in Montreal en het Friedrich Miescher Instituut (FMI) in Bazel. Het werk was geënt op een bekende proef met het aaltje *C. elegans*, waarbij een genetische ingreep in een gen betrokken bij het post translationeel modificeren van een histon H3 op positie K4 (H3K4, tabel 1, fig 8), leidde tot een epigenetisch transgenerationeel effect (fig 44). Het door dit gen gecodeerde eiwit herkent H3K4me2 en verwijdert methylgroepen (het is een demethylase). De onderzoekers richtten zich vervolgens op de situatie bij de muis en gebruikten hiervoor het **orthologe** demethylase gen van de mens. Het gen (een lysine demethylase, *KDM1A* genoemd) werd eerst voorzien van een promotor die alleen tijdens de spermatogenese kan werken. Daarna werd dit construct in de mannelijke pronucleus van de zygote (box 3, fig 42) gespoten. Dit leidde tot de geboorte van **transgene** muizen met een genomisch geïntegreerd construct (de P (F0) van fig 44) waarvan de mannetjes verder in het onderzoek werden gebruikt. Het eigen muis specifieke H3K4me2 (lysine) demethylase is tijdens de spermatogenese gewoon actief. Zoals bij dit soort proeven gebruikelijk, werden meerdere generaties, tot aan de F4, via de vaderlijn gevolgd en waren deze niet meer transgeen. Tot in de F3 werden skeletafwijkingen

en extra sterfte gezien (fig 44). Natuurlijk hebben de onderzoekers geprobeerd in de zaadcellen een verklaring te vinden voor deze grote effecten. In zaadcellen van de muis is rond 1% van het genomische DNA rond nucleosomen gewonden (H12.6, fig 8, 32). Eerder vonden de onderzoekers een associatie van dit nucleosomale DNA met de promotor gebieden van genen die onder andere met de embryonale ontwikkeling te maken hebben. Deze genen zijn dus met histonen geassocieerd en zijn in hun promotor gebied gemiddeld ook rijk aan CpGs (H2.3.3).

Ondanks de algemeen hoge methylatiegraad van het DNA in zaadcellen (H9, fig 23) zijn deze CpG rijke promotor gebieden veelal niet of laag gemethyleerd (fig 11). Samen met het gemethyleerde H3K4 (me2 en 3) zijn dit indicatoren voor een open stand van het chromatine in de promotor, waardoor het gen kan worden aangezet (tabel 1). Dit alles duidt op een “voorbereid zijn” van deze genen op expressie tijdens de aanstaande embryonale ontwikkeling. Onderzoeker Antoine Peters (FMI, Bazel) schat dat door de interventie van het humane transgene H3K4me2 demethylase er in minstens 2300 genen een verandering in de chromatinestructuur van de promotor in deze groep van genen is opgetreden. Maar een direct effect op de graad van CpG methylatie van deze promotor gebieden werd niet gevonden. Toch is dit nog geen bewijs voor een directe betrokkenheid van histonen bij de transgenerationale transmissie die deze proef laat zien. We weten nu, dat de effecten van een eenmalige verandering in de chromatineregulatie tijdens de spermatogenese nog generaties lang kunnen aanhouden, met fenotypische gevolgen tot in de F3 als resultaat. Maar een inzicht in de moleculaire mechanismen die hierachter schuil gaan levert dit gedetailleerde onderzoek niet op.

15.2.5 Een onverwachte interactie in de zygote tussen de eicel en de zaadcel

In het voorgaande (H15.2.3) is er een voorbeeld langs gekomen van een verstoring van het metabolisme van het nageslacht door de invloed van het dieet van de ouder, hier de vader. De tsRNA moleculen in de zaadcel speelden daarbij een rol. Studies die dit zonder een idee van een epigenetisch mechaniek aantoonde, stammen voor rat en muis uit 2010. De wetenschappelijke belangstelling voor obesitas is sterk gegroeid. Natuurlijk wordt obesitas in verband gebracht met een veranderend voedingspatroon, maar kan een epigenetisch intergenerationeel mechanisme ook een rol spelen? Deze gedachte wordt aannemelijker omdat obesitas ook bij kinderen sterk toeneemt.

Recentelijk is er een studie naar epigenetische overdraagbaarheid, dit keer van een hoog bloedsuiker gehalte, gepubliceerd, die weer een heel ander licht werpt op de waaier aan

mechanismen, die hierbij een rol kunnen spelen. Dit onderzoek begon met de vaststelling dat bij vrouwelijke muizen met een hoog gehalte aan suiker in het bloed, de rijping van de eicellen voor de ovulatie niet helemaal normaal verloopt.

Dit lieten de onderzoekers zien aan de hand van het enzym TET3. Dit enzym zorgt ervoor dat het paternale DNA in de zygote wordt gedemethyleerd (H9, fig 23). Wanneer dit enzym in de zygote niet actief genoeg is beïnvloedt dit het demethylatie proces en dat heeft weer gevolgen voor de activiteit van paternale allelen in het nageslacht. Op deze manier waren een aantal genen, die effect hebben op de secretie van insuline door de alveesklier, in hun werking aangetast: het te hoge methylatieniveau remde de activiteit. In de nakomelingen leidde dit tot een lagere secretie van insuline en een lagere glucose tolerantie, voorstadia van diabetes. Dit is een voorbeeld van een publicatie, waarvoor de onderzoekers (uit Hangzhou en Shanghai) een grote hoeveelheid werk hebben moeten verzetten. De eventueel aanzienlijke maatschappelijke betekenis leidde tot een publicatie in *Nature* (2022).

15.2.5 Meer muismodellen, angst, reuk en ziekte

In de volgende proef wordt nog een voorbeeld gegeven van hoe bijzonder de transgenerationale epigenetische overerving bij muizen is. Bij zoogdieren zitten hoog in de neus de receptoren waarmee we geurmoleculen kunnen herkennen (MOE, het “main olfactory epithelium”). De vele verschillende eiwitreceptoren die voor het reukvermogen verantwoordelijk zijn worden gecodeerd door een uitgebreide serie genen, die bekend staan onder de gemeenschappelijke naam *Olf*. De receptor uit deze genfamilie, die gecodeerd wordt door het *Olf151* gen, is in staat om de stof acetophenone waar te nemen. Dit stofje komt in allerlei natuurlijke voedingsmiddelen voor, in kaas, vlees, abrikoos en bloemkool. In 2014 werd door een groep uit Atlanta, Georgia USA, onderzoek met volwassen mannetjesmuizen gepubliceerd, waarin het volgende protocol werd gebruikt. De geursensatie van acetophenone werd gekoppeld aan straf in de vorm van een irriterend geluid. De dieren werden op deze wijze “Pavloviaans” geconditioneerd, *i.e.* ze raakten al gestrest door alleen maar te ruiken. Vervolgens werd er met inzet van een IVF stap een fokprogramma in de mannelijke lijn opgestart. Na het testen van dieren uit verschillende generaties bleek dat de stressrespons die in de eerste generatie van dieren getriggerd werd door acetophenone geur, in de twee opvolgende generaties aanhield: in de zoons en kleinzons, die nooit met het vervelende geluid waren geconfronteerd (fig 44). De onderzoekers keken vervolgens naar de CpG methylatie van DNA van het *Olf151* gen in de zaadcellen van de belaste generatie

en hun zoons. Ze zagen een verlies van gemethyleerde CpGs. Maar keken ze in het reukepitheel naar het DNA van hetzelfde gen, dan was er in zoons en kleinzoons niets afwijkends meer te zien. Weer een voorbeeld van de raadsels die er in dit gebied nog volop leven.

De overstap van stress naar ziekte is niet groot. Een chronische toxoplasmose infectie van mannelijke muizen verlaagt de sperma productie in combinatie met een verslechtering van de morfologie. Bij het produceren van twee opvolgende generaties, werk uit 2020, viel op dat de nakomelingen in de mannelijke lijn een afwijkende uitslag lieten zien in een aantal standaard gedragstesten. Bij het zoeken naar een verklaring in het sperma van de belaste vaders stuitten de onderzoekers ook op de sncRNA populatie als een mogelijke oorzaak van het transgeneratiele effect.

Als laatste een nog recenter voorbeeld. Deze studie koppelt het doormaken van een sublethale infectie, door intraveneus spuiten van de schimmel *Candida* bij de vader, aan een verhoging van de alertheid bij een acute immuunrespons in de volgende generatie en de generatie daarna, de mannelijke lijn volgend. Daarna doofde de verhoogde immuunrespons uit. In het **methyloom** van het sperma van de belaste vader werden veranderingen gevonden. Een deel hiervan kon gekoppeld worden aan genen betrokken bij de immuunrespons. Dit is een suggestie van een directe relatie tussen de methylatiestatus van genen in de zaadcel en het functioneren van het immuunsysteem in de volgende generatie (waar deze genen bij betrokken zijn), maar een direct bewijs daarvoor is het nog niet.

15.3 Stress gerelateerde epigenetische verschijnselen bij de mens

Hiervoor heb ik geprobeerd de ontwikkelingen in het onderzoek naar intergenerationele en transgenerationele epigenetische overerving bij proefdieren op hoofdlijnen te illustreren. De laatste jaren zijn er een aantal overzicht artikelen verschenen, met als vraag of er ook bij de mens duidelijke aanwijzingen zijn voor epigenetische overerfbare effecten (die niet op een verandering van de DNA basenvolgorde berusten). Vanwege het lange generatie interval is dit soort onderzoek bij de mens moeilijk. Als voorbereiding op deze vraag kun je kijken naar observaties binnen één generatie om te zien of stress gerelateerde somatische epigenetische variatie ook bij mensen voorkomt.

In 1995 verscheen in het British Medical Journal een artikel van JPM Barker over de relatie tussen ontoereikende omstandigheden tijdens de zwangerschap en gezondheidsrisico's op latere leeftijd. De in dit artikel uitgewerkte kennis is onder de naam "Barker hypothese" bekend

geworden en later met additionele studies aangevuld. De hypothese veronderstelt dat in het begin van de zwangerschap (de embryonale periode, van de bevruchting t/m de orgaanaanleg die compleet is in de 9^e week), de **transcriptie** activiteit van hiervoor gevoelige genen zich aanpast aan de mindere omstandigheden. Vervolgens raakt het niveau van genregulatie gefixeerd. Wanneer er dan later geen gebrek meer is, staat het **genoom** nog steeds afgesteld alsof er krapte is en dat leidt op latere leeftijd tot ziekten, waaronder welvaartsziekten, zoals hartziekte, verhoogde BMI (overgewicht) en diabetes type 2, maar ook schizofrenie wordt genoemd.

Een in dit opzicht bijzonder goed bestudeerde groep mensen bestaat uit een steekproef uit de Nederlandse populatie, die tussen december 1944 en mei 1945 in de hongerwinter zijn verwekt. Aan het eind van deze periode was er sprake van ernstige stress door voedselschaarste, omdat men iedere dag nog maar 500 kcal (25% van de normale dagelijkse inname) te eten had. Dit had als verwacht wel gevolgen voor de toekomstige gezondheid van in de hongerwinter verwekte kinderen. Dit uit zich als een afwijkend metabool profiel (verminderde glucose tolerantie, verhoogde BMI, verhoogd cholesterol). In een in 2014 verschenen studie werden binnen 24 gezinnen twee kinderen van het hetzelfde geslacht met elkaar vergeleken. Het ene kind was verwekt gedurende de hongerwinter, het andere buiten de dec 1944-mei 1945 periode. Om eventuele epigenetische veranderingen uit te lezen werd voor CpG methylatie gekozen (fig 11). Na DNA extractie uit witte bloedlichaampjes keken de onderzoekers naar meer dan 90 duizend regio's die gemiddeld een kleine 7 CpG dinucleotiden bevatten. Dit is een selectie uit het hele methyloom van de mens, dat natuurlijk veel groter is (29×10^6 CpGs). Van 181 chromosomale regio's werd vastgesteld dat er een verschil in methylatiegraad tussen de twee gezinsgenoten bestond. Omdat we nu het hele genoom in kaart hebben (H3.1) was verder onderzoek mogelijk. Je weet immers precies waar die regio's in het genomische DNA zitten en of daarmee een eventuele verandering in de activiteit van genen kan worden voorspeld of verklaard. Door de groep van onderzoekers, met Elmar Tobi als eerste en Bastiaan Heijmans als laatste auteur, werd voor 60% van deze "methylatieverschil-regio's" bij de in de hongerwinter verwekte volwassenen een verhoging van de CpG methylatiegraad gevonden en in 40% een verlaging. De genen waarbij deze veranderingen waren opgetreden hadden functies in de vroege ontwikkeling van het embryo, met name in groei en stofwisseling. De veranderingen hadden niet zozeer te maken met een CG rijke promotor (fig 11), maar met CG arme promotors en met CG motieven er verder vandaan, die bekend staan als "enhancers", ze beïnvloedden het niveau van de transcriptie. De "take home message" hieruit is dat wanneer het vroeg prenatale milieu extremer wordt, dat in de eerste generatie een blijvend effect heeft, af te lezen uit het methylatiepatroon van CpGs bij

en in genen. Jammer genoeg zijn deze “uitlezers” om privacy redenen niet gebruikt voor verder onderzoek in generaties volgend op de oorlogsgeneratie. Dit had belangwekkende gegevens op kunnen leveren over intergenerationele epigenetische overervingseffecten (fig 44) na voedselschaarste. Daar zijn overigens wel een paar aanwijzingen voor. Bij de nakomelingen van vaders (maar niet de moeders) met een prenatale geschiedenis uit de hongervinter werd een verhoogd BMI gevonden. De kinderen van vrouwen met een gelijke historie hadden later in het leven 1,8 maal zo vaak te maken met gezondheidsproblemen.

Vanwege het lange generatie interval bij de mens ben je voor indicaties van epigenetische overerving in belangrijke mate afhankelijk van langdurig epidemiologisch onderzoek. De eerste datasets die hiervoor in een uitgebreide studie werden gebruikt, stammen uit Överkalix, een dorp in Noord Zweden. De grootouders werden geboren in de tweede helft van de 19^e eeuw en de kleinkinderen in deze eeuw. Voor de grootouders zijn er oogstgegevens en voedselprijzen, waaruit is af te leiden of er overvloed of schaarste was (en hoeveel). Het hardste argument voor het bestaan van transgenerationele epigenetische overerving, dat uit deze studie naar voren kwam, was dat wanneer de grootvader tijdens een periode van voedselovervloed of voedseltekort een pre-adolescent was (met langzaam delende stamcel spermatogonia), dit het sterfterisico in de kleinzoons verhoogde. Niet alle bevindingen zijn daarna in een nog veel grotere tweede Zweedse studie uit 2018 bevestigd. Het effect van een voedseloverschot is wel overeind gebleven. Opvallend genoeg noemen de onderzoekers met name kanker als bijdragend aan de verkorte levensverwachting van de kleinzoons.

15.4 Van epigenetica naar genetica

In 2000 publiceerde Yuri Dubrova, werkzaam op het laboratorium van de bekende onderzoeker Alec Jeffreys te Leicester, UK (H2.3.3), een “korte mededeling” in Nature, waarin werd aangetoond dat ioniserende straling, naast de al bekende mutagene DNA-breuk en -reparatie effecten (H11.3, H12.7, H13.5.2), ook nog een ander overerfbaar effect op het genoom heeft. In deze studie was de aandacht gericht op de zogenaamde microsatelliet herhalingen in het DNA (H2.3.3, tabel 2). Hier ging het om de ongeveer 600 kopieën van het basismotief GGGCA in het genoom van de muis. De hoge spontane **mutatiefrequentie** van dergelijke “DNA repeats” wordt altijd geweten aan problemen die de DNA **replicatie** machinerie (fig 5) met herhalingen van een kort basenmotief heeft. Dit geldt bij dit soort repeats zowel voor de lichaamscellen (soma) als voor de cellen in de kiembaan. In de in Leicester uitgevoerde archetypische proef werden de

stamcel spermatogonia van F0 mannetjesmuizen bestraald met 0,5 Gy aan snelle neutronen, probate brekers van de DNA dubbele helix en, net als Röntgen straling, veroorzakers van een golf aan **vrije zuurstofradicalen**. Dit type straling veroorzaakt dus op brede schaal cellulaire stress. Analyse van het aantal kopieën van de GGGCA repeat liet zien dat in de kiembaan van F1 nakomelingen nieuwe mutaties waren ontstaan, de **mutatiefrequentie** verdubbelt ongeveer.

Opmerkelijk genoeg werden ook mutaties gevonden in het repeat locus dat afkomstig was van de moeder en dat dus geen enkele “herinnering” aan contact met de straling kon hebben. In de bestraalde F0 stamcel spermatogonia was kennelijk een reactie opgetreden die zich in de spermatogenese van de volgende F1 generatie genotypisch uitte als een verminderd vermogen om een nauwkeurige replicatie van repeat DNA uit te voeren. De bevindingen van Dubrova en Jeffreys tonen aan dat er niet altijd een scherpe scheiding is tussen genetische en epigenetische overerving. Vooralsnog blijft het volledig gissen naar het mechanisme dat in de kiembaan de herinnering aan cellulaire bestralingsstress vertaalt in een minder effectieve werking van de DNA replicatiemachinerie tot in de volgende generatie (het “DNA replicatie mutatie genotype”).

Samenvattend kun je zeggen dat er langzaam luikjes opengaan die een licht laten schijnen op de moleculaire aspecten van transgenerationale epigenetische overerving, maar dat we het meeste vrijwel zeker nog niet weten. Is epigenetische aanpassing een noodmechanisme voor barre tijden of speelt iets ervan altijd wel een rol?

15.5 Aanwijzingen voor een balans tussen genetische en epigenetische variatie rond methylCpG

In de voorgaande hoofdstukken van dit boek werd CpG methylatie regelmatig kort genoemd (H9, box 4, fig 11, 23). Hier in dit hoofdstuk over milieu-geïnduceerde epigenetische veranderingen over de generaties heen krijgt dit mechanisme voor DNA modificatie weer extra aandacht. Was het in de jaren 80 nog een bewerkelijke opgave om per positie in de basenvolgorde van het chromosomale DNA te achterhalen of de C nu wel of niet gemethyleerd was, nu is het met een aangepaste procedure voor **NGS** mogelijk om het methyloom van het hele genoom te bepalen. Ook zijn er speciale chip arrays voor CpG methylatie analyse beschikbaar.

In het rijk der levenden is CpG methylatie in genomisch DNA wijdverbreid. Het verschijnsel is evolutionair oud (900 miljoen jaar) en robuust, maar kan in bepaalde organismen toch ook gemist worden. Het mechanisme dat tijdens de DNA replicatie de methylgroep op de C in een nieuw gesynthetiseerde DNA streng behoudt, is gedetailleerd in kaart gebracht. Bij dit kopieer-

proces worden weliswaar veel meer fouten gemaakt dan bij de replicatie van de DNA basenvolgorde zelf (H2.2.2), maar het wordt toch als biologisch betrouwbaar ingeschat met minder dan 0,3% gemiste Cs. Bij veroudering treden er meer fouten op in de handhaving van de methylatiestatus, en op die manier neemt in somatische cellen de variatie in de methylatiegraad van de CpGs toe en op vele posities is dit ook afhankelijk van de sekse. Hoe andere chromatine parameters die met de regulatie van de transcriptie te maken hebben, zoals de histon PTMs (tabel 1), worden gehandhaafd tijdens DNA replicatie in de S-fase van de celcyclus, wordt veel minder goed begrepen. Het is dan ook attractief om aan te nemen dat CpG methylatie een bepalende rol speelt bij het reguleren van de zeer gedetailleerde 3-dimensionale structuur van het chromatine.

In CpG methylatie komt alles samen, genetica, de invloed van de omgeving, het toeval en het onbegrepen. Anders dan over de CpG methylatie stappen zelf, leven er nog vele vragen over de biologische rol van CpG methylatie en over de details van de regulatie ervan. Bijvoorbeeld, hoe gefixeerd zijn de posities van cytosine methylatie en kan daar genetische variatie in optreden? Hoe wordt het CpG methylatiepatroon tijdens de embryonale ontwikkeling opgebouwd?

Speelt het toeval hierbij een rol en/of hoe werkt de beïnvloeding door het milieu (H15.3)? Ook in het volgende hoofdstuk (H16, over de kunstmatige voortplanting) zal aandacht worden besteed aan CpG methylatie als verklarende en voorspellende parameter. Daarom probeer ik hier een schets te geven van ons toenemend begrip over CpG methylatie als moleculair sturend principe in “**nature versus nurture**” interacties.

Voor het verrichten van genoom brede studies aan het methyloom zijn monozygote tweelingen, die verschillen voor het te bestuderen kenmerk (lees: een ziekte) ideaal. Het verschijnsel dat de ene helft van de tweeling de ziekte wel heeft en de ander helft niet (“disease discordant monozygotic twins”) is helemaal niet zeldzaam, integendeel, soms is het de regel. Door het analyseren van de individuele methylatiestatus van het DNA van dergelijke tweelingen zijn er met genen geassocieerde gebieden in het genoom gevonden, waarvan de methylatiegraad te maken heeft met kenmerken als agressie en obesitas. Maar je kunt ook door middel van een bevolkingsonderzoek op zoek gaan naar gebieden in het genoom die te maken hebben met ziekte en daar CpG methylatie in betrekken. In dit onderzoek uit Schotland werden inwoners die in 1936 waren geboren in 1996 opgezocht, met de bedoeling om deel te nemen aan het volgende onderzoek. Bij de uitvoering hiervan waren ze 70 en gezond. De nadruk lag op het niveau van 96 eiwitten in het bloed, die een betekenis hebben voor neurologische aandoeningen. Naast 41 regio's, die door de variatie in de DNA basenvolgorde gekoppeld konden worden aan het niveau van 33 eiwitten (GWAS, H6.2), vonden de onderzoekers ook nog 26 regio's die

opvielen door de graad van CpG methylering en gekoppeld konden worden aan het niveau van 9 eiwitten. Deze benadering leverde dus kandidaat genen op voor neurologische aandoeningen, ook wanneer deze door een epigenetisch aspect kunnen ontsporen: het methyleringsprofiel kan immers gekoppeld zijn aan de regulatie van het niveau van genexpressie.

Uit het hoge niveau van methylering moet je wel besluiten dat het een belangrijke functie heeft in het onderdrukken van de transcriptie activiteit van DNA, het meest duidelijk voor retrotransposons (fig 11), het reguleren van imprinting (H10) en het inactiveren van het X chromosoom (box 4). Dat sluit een variabel beeld gedeeltelijk uit. Maar die variatie is er daarbuiten heel zeker wel. De genomische methyleringsprofielen van eenenige tweelingen (in een vergelijking met twee eige tweelingen) kunnen ook worden gebruikt om vast te stellen hoe erfelijk (de h^2 , H6.1) de methylering op een enkele CpG positie is, een indicatie van de mate van variabiliteit. Dat blijkt voor posities die variatie vertonen per positie enorm te kunnen verschillen en gemiddeld niet hoog te zijn; hogere h^2 kwadraten worden alleen voor een klein deel van deze CpG posities gevonden. Die hoge h^2 kwadraat betekent dat van generatie op generatie er een redelijk vaste situatie is, overwegend wel of niet gemethyleerd. De CpG rijke gebieden bij de genen (de CG eilanden; H2.3.3) die een promotor functie hebben zijn als regel ongemethyleerd (zie ook de legenda van fig 11). De regulatie van de genactiviteit hangt daar niet vanaf. Een opmerkelijke uitzondering op deze regel wordt gevormd door genen, die specifiek zijn voor de kiembaan, de promotor regio is in somatische cellen wel gemethyleerd. Op CpG posities die verder van het gen afdalen en ook met de regulatie van genexpressie te maken hebben ("enhancer" of "silencer regions") is volgens de huidige stand van het onderzoek de situatie anders. Variatie in deze gebieden heeft te maken met fluctuaties in de transcriptie status (zie hiervoor ook bij de hongerwinter in H15.3). Een andere manier om vast te stellen dat er betekenisvolle variatie is komt uit de kwantitatieve genetica (H6). I.p.v. een GWAS kun je ook een EWAS uitvoeren (een "epigenome-wide association study" gebaseerd op een genoom breed (m)CpG profiel).

Deze methode leidt tot het opsporen van de gebieden in het genoom die door variatie in deze epigenetische modificatie gekoppeld kunnen worden aan het te bestuderen fenotype.

De invloed van de prenatale omstandigheden, voeding en milieu, op variatie in het methyloom bleek al bij de analyse van DNA van kinderen verwekt tijdens de hongerwinter (H15.3). Ook in andere studies werd deze invloed gezien en hier nog twee voorbeelden. In een onderzoek van 2014 uit Singapore werd van 237 pasgeborenen navelstrengbloed verzameld. Het genoom werd met behulp van een hiertoe ontworpen chip (H3.2, Illumina) op de methylering graad van

450.000 C posities nagekeken. De baby's vertoonden grote verschillen in ruim 1400 genomische regio's, tegenover een overwegend homogeen beeld voor de rest van het genoom. De onderzoekers hielden een aantal kenmerken bij zoals roken van de moeder tijdens de zwangerschap, depressie, maar ook BMI en het gewicht van de baby. Uit de kwantitatief genetische statistische modellen die ze toepasten, kwam vooral naar voren dat het "overall genotype" (het persoonlijke genoom) als beste voorspelde hoe de baby tijdens de zwangerschap met het methyleren van het CpG motief op de diverse omstandigheden had gereageerd. Dit werk illustreert dat de waarde van CpG methylering als uitlezer van milieu omstandigheden groter is wanneer dat milieu tijdens de prenatale ontwikkeling voor langere tijd extreme afwijkingen vertoont. Met een andere aanpak van de zoektocht naar de invloed van het vroege maternale milieu op CpG methylering vonden onderzoekers 687 posities die "variabel" (oftewel "metastable", zoals dit door de onderzoekers werd genoemd (H15.2.2)) reageerden in de eerste weken van de embryonale ontwikkeling, inclusief de gastrulatie (fig 43). Hierbij konden ze eveneens een link leggen naar de regulatie van de activiteit van specifieke genen.

Uit dit werk en meerdere gelijksoortige studies is inmiddels wel duidelijk dat het genoom via methylering eigenlijk al vanaf het vroegst mogelijke embryonale stadium (en de hele verdere ontwikkeling daarna) reageert op omstandigheden in het milieu. Bij het genereren van de karakteristieke eigenschappen van het methyloom zijn meerdere "spelers" (genproducten zoals eiwitten en bepaalde soorten RNA moleculen) betrokken. Ieder op hun beurt zijn ook deze "spelers" weer onderworpen aan genetische variatie. Dit illustreert de invloed van het genotype op de reactie van het methyloom op de milieuomstandigheden. Het lijkt er dus op dat variatie in CpG methylering voor een deel een genetische basis heeft en dat die basis er ook is voor hoe ons genoom via methylering reageert op het milieu vanaf de conceptie, maar het tweelingonderzoek leert dat "het toeval" inclusief de aspecten die mogelijk nog ontdekt moeten worden, ook een grote rol speelt.

Als laatste nog een illustratie van dit principe op microniveau. In een in 2016 gepubliceerde studie kreeg een vrouwtjesmuis vanaf de 2^e dag van de samenleving met een mannetjesmuis, gedurende een periode van meerdere weken voer met een laag eiwitgehalte, 8% tegen normaal 20%. De onderzoekers gebruikten de bekende inteeltlijn B6. Aan het begin van deze periode vindt de paring plaats en het voerregime werd volgehouden tot het einde van de zoogperiode, 3 weken na de geboorte. De jonge muizen hadden een beperking in de groei, bewogen minder en produceerden minder insuline wanneer ze een glucosebelasting ondergingen. Tijdens de zoektocht naar de gevolgen van de eiwitrestrictie bij deze dieren, stuitten de onderzoekers in het

DNA uit de lever en zaadcellen van de mannelijke nakomelingen op een CpG (gemethyleerd of niet) motief dat 133 basen zit vóór de transcriptiestart van het gen voor ribosomaal RNA (positie aangeduid als -133). Dit gen komt in vele kopieën, kop-staart georiënteerd, in meerdere clusters in het genoom voor. Bij de mens vinden we deze polymorfe genclusters terug in het genomische DNA uit de korte armen van de chromosomen 13,14, 15 en 20, 21 (fig 12). De methylering van de CpG op positie -133 in rRNA genen heeft een negatieve invloed op de transcriptie. Dit is op zichzelf al bijzonder. Maar het punt dat deze onderzoekers maken is dat een DNA base, die 29 basenposities dicht bij de start van de transcriptie van rRNA genen zit (op positie -104), een grote invloed heeft op de methyleringsgraad van deze specifieke CpG. Wanneer daar een A zit is de methyleringsgraad van de CpG op -133 veel hoger dan wanneer het een C is (er is dus sprake van een DNA polymorfisme (**SNP**) binnen de B6 inteeltlijn). In de dieet-gestreste mannelijke nakomelingen die de A hebben is de groeibeperking te schatten uit het percentage gemethyleerde CpGs op positie -133. Hoe hoger het aandeel cellen dat de gemethyleerde CpG heeft, hoe lichter de zootjes zijn. In dit geval bepaalt een op het oog miniem detail van het genotype de epigenetische reactie op de eiwitbeperking, die al in de baarmoeder aanwezig was.

Een mooi voorbeeld van hoe het genotype en het methyloom nauw met elkaar verweven zijn, net zoals “nature” en “nurture” met elkaar verweven zijn.

Wat de kunstmatige voortplantings- technieken ons leren over de reproductiegenetica van de mens

16.1 Inleiding

Zonder enige twijfel heeft de ontwikkeling van de *in vitro* fertilisatie (IVF) bij de mens het reproductie onderzoek bij onze soort gestimuleerd. Wetenschappelijke tijdschriften met titels als “Fertility and Sterility” en “Human Reproduction” floreren en het prestigieuze “Human Reproduction Update” is begerenswaardig om in te publiceren. Al ver voor de opkomst van IVF is er vanuit de medische wetenschap naar de vroegste stadia van de humane embryonale ontwikkeling gekeken.

Vanaf 1938 tot aan 1959 hebben de gynaecoloog John Rock (Baltimore) en de patholoog Arthur Hertig (Boston) bericht over hun bevindingen als uitvloeisel van een hysterectomie, een operatieve verwijdering van de baarmoeder. Ze vroegen hun patiënten in de maanden dat ze op de operatie wachtten de cyclus bij te houden en ook de dagen dat er een coitus was. Meestal spoelden ze na verwijdering alleen de baarmoeder uit maar soms gebeurde dat ook wel met de

eileiders. Er werden eicellen geogst van het ovarium en dat leidde tot de, volgens mij, eerst bekende IVF poging bij de mens (met een aanwijzing voor succes). De patiënten waren tussen de 25 en 43 jaar oud. Op basis van de verzamelde **embryo's**, construeerden Hertig en Rock als eersten het humane spoorboekje van de vroegembryonale ontwikkeling tot dag 17 (een ingesteld embryo met placenta ontwikkeling). Er is op dit onderzoek ook wel wat commentaar te leveren. Zo lijkt de in hun studies gebruikte patiënten populatie heterogeen, want de reden voor de hysterectomie ingreep wordt niet echt gegeven. Ook wisten Rock en Hertig niet dat zaadcellen lang in de eileider kunnen overleven en dat het geen goed idee is om de eicel te laten verouderen voor bevruchting (H13.4, fig 41).

In de periode rond de Tweede Wereldoorlog tot in 1947 verzamelden ze 26 embryo's uit 122 vrouwen, waar in de volgende 9 jaar er nog 8 embryo's uit 88 vrouwen aan toe werden gevoegd. Uiteindelijk beoordeelden ze op het uiterlijk 24 van de 34 embryo's als normaal. Veel elementen van de humane vroegembryonale ontwikkeling, waar we nu via routine werk op het IVF lab zo vertrouwd mee zijn, hebben zij als eersten gezien.

Kunnen we met alle kennis die het onderzoek aan de IVF en de praktijk van de IVF over de eerste stadia van de embryonale ontwikkeling heeft opgeleverd, de voortplanting van de mens nu beter begrijpen? Het heeft in ieder geval de interesse ervoor gestimuleerd. Vanuit de "scene" van onderzoekers die zich actief bezighouden met de kunstmatige voortplanting, is wel gesuggereerd dat de humane reproductie via de natuurlijke weg ook niet altijd probleemloos verloopt. De verschillen tussen de laboratorium route en de evolutionair beproefde methode zouden dus niet eens zo groot zijn. Maar is dat echt wel zo? Wat hier een rol bij speelt is dat het reproductie vermogen van onze soort vanuit het laboratorium laag wordt ingeschat, net alsof het op dat gebied bij de mens altijd een kwestie van kansen is. Toch heeft de soort zich in de recentere evolutie aardig weten te redden. Het lijkt er dus meer op dat er sprake is van een grote mate van spreiding in reproductief vermogen. Dit geldt vooral voor de vrouw, omdat goede eicellen kostbaar zijn en veel van de omstandigheden waarin de eicel en het embryo verkeren, zoals het milieu in het ovarium, in de eileider en de baarmoeder, van haar afhankelijk zijn. De variatie in de zaadcelproductie (H12.8, H12.10, tabel 5, fig 34) kan het op de wereld zetten van de volgende generatie eeuwenlang nooit erg nadelig hebben beïnvloed: eicellen zijn vele malen schaarser dan zaadcellen.

Een aantal bekende getallen uit het hedendaagse onderzoek: ongeveer 1 op de 6-7 stellen ondervindt problemen bij het vervullen van de wens tot ouderschap. Wat draagt iedere partner hieraan bij? Fifty : fifty voor de man vrouw verhouding zeggen de meeste publicaties. Een kleiner

deel zal veroorzaakt worden door een niet kloppende wisselwerking tussen het paar. Daar kunnen ook stellen bij zitten waarbij klinisch geen afwijkingen te vinden zijn (rond de 20%). Uit figuur 36 kun je afleiden dat het aandeel van de man bij het vragen om hulp bij de voortplanting ook wel eens meer dan 50% kan zijn. Een scherpe lijn is niet te trekken. De maatschappelijke grens voor het gehonoreerd krijgen van een verzoek tot hulp ligt bij een jaar vruchteloos proberen. Een fertiliteitsonderzoek op dat moment kan bij benadering een scheiding geven tussen stellen waarbij proberen nog zin heeft, met een schatting van een kans op een doorgaande zwangerschap van 15% in een volgend jaar, en stellen waar dat niet zo voor is. En de eerste groep zal wel grotendeels samen vallen met de groep die, wanneer de stress van het hele IVF behandelingstraject voorbij is, alsnog spontaan zwanger wordt (wat overigens ook tijdens het IVF traject voor kan komen). In een follow up studie aan het universitair medisch centrum van de universiteit van Maastricht (tot 7 jaar na het eerste bezoek voor een fertiliteitsbehandeling) bleek zo'n 10% van de kinderen, vanaf het moment van de intake uit een spontane zwangerschap te zijn ontstaan.

Een dergelijke spontane zwangerschap kan dus optreden wanneer men op de wachtlijst staat, tijdens de behandeling, of erna. De relatie tussen het aantal cycli en de cumulatieve kans op zwangerschap is te vinden in figuur 46. Na 2 maanden heb je al een verrijking van stellen die baat zouden kunnen hebben bij een vorm van hulp. Stel je nu eens voor dat je deze grafiek met dezelfde stellen en een volgende kindwens over zou kunnen doen en je voor de leeftijd zou kunnen corrigeren, zouden dan de vruchtbare stellen van de eerste ronde opnieuw de meer vruchtbare zijn? En blijken de minder vruchtbare ook dan nog steeds minder vruchtbaar? Er zijn allerlei redenen om aan te nemen dat dat zo is, maar er bestaat geen kengetal voor (de herhaalbaarheid van de tijd tot zwangerschap) dat in de literatuur een vaste positie heeft gekregen, als het al te vinden is.

Vrij snel na de eerste publicaties van Robert Edwards in 1965, over de uit rijpe follikels gehaalde eicellen, die spontaan hun reis door de eerste meiotische deling hervatten (H13.7), rapporteerde zijn groep in 1969 en 1970, dat het was gelukt eicellen in de 2^e meiotische deling *in vitro* te bevruchten (fig 39). Het duurde daarna nog 8 jaar totdat in 1978 Louise Brown geboren werd, het eerste IVF kind. De toenmalige reden om aan IVF te werken was dat het een oplossing bood voor verstopte eileiders, zoals bijvoorbeeld veroorzaakt door een *Chlamydia* infectie. Het eerste Nederlandse IVF kind werd in 1983 in Rotterdam geboren. Het hierbij betrokken team onder leiding van Gerard Zeilmaker (de bioloog) en Bert Alberda (de gynaecoloog) was verbonden aan de medische faculteit van de Erasmus Universiteit in Rotterdam. In feite was het een

periode waarin alles nog werd geprobeerd, en ook was de aanpak naar de huidige maatstaven nogal primitief. Ik heb geen idee of de “founding fathers” van de techniek toen al voorzagen welk een vlucht de IVF, nu onderdeel van ART (“artificial reproduction techniques”), in zijn algemeenheid zou nemen. De pathologie van de eileider is al lang niet meer de voornaamste reden voor de betrokkenheid van het IVF lab bij de behandeling van onvruchtbaarheid (nu is dit slechts bij rond de 10% van de behandelingen het geval). In een recente representatieve Nederlandse multicentrum studie naar het effect van de chemische samenstelling van het kweekmedium op de diverse uitkomsten van een IVF behandeling, was er in 50-60% van de gevallen sprake van mannelijke sub- of infertiliteit. In rond de 20% was er medisch gezien bij de partners niets afwijkends te vinden (overigens is dit de groep waarbij in afwachting van de behandeling de meeste spontane zwangerschappen plaatsvinden).

Het feit dat er bij de IVF veel minder zaadcellen nodig zijn dan bij een natuurlijke conceptie, heeft de urologie eigenlijk verbonden met de gynaecologie. De rode draad die door vele onderzoeksinspanningen rond ART loopt, is dat vanuit de medische professie internationaal tot het uiterste wordt gegaan om een kinderwens te honoreren. De gevoelens van radeloosheid en diep verdriet die het onvervuld blijven van de kinderwens oproept, is in de spreekkamer een stimulans tot het opzoeken van de randen van de mogelijkheden van de kunstmatige reproductie. Aan de andere kant speelt een maatschappelijk probleem, namelijk dat het lot steeds moeilijker te accepteren lijkt, het idee van de maakbare samenleving volgend. Tegen deze achtergrond kan de proef, die tot de ontdekking van de effectiviteit van ICSI (intra cytoplasmatische sperma injectie) bij de mens leidde, verklaard worden. In een klein deel van de klassieke IVF situaties, waarbij de eicellen zich met een overmaat aan zaadcellen in een kleine druppel kweekmedium onder een laagje olie bevinden, lukt het de zaadcellen namelijk niet om door de **zona pellucida** (H13.5, fig 39) heen te komen. Om dat op te lossen werd geprobeerd om met een pipet de zaadcel al een klein eindje op weg te helpen door deze in de zogenaamde perivitelline ruimte te deponeren (fig 39). In 1992 op het IVF lab van de Vrije Universiteit Brussel, schoot, als een soort bedrijfsongeval met Huberts Joris achter de micromanipulator, een arm ervan uit, de zaadcel in het **cytoplasma** van de eicel achterlatend. Wanneer dat bij een eicel van de muis zou zijn geprobeerd, was deze prompt lek geprikt en leeggelopen. Bij de mens bleek deze techniek echter bruikbaar. Toen de onderzoekers zeker genoeg waren over de betrouwbaarheid van deze vorm van het ontstaan van een **zygote**, volgde een publicatie in de Lancet waarin beschreven werd dat uit aldus bevruchte eicellen gezonde baby's werden geboren.

Hiermee werden Gianpiero Palermo en zijn baas prof André van Steirteghem in één klap beroemd. ICSI als variant op de klassieke IVF was geboren en daarmee werd de populatie te behandelen wensouders flink uitgebreid. Was de door de laborant uitverkoren zaadcel (van normaal postuur en aan de staartbeweging te zien levend) bij mannen met een erg lage spermaceltelling aanvankelijk afkomstig uit het ejaculaat (tabel 5), in de vervolgstappen hoefde dat niet meer zo te zijn. Mannen kunnen steriel raken door een blokkade in de bijbal, bijvoorbeeld als gevolg van een ontsteking. Dan is het logisch om in het traject stroomopwaarts van de ontsteking te gaan zoeken (een PESA) naar bruikbare zaadcellen. Wanneer daar niets te vinden is en er sprake is van een niet obstructieve **azoospermie** (H12.12), dan kun je het onderzoek uitbreiden naar de testis. Deze techniek wordt aangeduid met de afkorting TESE (H12.9, H12.11, H12.12). Ik kan me nog goed de plaatjes herinneren die door een arts uit de USA in Amsterdam werden getoond, waarop te zien was dat de testikelwand met een lange jaap in de lengterichting was opengesneden, dit ter vergemakkelijking van het zoeken naar de wat dikkere segmenten in de testisbuisjes. Het is ook geen “rocket science” om te denken dat waar het buisje opbolt, de kans op een focale haard van spermatogenetische cellen het grootst is. In 40-50% van de mannen die geen obstructie in de bijbal hebben, maar te weinig zaadcellen produceren om ze (via de testisbuisjes, de lange buis door de bijbal en uiteindelijk de zaadleider (fig 31)) het ejaculaat te laten bereiken, worden op deze manier toch nog zaadcellen gevonden. IVF analisten kunnen daarbij soms uren zitten zoeken naar één of enkele zaadcellen om toch nog de kans op genetisch ouderschap open te laten. De levend-dood selectietest (een kleine beweging van de staart, die te zien is na aanraken met de pipet) is hier lastig om toe te passen, omdat bewegelijkheid normaal in de bijbal ontstaat (H12.12). Aanvankelijk verschenen er publicaties die het belang van “in leven zijn” van de zaadcel bij inzet in ICSI wilden nuanceren. Nu weten we dat het een voorwaarde is (H13.5.2). In de eerste jaren na publicatie in de Lancet van 1992, werd ICSI in de Nederlandse IVF centra geïntroduceerd. Maar als uitzondering op het in Europa en mondiaal breed uitrollen van deze techniek kwam er in 1996 vanuit de beroepsgroep (de NVOG) een moratorium op toepassing van ICSI, dat tot 2000 stand hield. Men wachtte af totdat er uit het buitenland bevindingen over de efficiëntie van ICSI en de kans op het optreden van **congenitale afwijkingen** bij het kind verschenen. Licht verhoogde risico's op kinderen met een aangeboren afwijking bij de conventionele IVF waren toen al bekend en een reële zorg voor de beroepsgroep. Overigens is dit voor ICSI kinderen kwantitatief niet anders.

Aan ICSI zit ook een positief vroeg embryologisch aspect: in een IVF schaalpje zitten al gauw zo'n 2500 zaadcellen per kleine druppel van 50 µl kweekmedium. Dat zijn er vele malen

meer dan in de *in vivo* situatie (H13.5). Deze zijn metabool actief en zorgen vrijwel zeker voor een fysiologisch effect, met mogelijk **mutagene** werking, door de overmatige vorming van **vrije zuurstofradicalen** (H13.5.2). Dat er onder deze omstandigheden maar rond de 3% polyspermie optreedt is op zichzelf ook al bijzonder. Er zijn humane IVF laboratoria, die wellicht om deze reden, en/of op bedrijfstechnische gronden, overwegend ICSI toepassen. Dit geldt dan ook voor een wensvader met een normaal **spermiogram** (H12.9), daarbij elke vorm van zaadcelcompetitie uitsluitend.

Het is niet overdreven te stellen dat ART de wereld heeft veroverd en dat overal de bijdrage van deze technieken aan het op de wereld zetten van een volgende generatie toeneemt. Ook geldt dat in de meeste landen, Nederland en Denemarken zijn uitzonderingen, de operatie is vercommercialiseerd met een expansief bedrijfsleven en durfkapitaal op de achtergrond. Het bekende kengetal voor ART in Nederland staat op 1 op de 30 geboorten. Dus zit er bij wijze van spreken in elke klas één kind dat m.b.v. ART op de wereld is gezet.

16.2 *In vitro*

IVF zou niet mogelijk zijn geweest zonder de ontdekking dat de zygote *in vitro* de klievingsdelingen kan doorlopen. Bij de muis is het meeste voorwerk vanaf de jaren 50 verricht door de eerder genoemde Wes Whitten van het Jackson laboratorium in Maine (H13.7). In onderzoek naar het optimale *in vitro* milieu zijn twee denkrichtingen te onderscheiden: (a) namaken van de natuur of (b) "trial and error" (laat het embryo zelf maar zeggen wat het "wil"). Werden de kweekmedia eerst zelf gemaakt en waren de formules voor de samenstelling ervan openbaar, met de groei en de mondialisering van ART is ook de levering van media en attributen voor zaad- en eicel isolatie en embryokweek, een volledig commerciële aangelegenheid geworden. Naar schatting zijn er voor de mens wel 20 verschillende mediumformuleringen in omloop, waarschijnlijk allemaal een beetje anders dan het kweekmedium waarin Louise Brown ontstond. Naarmate de verblijfsduur van de humane embryo's *in vitro* door technische ontwikkelingen langer is geworden, zijn ook de eisen omhoog gegaan. Vaak wordt daarbij gebruik gemaakt van een "tweetraps" medium, waarbij de samenstelling van de 2^e trap is afgestemd op de ontwikkeling van 8-cellige embryo's vanaf dag 3 tot een **blastocyst** op dag 5/6 (fig 43). Het ontwikkelen en testen van geschikte kweekmedia is een uiterst complexe aangelegenheid omdat de optimale concentraties van de tientallen bestanddelen van elkaar afhankelijk zijn. Een in Nederland tijdens de opkomst van

de IVF veelgebruikt medium is HTF (“human tubal fluid”), gebaseerd op de samenstelling van vocht in de eileider, maar nu is het in de vergetelheid geraakt. Het is een illusie te denken dat het ooit zal lukken het *in vivo* milieu *in vitro* helemaal perfect na te maken. Daarvoor zijn de fysiologische omstandigheden waarin cellen en zeker eicellen en embryo's zich optimaal voelen, te ingewikkeld en te variabel. In wetenschappelijke overzichtsartikelen wordt benadrukt dat het *in vitro* milieu een vorm van stress vertegenwoordigt, waaraan eicel en het vroege embryo zich moeten aanpassen. In 2010 werd op de afdeling verloskunde en gynaecologie van het universitair medisch centrum in Maastricht onder geleide van John Dumoulin ontdekt dat het medium waarin de bevruchting en de eerste klievingsdelingen hadden plaatsgevonden, een effect heeft op het geboortegewicht van de baby's. Deze bevinding was zo opzienbarend dat er een groot onderzoek volgde, waaraan zes Nederlandse IVF klinieken meededen. Samen voerden ze een bijzonder informatief experiment uit waarin twee media met elkaar werden vergeleken. Het ene kweekmedium was wat beter in het produceren van dag 3 embryo's van een voldoende goede morfologie om te kunnen transplanteren. Het gebruik ervan leidde tot wat meer succesvolle geboorten. Bij het andere medium was het gemiddelde geboortegewicht van de baby's zo'n 5% hoger (in H16.3 gebruik ik deze studie om kengetallen van een IVF behandeling te introduceren). In drie van de zes labs vond de pre-implantoire ontwikkeling plaats bij 5% zuurstof omdat de eileider een relatief zuurstofarme omgeving is. In de andere drie laboratoria werd gebruik gemaakt van een gasfase in de incubator met gewoon lucht, dus 20-21% zuurstof. In hoofdstuk 13.7 werd voor rund en mens al vermeld dat het echt beter is pre-implantoire embryo's bij de voor weefsels meer normale zuurstofspanning van 5% te kweken. Dit lijkt logisch wanneer je weet dat **gameten** gevoelig zijn voor **oxidatieve stress** (H12.7, H13.5.2, H13.7) maar celbiologen discussiëren hier nog steeds over. Uit het voorzorgsprincipe zou je dus verwachten dat in alle IVF klinieken de duurder 5%O₂ incubatoren in gebruik zijn, en dat is momenteel wel zo ongeveer het geval.

16.3 Superovulatie

Toen ik me in 2001 wetenschappelijk ging richten op biologische vraagstukken, die verbonden zijn met de toepassing van kunstmatige voortplantingstechnieken, vertelde een enthousiaste gynaecoloog me dat het succes van IVF te maken heeft met het feit dat er op het moment van terugplaatsing van het embryo nog te kiezen is. In het hiervoor bij hoofdstuk 16.2 aangehaalde Nederlandse onderzoek naar het effect van het kweekmedium op de uitkomst van de IVF, was

de gemiddelde opbrengst van een superovulatie procedure 9 eicellen, bij een gemiddelde leeftijd van de vrouw van 34 jaar. Zowel voor de leeftijd als voor het aantal is de spreiding ruim. Gemiddeld neemt de superovulatierepons bij het ouder worden natuurlijk af (H11.1). Uit de in de studie genoemde 9 eicellen, ontwikkelden zich gemiddeld 2,5 tot 4- tot 8-cellige embryo's (fig 43) die geschikt waren om getransplanteerd te worden (het *in vitro* eindpunt in deze studie). Natuurlijk wordt in al deze laboratoria zowel conventionele IVF als ICSI toegepast (in een verhouding van ongeveer 2 op 3). Het terugplaatsen van meestal één maar soms twee embryo's op het daarvoor geëigende moment leidde in 15-20% van de gevallen tot implantatie. Na een jaar proberen was de kans op een geboorte zo rond de 40% (en niet echt verschillend voor de hier gebuikte media, waaronder het nu in onbruik geraakte HFT, zie in H16.2). De verhouding tussen eenlingen en tweelingen in de hele studie was 7 : 1. De verhouding tussen vers teruggeplaatste embryo's en ingevroren embryo's was 2 : 1. Ter vergelijking hier de cijfers van Nederland over 2020. Het eerste cijfer betreft klassieke IVF, het tussen haakjes geplaatste ICSI. IVF en ICSI werden in ongeveer gelijke mate toegepast. Wanneer het aantal met superovulatie gestarte cycli wordt gesteld op 100%, dan leidt dat in 86,3% (87,7%) tot een follikelpunctie, in 74,6% (76,7%) tot embryo-transplantatie, in 27,2% (29,5%) tot een zwangerschap en in 19,3% (21,7%) tot een doorgaande zwangerschap. Van de geboorten is 3-4% een tweeling.

Van alle factoren die een rol spelen bij de slagingskans na het inschakelen van het IVF laboratorium, is de leeftijd van de wensmoeder de belangrijkste. Een beroeps- en belangenorganisatie als ESHRE hanteert als minimale norm een implantatiekans van 25% voor een 8-cellig embryo en van 35% voor een blastocyst. Maar er zijn biologische limieten en vele variabelen die invloed hebben op de kans van slagen.

Hoe nu de meest kansrijke embryo's voor terugplaatsing te kiezen? Ondanks dat er naartig naar antwoorden op deze vraag is gezocht blijken er, behalve overduidelijke morfologische aanwijzingen, geen betrouwbare indicatoren, in of buiten het embryo (in de kweekvloeistof) te zijn. Onder de indicatoren, die wel betekenis hebben, vallen naast afwijkingen bij de bevruchting ook een sterk versneld of vertraagd (vaker voorkomend) delingstempo. Daarbij treedt vaak fragmentatie op, het bij een celdeling verschijnen van bolletjes celmateriaal. Dit verschijnsel, dat je veel bij humane embryo's ziet, kan reversibel zijn. Bij muizenembryo's komt het zo goed als nooit voor. IVF embryologen beoordelen de embryo's eens per dag microscopisch op de mate van fragmentatie (toename is negatief) en op het celaantal (toename is meestal positief, fig 43). Deze procedurele aanpak heeft geleid tot een soort van half objectieve, half subjectieve waarde-

ringsschaal. Kan dat met de huidige technische mogelijkheden niet objectiever en informatiever, kun je je afvragen? Het antwoord op deze vraag is bevestigend, want alweer enige jaren geleden werd de embryoscoop ontwikkeld, een geautomatiseerd microscopisch opnamesysteem dat in de broedstof per embryo eens in de 20 minuten een plaatje maakt. Modernere systemen doen dat nu om de 5 minuten. Wanneer je deze beelden als een filmpje bekijkt, vliegt de ontwikkeling van het embryo voorbij. Al voordat de met behulp van de embryoscoop verzamelde gegevens in de literatuur verschenen, was er al een verhaal gepubliceerd over het voorspellend vermogen van de timing van de eerste klievingsdeling: het verloop van het zygote stadium (H13.5, fig 42). Met “time lapse monitoring” is het verloop van de eerste klievingsdeling nu gedetailleerd te volgen. In 2019 verscheen er een Frans onderzoek dat 22 parameters gebruikte voor het beschrijven van gebeurtenissen tussen de gameet fusie tot aan het verschijnen van 4 **blastomeren**. Daarvan hadden er twee iets met de kans op het voldragen van een zwangerschap en dus de geboorte van een baby te maken: de manier waarop de twee pronucleï (fig 42) in het centrum van de zygote tegen elkaar aan gingen liggen (een positief signaal) en ten tweede het verschijnen van meerdere kernen in ten minste een van de twee blastomeren na de eerste klievingsdeling (een negatief teken). Het belang van de “regie” rond de eerste klievingsdeling wordt met deze nieuwe technologie opnieuw aangetoond. Om de potentie van “time lapse monitoring” voor de IVF praktijk verder in kaart te brengen is in Nederland een multicentrum studie opgezet waarvan de resultaten aanstaande zijn. Ook daarna zullen de biologische gebeurtenissen die optreden tijdens vroege embryogenese nog lange tijd een mysterieus gebied blijven.

16.3.1 Het ontstaan van chromosoomafwijkingen tijdens de klievingsdelingen

Blijvende fragmentatie van cytoplasma maar ook van de kern. Het lijken wel twee zijden van éénzelfde negatieve medaille: kennelijk is het delingsapparaat tijdens de vorming van de blastomeren toch niet helemaal betrouwbaar. Wat is hiervoor verantwoordelijk en is de mens hierin uitzonderlijk?

In 2000 verscheen er een publicatie uit Australië waarin van 12 humane dag 3 embryo's via een nieuwe DNA **hybridisatie** techniek een **chromosoomportret** van de individuele blastomeren werd gemaakt. Dit werk leverde een stevige vingerwijzing naar niet kloppende chromosoomaantallen per cel. Toen dit resultaat doordrong kwam de vraag op of je in het 8-cellige stadium, voorafgaand aan de compactie (fig 43) al een chromosoom diagnose voor het hele embryo kon stellen. Dat zou kunnen door van één of soms twee te biotyperen blastomeren het aantal chromo-

somen vast te stellen. De gedachte dat een diagnose gebaseerd op een enkele cel betrouwbaar kon zijn, had natuurlijk sterk te maken met wat er ondertussen bekend was over de meiotische oorsprong van aantalsafwijkingen en het sterke maternale leeftijdseffect daarop (H11.4, fig 30): meiotische fouten vind je in iedere cel van het embryo terug.

Verdergaand werk hieraan leverde echter onverwachte resultaten op. Toen Esther Baart begin van deze eeuw in Rotterdam aan haar promotieonderzoek begon, had ze de beschikking over fluorescerende stukjes zoek-DNA (probes) van 10 chromosomen, waarmee ze met behulp van DNA hybridisatie en microscopische analyse de chromosomen kon identificeren. Het onderzoeksmateriaal bestond uit 196 embryo's. Van 74 nam ze een enkele cel af en van 122 twee. Bij de helft van die 122 verschilde het fluorescentiebeeld tussen de blastomeren: het embryo bleek een **mozaïek** te zijn. Achteraf beschouwd was dit de eerste wat steviger aanwijzing voor wat CIN wordt genoemd, chromosomale instabiliteit. In de eerste discussies over dit verschijnsel kwam natuurlijk naar boven, dat je op basis van onderzoek aan een enkele cel dus moeilijk een uitspraak kan doen over de kansen op implantatie in de baarmoederwand en het vervolg van de embryonale ontwikkeling.

Ondertussen had de techniek niet stil gezeten en was het in 2009 mogelijk geworden het DNA uit een enkele **blastomeer** te vermenigvuldigen en op een **chip array** (een glaasje waarop in kleine stukjes in de juiste volgorde het hele **genoom** geplakt zit) via DNA hybridisatie uit te lezen. Op deze manier worden met een veel grotere resolutie kopie-aantallen die afwijken van twee zichtbaar. Voor deze toch wel iconische publicatie uit 2009 van de groep van Joris Vermeesch uit Leuven is de medewerking gevraagd van echtparen die IVF niet nodig hadden vanwege verminderde vruchtbaarheid, maar om te voorkomen dat een genetische belasting, bijvoorbeeld een X gekoppelde ziekte of de aanwezigheid van een **BRCA2 mutatie** (een van de twee borstkanker genen), doorgegeven wordt aan de volgende generatie. De m.b.v. IVF tot stand gekomen embryo's worden in een dergelijke aanpak gescreend op de betreffende mutatie (pre implantatie genetische diagnostiek, PGD, nu PGT-M) en alleen genetisch gezonde embryo's worden in de baarmoeder geplaatst. De onderzoekers hadden de beschikking over embryo's die er nog behoorlijk goed uitzagen, maar die niet meer nodig waren voor het vervullen van de kindwens. Hun conclusie was dat tussen de 70 en 90% van deze gemiddeld 8-cellige embryo's in één tot in alle cellen chromosomaal afwijkend waren. Door het gebruik van het chip array konden zij ook zien of er chromosomen gebroken waren, een fatale hinderpaal bij het overbrengen van genetische informatie naar de dochtercellen. Ook dit bleek bepaald niet zeldzaam. Gezamenlijk

droeg de nieuw opgedane kennis bij aan het wat verdrietige beeld van een gebrekkige “chromosomale robuustheid” tijdens de klievingsdelingen.

Binnen de ontwikkeling van IVF/ART is momenteel een hieraan gerelateerde discussie gaande. De vraag die daarbij vooral leeft gaat over het beste moment van terugplaatsen. En deze vraag is weer gerelateerd aan een mogelijke invloed van de kweekmedia op het correcte verloop van klievingsdelingen en de ontwikkeling tot een blastocyst. Terugplaatsingen vinden momenteel plaats op dag 3 met liefst een 8-cellig embryo of tijdens dag 5/6 met een vroege of wat latere blastocyst. Er zijn sterke aanwijzingen dat bij langer doorkweken *in vitro* er al selectie tegen genetisch sterk afwijkende embryonale cellen (blastomeren) plaats vindt, en dat deze selectie zowel in de **ICM** als in de trofoblast (fig 43) optreedt. Door gewoon goed naar de embryo's te kijken zie je dat eigenlijk ook al. Na het 8-cellige stadium verschijnen er namelijk meer zich slecht ontwikkelende afvallers. Een groot verschil in de uiteindelijke “take home baby rate” (inclusief eventuele volgende terugplaatsingen met ingevroren embryo's uit een vorige stimulatie cyclus, zie H16.3.2) blijkt er echter niet te zijn, wanneer de resultaten van meerdere studies van dag 3 en dag 5/6 terugplaatsingen bij elkaar worden gevoegd. Maar de duur van de embryokweek (en zo het tijdstip van terugplaatsing) inclusief een kwaliteitscontrole d.m.v. chromosoom- en genoomanalyse, blijft een onderwerp van voortdurende wetenschappelijke reuring. Zo zijn er verklaarde voorstanders van genetische analyse van blastocysten op basis van een trofoblast biopt.

Gezien het leeftijdseffect op meiotische **aneuploidie** is dat gerechtvaardigd (H11.4, fig 30). Chromosomale instabiliteit (CIN) die pas optreedt tijdens de klievingsdelingen is, zoals we hiervoor zagen, ook een factor die het succes van de IVF beperkt. Recent onderzoek toont aan dat wanneer er tot in het blastocyst stadium *in vitro* wordt doorgekweekt, het medium dat daarvoor wordt gebruikt ook nog van invloed is. Men kan zich afvragen of chromosomale instabiliteit ook in dezelfde mate optreedt bij natuurlijke, niet door hormonale stimulatie gestuurde voortplanting. Maar hoe vind je hiervoor het bewijs en hoe zoek je naar de eventuele oorzaken?

Ondanks het veelvuldig optreden van CIN zie je in de literatuur toch nog IVF succespercentages van 25-35% per terugplaatsing van 8-cellige embryo's. Voor blastocysten ligt dit nog hoger (35-60%). Wel is duidelijk, dat deze percentages gedrukt worden door de aanwezigheid van mozaïeke embryo's (H13.6, H13.6.1): er moeten voldoende **diploïde** cellen in de **epi-blast** van het jonge embryo over blijven om de levensvatbaarheid te waarborgen (fig 43). Eerder (H13.6.1) zagen we dat de eicel qua omvang van de cellulaire inhoud overbemeten is. De eicel is groot genoeg voor de aanleg van meer dan het minimaal vereiste aantal cellen, dat nodig is om

de epiblast kansen op verdere embryonale ontwikkeling te geven. De vorming, en daarna uitval van enkele blastomeren door chromosoomafwijkingen (CIN) kan tijdens de klievingsdelingen (en ook nog wel daarna) worden getolereerd. Recent heeft een Amerikaans-Europees consortium, op basis van een op **NGS** gebaseerde evaluatie van 5 trofoblast cellen per blastocyst, gekeken naar de implantatiekansen van aneuploïdie-mozaïeke embryo's en hun kans op een uiteindelijke geboorte. Die was minder dan de helft vergeleken met de kans op een geboorte van de **euploid** verklaarde embryo's. Hierbij moet wel worden opgemerkt dat aneuploïdie in trofoblast cellen (de cellen waarmee de genomanalyses werden uitgevoerd) in dit stadium veel beter wordt verdragen dan in de **ICM**/epiblast cellen waaruit het embryo zich verder ontwikkelt.

Vermeldenswaard is ook dat zelfs op basis van dit kleine aantal van 5 trofoblast cellen, de mate van aneuploïdie iets vertelt over de kans op ontwikkeling na de implantatie. De kans is kleiner wanneer het % aneuploïde cellen hoger is. Geëxtrapoleerd naar de *in vivo* situatie is het toch wel een gekke gedachte je af te vragen op hoeveel mensen dat betrekking heeft. Wie van ons is er al in het blastocyst stadium door het oog van de naald gegaan? Waar ligt bij de mens de ondergrens van de fractie chromosomaal normale cellen die nodig zijn voor de ontwikkeling van de epiblast en verder (fig 43, H13.6.1)? Geheel volgens de verwachting worden er ook embryo's gevonden die aan het biopt te oordelen in al hun cellen aneuploïd zijn. Een meiotische fout is dan de meest waarschijnlijke oorzaak (zie ook H11.4.1). Ook op jongere leeftijd van de vrouw zal na superovulatie toch al gauw 20% van de eicellen aneuploïd zijn. Voorbij een leeftijd van 36 jaar gaat dit percentage ook nog eens stevig omhoog. Dan lijkt het zinvol hiertegen te selecteren. Een nog openliggende vraag is of ook voor het verschijnsel van de chromosomale instabiliteit (CIN) er een leeftijdsafhankelijk (oplopend) effect geldt. Al met al is het opmerkelijk dat uit de praktijk van ART niet blijkt dat bioteren en zoeken naar aneuploïdie (deze vorm van PGD heet nu PGT-A) de kans op nageslacht verbetert. Momenteel is het succes van ART simpelweg in sterke mate afhankelijk van de leeftijd van de vrouw. De conditie van haar eicel speelt daarbij een hoofdrol.

Zou het niet mogelijk zijn om na superovulatie en intra uterine inseminatie (IUI) de embryo's als blastocysten uit de baarmoeder te spoelen, er voor genetische analyse een biopt van te nemen en ze na selectie op genetische afwijkingen en invriezen in een volgende cyclus weer terug te plaatsen? Met die vragen in het achterhoofd ontstond er contact tussen een aantal Amerikaanse laboratoria en het Punta Mita ziekenhuis in Punta de Mita, een aan de kust gelegen resort in Mexico. De vrouwelijke vrijwilligers en zaaddonoren (niet altijd een echtgenoot) werden in Mexico gerekruteerd, de vrouwen kregen 1400 dollar. Dat is levensonderhoud voor meer dan

2 maanden. Ze werden ingelicht over de risico's: sommige deelnemers werden zwanger en kregen een abortus. Er werd een superovulatie procedure opgestart en op de voorspelde tijd van ovulatie werd IUI toegepast (H13.4, zie fig 41). De 134 spoelingen bij 81 vrouwen leverden 136 embryo's op waaronder 72 blastocysten, bijna allemaal op dag 5 en 6 (fig 43). De echo had gemiddeld 8,5 ovulaties voorspeld. Het viel de onderzoekers op dat de morfologie van de blastocysten, die waarschijnlijk door de procedure een soort van selectie hadden ondergaan, *in vivo* beter was dan wat in de praktijk van de IVF gangbaar is. Van sommige vrouwen waren ook IVF gegevens beschikbaar en dat bevestigde deze eerste indruk. En wat was het resultaat van de genetische analyse van de gebiopteerde cellen uit de trofoblast (fig 43)? Uit rond de 50% van de blastocyst bipten werd een normaal diploïd embryo voorspeld, in lijn met de bevindingen bij IVF controle blastocysten. Een kleine 20% van de blastocysten was volledig aneuploïd en de rest varieerde van laag mozaïek tot sterk afwijkend.

Een andere route in dit moeilijke onderzoeksveld maakt gebruik van het proefdier rund, in dit geval Holstein Friesians, de bekende mondiaal opererende melkproducenten. De dieren hadden nog nooit gekalfd en werden met hormonen tot superovulatie gebracht. Een deel werd normaal geïnsemineerd, van een ander deel werden rijpe eicellen gewonnen die de IVF procedure in gingen. Van een derde deel werden onrijpe eicellen uit het ovarium gewonnen, die vervolgens *in vitro* rijpten en daarna met behulp van IVF werden bevrucht. De genetische analyse vond plaats op individuele blastomeren van de 4- tot 8-cellige embryo's. Na vermenigvuldiging werd het DNA op een **SNP**-array (H3.2) op afwijkingen van diploïdie uitgelezen. Bij 19% van de *in vivo* bevruchte embryo's werden één of meerdere genetisch aangedane blastomeren gevonden, maar in de IVF embryo's werd dit bij liefst 69% gezien.

Wanneer ook de eicelrijping *in vitro* plaats had gevonden, was dat percentage gestegen tot 85%. Toch wel een schokkende vinding.

Het grote probleem bij de analyse van de resultaten van IVF/ART is het statistische verschijnsel strengeling. Wanneer je a) leeftijdseffecten, b) superovulatie, c) *in vitro* kweek, d-e) de kwaliteit van eicel en zaadcel en f) het milieu van de baarmoeder als variabelen voor de kans op een gezonde baby beschouwt, vallen deze in de regel samen, ze zijn gestrengeld, of wel op een bepaalde manier met elkaar gekoppeld. Ook kunnen er interacties zijn tussen variabelen, ook een begrip uit de statistiek. De statische analyse is daardoor moeilijk en de invloed van ieder van deze variabelen apart is in de praktijk van de IVF vrijwel niet betrouwbaar te onderzoeken. Ook valt het niet mee om de resultaten van verschillende IVF laboratoria met elkaar te vergelijken. Tenslotte blijft het erg moeilijk om met proefdieronderzoek door te dringen in de werkelijkheid

van de kunstmatige voortplanting bij de mens. Is bijvoorbeeld de muis (reproductief eigenlijk een alleskunner) met zijn grote worpen en lage vroeg embryonale sterfte eigenlijk wel een geschikt proefdier? Elke soort zal voor de diverse technische stappen in een IVF procedure zijn eigen (on)gevoeligheden hebben. En dan is er nog de constatering dat de humane populatie die met ART geholpen wil worden wel erg heterogeen is. In wezen zijn we ons eigen proefdier. Verdere vragen hierover en over de verdere genetische en **epigenetische** aspecten van ART komen hierna (H16.5 en H16.6) aan bod.

16.3.2 Superovulatie en de “maternal to zygote” overgang

In hoofdstuk 11.5 werd betoogd dat er variatie in “eicelkwaliteit” kan zijn tussen opeenvolgende vruchtbaarheidscycli van de vrouw en dat dat er de reden van kan zijn dat bevruchting niet elke maand kan leiden tot een innesteling, gevolgd door ononderbroken embryonale ontwikkeling. Bij een betere vruchtbaarheid is deze variatie minder. Kennelijk kan de ene eicel de sprong van het eicelprogramma naar het programma voor start van de embryonale ontwikkeling beter maken dan de ander. In hoofdstuk 11.2 werd vermeld dat het programma voor embryonale ontwikkeling pas laat tijdens de rijping van de eicel wordt “geïnstalleerd”. In hoofdstuk 11.5 werd gesuggereerd dat er bij de natuurlijke voortplanting kennelijk een relatie bestaat tussen de omvang van de embryonale sterfte (waarvan het meeste vroeg is) en het welslagen van de “**maternal to zygote**” overgang (MtZ). In hoofdstuk 13.5.3 werd dit concept van meer handen en voeten voorzien door het behandelen van de voorbeeldrol van het maternale effect **gen Atrx** bij de muis, dat bij functionele afwezigheid in de eicel leidt tot CIN in het vroege embryo. De “maternal to zygote” overgang is een geleidelijk proces dat zich bij de mens van het 4- tot in het 8-cellige stadium voltrekt (fig 43). Een voor de hand liggende gedachte is dat de hormonale inductie van superovulatie mogelijk mede leidt tot het vrijkomen van onrijpe eicellen die niet goed in staat zijn om de vroeg embryonale ontwikkeling te ondersteunen. Variatie in eicellen speelt in de eerste periode inclusief de MtZ tot in het 8-cellige stadium een veel grotere rol dan variatie in zaadcellen. Het mindere belang van selectie voor de zaadcel wordt niet beter gedemonstreerd dan door het succes van ICSI, en dan met name TESE, dat bereikt wordt met artificieel verkregen zaadcellen: de kansen op conceptie bij een eerste terugplaatsing zijn niet veel lager dan met gebruik van geëjaculeerde zaadcellen.

Op een wetenschappelijke bijeenkomst september 2019, in de ReeHorst in Ede, presenteerde Tom Stout van de veterinaire faculteit in Utrecht zijn resultaten van IVF bij het paard.

Ik was me er nooit van bewust geweest dat deze toepassing zo'n omvang had, maar kennelijk spelen kostenoverwegingen hierbij geen rol, zeker niet wanneer het geproduceerde nageslacht veel geld waard is.

Bij paarden wordt er niet gesuperovuleerd. Er zijn in het laat folliculaire deel van de cyclus genoeg eiblaasjes groter dan 8 mm op het oppervlak van het ovarium te vinden, waar met behulp van een soort van schraaptechniek de eicel-cumuluscel complexen (H11.1, H13.7, fig 29) uit los te weken zijn (dit wordt "ovum pick up" genoemd). De zo verkregen eicellen verkeren in het specifiek vrouwelijke diptoteen (H11.1, H11.2, fig 28) en zijn na rijping niet geschikt voor de klassieke IVF protocollen, waarbij ze in contact worden gebracht met een overmaat aan bewegende zaadcellen. Bij het paard is ICSI regel. Tom presenteerde de resultaten van 1337 cycli, de jaren 2014-2019 overspannend. In de laatste drie daarvan behaalde zijn groep een kans van 75% op een veulentje na het terugplaatsen van een blastocyst (maar het verkrijgen van een goede blastocyst is een stuk lastiger dan bij de mens). Vanaf de leeftijd van 16 jaar liep de opbrengst aan eicellen gestaag terug maar ook in merries ouder dan 20 jaar waren er groeiende follikels met eicellen aanwezig. De populatie was divers en bestond uit dieren met fertiliteitsproblemen en ook paarden waarmee men na een sportcarrière wilde fokken.

Het biologisch meest significante aspect van ART bij het paard is dat in een populatie waar het klinisch aspect niet alles domineert, er een begin is van een meer statistische benadering van de variatie in de blastocyst opbrengst, met name van de parentale effecten van hengsten en merries. Zo kon Tom overtuigend aantonen dat de invloed op de variatie voor hengsten kleiner is dan voor merries. Bij de merries had dit bijvoorbeeld te maken met de opbrengst aan eicellen bij de "pick up".

Ook vonden ze in Utrecht een aanwijzing voor de interactie tussen merrie en hengst in de zin dat het wisselen van hengst voor de voortplanting van de merrie voordelig kon zijn. Vroeger, op het platteland kon ik me er over verbazen hoe bij sommige boerderijen en paarden er ieder voorjaar weer een veulentje was. Merries dragen 11 maanden en worden al snel, in de eerste periode van hengstigheid na de geboorte van het veulen gedekt. De goede IVF resultaten uit het Utrechtse onderzoek konden wel eens iets te maken hebben met deze relatief korte "time to pregnancy" en de herhaalbaarheid, die je bij natuurlijke reproductie kunt zien.

16.4 Vergelijkingen met spontane vruchtbaarheid

Uit de vorige paragrafen kun je opmaken dat de grens tussen spontane vruchtbaarheid en het toepassen van ART niet altijd scherp te trekken is. Dat is bijvoorbeeld zo voor onbegrepen infertiliteit en voor wisselende spermatellingen. En ook bij spontane vruchtbaarheid is de variatie groot. In de wereld van de gynaecologie geldt 60% per cyclus zo ongeveer als de maximale kans op een doorgaande zwangerschap, een kans die alleen is weggelegd voor super fertiele stellen. Een figuur die voor de hele populatie de zwangerschapskansen per opvolgende cyclus weergeeft werd in 2003 afgedrukt als onderdeel van een "clinical review" in het British Medical Journal. Het bijbehorende plaatje (fig 46) kwam al eerder ter sprake in hoofdstuk 16.1. Na één cyclus is ongeveer 30% zwanger en na 2 cycli is dit rond de 50%, daarna wordt het moeizamer. Weer komt dezelfde vraag op: stel je voor dat je ditzelfde plaatje kunt maken voor het eerste en het tweede kind, hoe groot zou dan de kans zijn dat het dezelfde koppels zijn die de opeenvolgende punten van de grafiek bevolken? Is snel zwanger worden een voorspeller? Laten we aannemen dat partners elkaar uitzoeken zonder daarbij enige vorm van intuïtie te hebben voor ieders reproductieve capaciteit. Het percentage minder vruchtbare mannen (met een fertilitetsspectrum variërend van azoosperm tot verminderd vruchtbaar met een normaal spermioogram) kan in de populatie tot zo'n 10% oplopen (fig 36). Dan is de fractie vrouwen die in één keer zwanger kunnen worden al met dat percentage onderschat. Daarna kun je voor de hele populatie correcties toepassen op leeftijd en andere voorspellers zoals BMI. Haal je dan wel de in de gynaecologie geaccepteerde schatting van maximale vruchtbaarheid van 60% per cyclus? En wat is de statistische spreiding van die schatting? In hoofdstuk 11.5 over eicelkwaliteiten heb ik, om hier een ingang te vinden het begrip **Maternal to Zygote overgang** geïntroduceerd. Dit is daarna in hoofdstuk 13.5.3 en in dit hoofdstuk (H16.3.2) verder uitgewerkt. Wanneer je teruggrijpt naar de centrale vergelijking in de kwantitatieve genetica ($P = G + E$, H6.1) kun je als eerste aannemen dat de genetische variatie ook geldt voor het begrip eicelkwaliteit en dus ook voor vruchtbaarheid per cyclus (H11.5). Iedere celbiologische functie heeft zijn eigen genetica. Bij de vrouwelijke vruchtbaarheid is het aantal genen dat erbij betrokken is groot (rond de 8500 met een duidelijke expressie in het ovarium), maar het aandeel dat er meer exclusief voor is, laag is vergeleken met de testis (H12.5.2). Er is dus een meer dan voldoende platform voor genetische variatie, die tenslotte aanzienlijk is (H3, tabel 3). Dat blijkt bij (andere) zoogdieren ook uit selectie-experimenten op worpgrootte bij de muis en uit het feit dat ondanks een lage erfelijkheidsgraad (de h^2 , H6.1) in

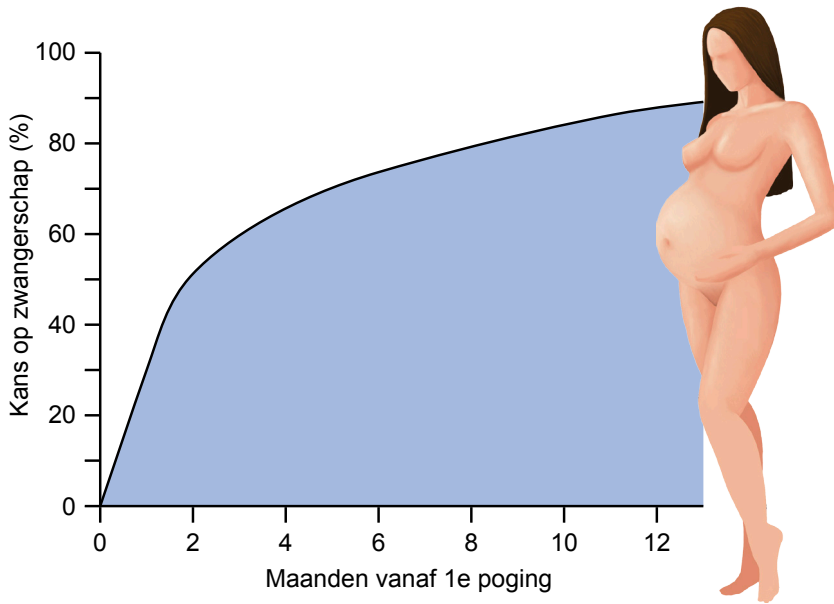


FIG 46

De cumulatieve kans op zwangerschap tijdens het eerste jaar als in 2003 door het British Medical Journal in een overzichtsartikel gepubliceerd.

de rundveefokkerij selectie op vruchtbaarheidskenmerken mogelijk is (vw. de grote fenotypische spreiding van dit kenmerk).

Naast de celbiologische aspecten van de eicel komen in vruchtbaarheid nog veel meer biologische functies samen, zoals het gedrag dat reproductie mogelijk maakt, hormonale functies en “het milieu”. Aan de hormonale- en milieu-aspecten besteden we in dit boek nauwelijks tot niet veel aandacht, maar voor “het gedrag” wil ik meer anekdotisch toch een uitzondering maken, ook omdat het een rol speelt bij het zoeken van toegang tot ART. Overigens is dit het terrein voor specialisten zoals de seksuoloog.

Hier een eerste voorbeeld dat in 2004 werd gepubliceerd door een groep Amerikaanse onderzoekers met een relatie tot het National Institute of Environmental Health Science in Durham, North Carolina. De bij dit onderzoek betrokken 285 vrouwen, vaak met een universitaire

achtergrond, en rond de 30, hielden hun seksueel gedrag in 867 cycli bij. Door het meten van de metaboliëten van **oestrogenen** en progesteron in de urine konden de onderzoekers het moment van ovulatie schatten (H13.4). In het folliculaire deel van de cyclus (fig 40) steeg de frequentie van geslachtsgemeenschap om op de dag van de ovulatie sterk af te nemen. Dat klopt dus aardig wanneer zwanger worden het doel is. Maar uit hun analyse kwam nog iets anders naar voren. De data suggereerden dat gemeenschap ovulatie kon induceren. Om dat verder te onderzoeken, werden de gegevens op een andere manier geanalyseerd, namelijk op basis van de sterkte van seksuele activiteit in het weekend: hoe frequenter dat plaats vond, hoe groter de kans op een ovulatie van zondag t/m dinsdag.

Nu het tweede voorbeeld dat al heel oud is. Verschijnselen rond de reproductie kunnen zeldzaam zijn, maar in de natuurlijke gesteldheid van de mens is er veel mogelijk. Iets daarvan is in 1916 door W. Pryll in het Muenchener Medizinische Wochenschrift gepubliceerd. Bij echtparen waarvan de man aan het front verbleef en op verlof naar huis kwam, en waarvan de vrouwen de menstruatie bijhielden, werd gevraagd naar het geslachtverkeer. Een op zijn minst eenmalige coitus leidde in deze populatie, die door deze "Assistent der Kliniek" van de Universitäts-Frauenklinik in Erlangen is geanalyseerd, tot 713 zwangerschappen.

De conceptie, die al vanaf dag 2 van de cyclus mogelijk bleek, piekte over de dagen 6-12 na het begin van de menstruatie maar kon, geleidelijk afvlakkend, tot 30 dagen erna nog plaatsvinden. De opmerking dat wij toch geen konijnen zijn ligt natuurlijk voor de hand, maar je kunt je ook voorstellen hoe deze mensen naar elkaar verlangd hebben, waarbij passie een rol speelt. Hoe het ook zij, bij het betreden van een IVF traject is er meestal geen sprake meer van natuurlijk gedrag, en de stimulerende kant daarvan.

Bij vrouwen die bij herhaling snel zwanger worden speelt de genetische aanleg een rol, en die genetische aanleg heeft ook te maken met het rijpingsproces van de eicellen voorafgaand aan de ovulatie. Wanneer de kwaliteit van dat proces dan de voornaamste beperker van de vruchtbaarheid is, geloof ik dus niet in die maximale vruchtbaarheid van 60% per cyclus.

16.5 *De novo* mutatie bij ART nakomelingen

IVF is ingevoerd en snel geaccepteerd geraakt zonder een degelijke op proefdieronderzoek gebaseerde onderbouwing. Terugkijkend kun je stellen dat dat ook niet echt mogelijk was gezien de vrij grote biologische verschillen tussen de voortplanting van de muis of andere diersoorten en de mens. Ook celbiologische technieken en DNA technologie waren in de periode 1970-

1980 tot in het begin van deze eeuw nog niet voldoende ontwikkeld om behulpzaam te zijn in het beoordelen van eicellen, zaadcellen en jonge embryo's. Zoals al langs is gekomen heeft de groei in het aantal verwijzingen voor ART vooral een urologische achtergrond. Dat is mede het gevolg van de verdere zoektocht naar de zaadcel die zich achter een blokkade in het afvoerend systeem had verstopt of niet meer in staat was de epididymis of de testis (fig 31) te verlaten, wat leidde tot PESA en TESE. Als gevolg van deze ontwikkeling was het zaak om snel goed onderzoek te doen naar het verloop van de zwangerschap, de geboorte en de eventuele aanwezigheid van congenitale afwijkingen. Alle reviews over de kenmerken van reproductie met behulp van IVF/ICSI rapporteren een gemiddeld wat lager geboortegewicht en een licht verhoogde frequentie van wat vroegere geboorten. Alhoewel deze verschijnselen zich het meest duidelijk voordoen bij meerlingen (waar er nu niet meer zo veel van zijn, H16.3), zijn ze toch ook bij eenlingen zichtbaar. Van meet af aan was er een focus op een eventuele stijging van het percentage kinderen met een aangeboren afwijking. In de literatuur vind je voor de natuurlijke voortplanting een getal van rond de 2%, maar naarmate er beter wordt gekeken lijkt dat percentage te stijgen (zie H18.1). In de vaktijdschriften verschenen er indicaties dat dit percentage bij ART wat verhoogd is, maar andere onderzoekers betwistten dit weer. De op dit moment laatste en grootste meta-analyse omvat een bestand van 167 publicaties waaruit er 48, verschenen tussen 1995 en 2012, beantwoorden aan de kwaliteitseisen die door de onderzoekers waren opgesteld. In totaal 112.913 kinderen die geboren zijn na klassieke IVF of ICSI werden in de studie vergeleken met 4.471.368 spontaan verwekte kinderen. Het uit deze gegevens berekende relatieve risico op een kind met een congenitale afwijking na ART was 1,40 met een 95% betrouwbaarheidsinterval van 1,31-1,49. De IVF kinderen en de ICSI kinderen verschilden hierin niet. Wanneer het risico voor ART tweelingen werd vergeleken met dat van "spontane" tweelingen was het verschil kleiner en statistisch niet afgegrensd. Wat zou dit alles biologisch kunnen betekenen? Is er een genetische en/of epigenetische verklaring voor te geven?

Laat ik me (zie de kop van deze paragraaf) eerst maar op de relevante genetische kennis hierover concentreren. In 2002 verscheen er een voor die tijd veelomvattend onderzoek waarin met behulp van de klassieke **cytogenetica** naar chromosoomafwijkingen (H3.4) werd gespeurd in vruchtwatercellen en chorion villi bipten (**foetaal** placenta weefsel) van vroege zwangerschappen na een ICSI behandeling. Het werk werd uitgevoerd aan de Vrije Universiteit Brussel, waar ICSI is ontdekt (H16.1) en was een samenwerking tussen het IVF lab en het laboratorium voor medische genetica van dezelfde universiteit. Meestal kwam de ingespoten zaadcel uit het ejaculaat. Van de 1586 onderzochte vruchten bleek 3% een chromosoomafwijking te hebben

waarvan in ongeveer de helft (1,5%) van de gevallen deze niet bij de ouders voorkwam (vergelijk met tabel 4). Ongeveer twee derde hiervan (1%) waren afwijkingen in het aantal chromosomen, de helft voor de **sex chromosomen** en de ander helft voor de **autosomen**. Een derde, de laatste 0,44%, had betrekking op microscopisch met behulp van chromosoombandering vast te stellen structurele chromosoomafwijkingen (H3.4). Dit zijn grotendeels reciproke translocaties (H3.4.1, fig 12) die bij de mens opvallend veel voor komen (tabel 4) en een enkele keer gepaard kunnen gaan met een **fenotype** bijvoorbeeld mannelijke in- en subfertiliteit (H12.12.1, fig 37). Meestal is er echter geen fenotypische aanwijzing. De aanzienlijke peri implantoire sterfte die ermee gepaard gaat valt zoals gemeld bij de mens niet op (H3.4.1) en bij vrouwen met een herhaalde miskraam worden ze dan ook niet vaak gevonden. De reden waarom reciproke translocaties zo interessant zijn voor een geneticus is gelegen in het feit dat ze het gevolg zijn van dubbelstrengs DNA breuken. Ze zijn op te vatten als het resultaat van een manmoedige poging van de zygote (of vroege blastomeer) om die breuk te repareren (H13.5.2). Een andere bijzonderheid is dat reciproke translocaties vooral plaatsvinden tussen de chromosomen van de vader. Op basis van de klassieke cytogenetica weten we dat al sinds 1988 en wanneer daar nu goed naar wordt gekeken met moderne NGS technieken wordt dit beeld bevestigd. Op basis van de klassieke data uit humane cytogenetica (tabel 4) is de inductie van reciproke translocaties in deze serie uit Brussel met ongeveer een factor 10 verhoogd.

Mogelijk verhoogd ICSI dus de kans dat dubbelstrengs breuken in zaadcel DNA in de eicel terechtkomen. Minder geslaagde herstpogingen door de DNA reparatiemachinerie van de eicel kunnen dan resulteren in onnatuurlijk veel reciproke translocaties (fig 12) in zygotes en de daaruit gevormde embryo's. Helaas is het merendeel van de momenteel beschikbare platformen voor onderzoek aan het hele genoom (**WGS** op basis van "short read sequencen") niet goed in het detecteren van uitwisselingen van hele segmenten tussen chromosomen. Het is niet onmogelijk, maar wel bewerkelijk. De verdere ontwikkeling van de DNA sequence technieken, waardoor de basenvolgorde van langere DNA fragmenten in één keer uitgelezen kan worden ("long read sequencen", H3.3) is gelukkig in opkomst en zal de mogelijkheden hierin enorm verruimen.

Waar de huidige standaard DNA analysetechnieken wel goed in zijn is in het detecteren van veranderingen die een afwijking van de diploïde dosis opleveren zoals deleties, duplicaties en *de novo* "**copy number variation**" (CNVs, H3.3). Ook basenpaar veranderingen, de *de novo* SNPs (H3.2) kunnen nu accuraat worden gedetecteerd. Maar deze laatstgenoemde aanpak, waarmee goed DNA replicatie-onnauwkeurigheden (fig 5) en de belasting van het BER DNA herstelsysteem (fig 33) uit te lezen zijn, is tot nu toe nog nauwelijks benut om een betrouwbare

vergelijking te maken tussen mutatiefrequenties bij spontane voortplanting en het gebruik van ART. Een recente vanuit het Radboudumc gepubliceerde pilot studie, die gebruik maakt van “trio sequencing” laat voor kinderen die geboren zijn m.b.v. TESE geen verschil met de controle groep zien.

Een studie die zich voornamelijk richtte op de incidentie van *de novo* chromosomale instabiliteit (de dosis afwijkingen die onder CIN vallen) en waarin natuurlijke conceptie (62 kinderen/families) werd vergeleken met ART (49 kinderen en hun ouders), zag november 2019 het licht in Nature Medicine. Deze studie haalde daarna ook vlot het wetenschapsnieuws in de kwaliteitskrant. Op basis van het voorkomen van CIN in zeker de helft tot de meerderheid van de IVF embryo's *in vitro* (H16.3.1) verwachtten de onderzoekers meer CNV in de ART kinderen. Opmerkelijk genoeg, werd dit niet gevonden. Omdat er vele plekken in het genoom zijn waar CIN, bijvoorbeeld als CNV kan optreden (H3.3, tabel 3), heb je minder families nodig om een betrouwbare uitspraak te kunnen doen. Het feit dat er geen verschillen werden gezien is bemoedigend en vestigt een gerechtvaardigde hoop op de effectiviteit van het selectieve voordeel, waardoor embryonale cellen met een “normale” genoomstructuur het best overleven. Relatief kleine afwijkingen hebben daardoor minder kans om zich blijvend in het embryo te vestigen.

Ons inzicht hierin is echter nog niet compleet, want een genoom-brede vergelijking van **mutatiefrequenties** tussen ART en niet ART kinderen ontbreekt tot op heden (zie tabel 3 voor de gebruikelijke indeling van mutatie typen). Kortom, we weten op dit moment niet of de *de novo* mutatie frequentie, over het hele spectrum gemeten, na de verschillende vormen van ART mogelijk toch verhoogd is. Omdat de patiëntenpopulatie zo heterogeen is, is het onderzoek lastig. Allereerst is men natuurlijk geïnteresseerd in de mutatie-incidentie in de kinderen van oudere vrouwen en oudere mannen met extreem weinig zaadcellen van een mindere bewegelijkheid in de bijbal (PESA) of in het ejaculaat. Ook zou je wel willen weten of de congenitale afwijkingen bij ART in eenzelfde spectrum van syndromen vallen als bij de natuurlijke voortplanting. In de eerder genoemde Nederlandse vergelijkingsstudie voor kweekmedia (H16.2) die 300 baby's omvatte, had 3% een “major malformation” en 4% een “minor malformation”, geen mededeling die je, zonder er een gevoel bij te hebben, tot je neemt. DNA (en chromatine) gericht vervolgonderzoek aan deze typen afwijkingen, zou mogelijk antwoorden kunnen geven op de vragen die momenteel toch nog leven over genetische risico's, die gekoppeld zijn aan het gebruik van IVF/ART op een zo grote schaal.

16.6 Zijn er epigenetische veranderingen bij ART?

De eerste indicaties voor epigenetische consequenties, die aan ART verbonden kunnen zijn, verschenen in de jaren 90 in de vorm van “case reports” over zogenaamde **imprinting** ziekten (H10). Van een select gezelschap van genen komt of de maternale of de paternale kopie in het embryo en/of later tot expressie. De epigenetische code voor de regulatie van de expressie van het **allel** van iedere ouder wordt in de **kiembaan** van vader of moeder verankert en is af te lezen uit de CpG methylatiestatus van de ICR (H10, fig 27). Tijdens het “resetten” van het **chromatine** in de periode vanaf het zygote stadium tot aan het blastocyst stadium moeten de ICRs hun methylatiestatus behouden (H9, H10). De meeste observaties die hier relevant zijn, zijn gedaan aan een regio met de complexe afkorting KCNQ1OT1, de ICR die betrokken is bij het Beckwith-Wiedemann syndroom. De imprint is maternaal, d.w.z. dat de maternale kopie van deze ICR gemethyleerd is. In de niet-ART populatie is de frequentie van deze ziekte iets van 1:14.000, dus zeldzaam. Bij een aantal geboorten van ongeveer 170.000 per jaar in Nederland zijn er rond de 12 kinderen aangedaan. Een conservatieve schatting van de relatieve toename door ART is een factor 4. Wanneer 1 op de 30 kinderen met behulp van ART wordt geboren verwacht je een toename van 1 à 2 kinderen met dit syndroom per jaar. Zoekend naar de moleculaire oorzaak van Beckwith-Wiedemann t.g.v. ART, kwam men er achter dat die meestal gelegen was in het niet kunnen behouden van de methylatiestatus van de betrokken ICR. Er treedt “loss of methylation” op. De oorzaak hiervoor moet waarschijnlijk gezocht worden in de periode van *in vitro* kweek (fig 23). Maar ook de kwaliteit van de eicel komt in beeld want het behoud van imprinting is gelinkt aan de “maternal to zygote” transitie (H13.5.3, fig 24).

Vanaf 2000 verschenen er publicaties over de invloed die gebruik van reproductie technologie kan hebben op het behoud van imprinting bij de muis. De methylatie-status van de ICR van de paternaal geïmprinte Igf2-H19 cluster (fig 27) was daarbij het meest onderzochte studieobject. Het overall beeld van deze studies is dat de efficiëntie van het handhaven van de methylatiestatus van de ICR bij IVF gerelateerde ingrepen, waaronder superovulatie, vermindert is. Dit geldt sterker voor het embryonale deel van de placenta dan voor het embryo (het extra-embryonale deel ervan). In feite herhaalt dit beeld zich bij de mens.

Wanneer de met de muis werkende onderzoekers op bezoek gingen bij hun humane confraters stonden ze er wel eens van te kijken hoe weinig indruk hun resultaten daar maakten.

De meest aanschouwelijke demonstratie van epigenetische beïnvloeding door superovulatie en/of *in vitro* kweek (van zygote tot blastocyst) is te vinden bij het A^v systeem (H15.2.2, fig 45)

van de muis. De vachtkleur van met IVF verkregen A^{y}/A nakomelingen van A^{y}/a vaders en gesuperovuleerde muisgrijze A/A moeders is duidelijk lichter van kleur dan dat van natuurlijk verkregen A^{y}/A nakomelingen. Normaal heeft de paternale promotor van het A^{y} allel geen epigenetisch geheugen, maar reageert nu wel op de onnatuurlijke condities van superovulatie en verblijf in het kweekmedium.

Is het genetisch onderzoek door technologische ontwikkelingen in een stroomversnelling gekomen (H3), voor het onderzoek naar de betekenis van de **epigenetica** is dit ook het geval. Om het **methyloom** te bepalen kunnen gemethyleerde cytosines (fig 11) na een chemische modificatie onderscheiden worden van de niet gemethyleerde en op een chip worden uitgelezen (H15.5). Recent verschenen twee publicaties waarin een dergelijke analyse in de sfeer van NGS in een ART setting zijn uitgevoerd. In de eerste wordt een vergelijking gemaakt tussen genoom methylatie in pasgeborenen en volwassenen van tussen de 22-35 jaar oud. De andere studie concentreerde zich op het genomische DNA in de placenta. Het genoom bevat rond de $29 \times 10,6$ CpGs. Voor het meten van de methylatiegraad bij baby's en volwassenen werd een 850k chip gebruikt en voor de placenta een 450k chip. Beide types chips zijn verrijkt voor de CpG rijke promotor regio's van genen (H2.3.3). De grotere 850k chip pakt daarnaast ook (m)CpGs op die verderop rond de genen zijn gelegen en die bij de regulatie ervan betrokken zijn. Ook is deze chip geschikt voor het bepalen van de methylatiestatus van de "imprint control regions" (ICRs, H10). De onderzoekers die het genomische DNA van dezelfde mensen op baby en volwassene bestudeerden, zagen dat er in de ART groep bij de geboorte wat meer variatie in het niveau van CpG methylatie was maar dat dit op volwassen leeftijd grotendeels was verdwenen. Hun cohort van 193 ART en 86 controle geboorten was gezond. Op de 450k chip, waarop DNA van 44 ART bevallingen en 44 controles werd geanalyseerd, werd in de placenta's van de ART groep een grotere variatie gevonden (en dat lijkt, zie hiervoor, dan weer op de muis). Ook afwijkende beelden, die door de onderzoekers als "outliers" werden betiteld, werden in deze groep vaker gezien. Dit had te maken met de bekende ICRs van imprinting gen clusters (fig 27), maar dat niet alleen. Opmerkelijk was dat in deze placenta's binnen de ART groep het methylatiepatroon van het genomische DNA na ovulatie inductie en IUI onderscheiden kon worden van het patroon na ICSI. Ook vonden ze methylatie-voetafdrukken, die samenhangen met de leeftijd van de vader en met een verminderde **spermatogenese**. Of dit voor het kind van blijvende biologische betekenis is weet je niet. Bij de huidige stand van onderzoek en inzicht blijft het moeilijk om te bepalen of de verschillende technologische uitvoeringen van ART ieder een "eigen" kenmerkende epigenetische signatuur induceren. De eerste aanwijzingen hiervoor zijn er echter wel.

Hadden we het eerder in hoofdstuk 16.2 over het effect van het kweekmedium op het geboortegewicht, onderzoek in het eerste decennium van deze eeuw aan de Vrije Universiteit Amsterdam naar de ontwikkeling van reageerbuisbaby's tot adolescenten, rapporteerde subtiele effecten op bloeddruk en glucose tolerantie/insuline gevoeligheid. Ook bij de muizen ART proeven is dit gevonden. Nog vermeldenswaard is het verschil in sex ratio. Bij conventionele IVF worden er meer jongetjes geboren dan bij ICSI, ook na terugplaatsing van iets verder ontwikkelde blastocysten lijkt dat het geval te zijn. In 1993 rapporteerde onderzoeker Paul Burgoyne uit Engeland dat bij de muis mannelijke embryo's voor de implantatie sneller delen. Zo zou er in het lab bij terugplaatsing op geselecteerd kunnen worden. Als dit verschijnsel zich ook bij menselijke embryo's voordoet, verklaart dit het verschil tussen IVF en ICSI niet.

De celbiologische betekenis van DNA methylatieverschillen zijn, zoals eigenlijk al in hoofdstuk 15.5 aangegeven, voor grote delen van het methyloom, (bijvoorbeeld voor posities die niet meteen met de regulatie van de transcriptie te maken hebben) nog steeds niet gemakkelijk te duiden. In de nabije toekomst zal door de enorme toename van data ook hier het inzicht groeien. De verwachting is dus gerechtvaardigd dat we voor het bereik gezondheid en voor het verklaren van fenotypische variatie spoedig meer zullen weten over de mechanistische achtergronden van de hiervoor geschetste verschijnselen.

16.7 Nog meer ART?

In de Els Borstlezing van 2018, uitgesproken door Annelien Bredenoord, in die tijd hoogleraar medische ethiek van biomedische innovatie van het UMC Utrecht, werd aandacht besteed aan de wens tot uitbreiding van kunstmatige voortplantingstechnieken. "Er zijn geen metafysische of natuurlijke grenzen aan de mens, en wat we dus nu als een verantwoorde streep definiëren, hoeft dat over 20 jaar niet meer te zijn" stelt zij. In het kielzog hiervan wordt de reproductietechnologie door haar breed omarmd. Voor eenieder en voor iedere samenlevingsvorm horen er mogelijkheden te zijn. Dat betekent dat er voor ethici werk aan de winkel is. De experimenten bij de muis met *in vitro* **gametogenese** vanuit in het lab geïnduceerde **pluripotente** stamcellen (iPS cellen, lichaamscellen die worden teruggesprogrammeerd, box 2) vormen momenteel de grote inspiratiebron voor iedereen die vindt dat alles "maakbaar" moet zijn. Dan kunnen we immers het probleem van het "tekort-aan-eicellen" in de menselijke voortplanting (voor onderzoek en behandeling) eindelijk eens oplossen. Ook zou dit mogelijkheden openen voor reproductie binnen paren van hetzelfde geslacht. En er zijn natuurlijk voldoende onderzoekers te

vinden die altijd bereid zijn, wanneer de maatschappij daarom vraagt, hiervoor een onderzoeksvoorstel te schrijven in de verwachting dat dit vervolgens vanuit het nationale circuit voor evaluatie en financiering van wetenschap wordt gehonoreerd. In 2011 verscheen in het solide vakblad *Biology of Reproduction* al een artikel over een procedure om te komen tot nakomelingen van twee vaders, waarbij toen door ons, op verzoek, een commentaar is geschreven. Het gepresenteerde genetische schema klopte, maar de biologische inzet van de vrouw bleef voortdurend nodig en het hele verhaal kwam daarmee uitermate onnatuurlijk over. De spermatogenese met 2 X chromosomen (voor de lesbische paren) loopt al vast op het niveau van de stamcelspermatogonia (H12.12.1, tabel 6).

Het vlot trekken van de **oogenese** met 1 X chromosoom (voor de mannen) is mogelijk iets minder sterk biologisch gecontra-indiceerd (H8), maar het XY vrouwelijke muismodel niet fertiel.

De wereld van de kunstmatige voortplanting kent wel een sterke drive naar het mogelijk maken van fertiliteit voor eenieder met liefst genetisch “eigen” nageslacht. Hier wat voorbeelden. Bij mannen die tijdens de spermiogenese geen **acrosoom** aanleggen hebben de zaadcellen een ronde kern (een globospermie, tabel 6, met dikwijls een genetische diagnose). Deze zaadcellen activeren de eikel niet (H13.5.1). De hiervoor nodige Ca^{2+} pieken kunnen echter ook kunstmatig worden opgewekt. De behandeling, die daarop berust is internationaal (bijvoorbeeld in België) al enige tijd geaccepteerd en wordt sinds kort nu ook in Nederland aangeboden. Biologisch nog wat meer op het randje is het volgende. Er zijn mannen die een blokkade hebben in of rond het stadium waarin de metamorfose van een rond spermatide naar een zaadcel met een solide protamine pakking van het DNA optreedt (H12.6). Hoogstwaarschijnlijk speelt een genetische afwijking hierbij een rol (H12.12). Rond eind jaren 90 verschenen er artikelen over de betrouwbare microscopische identificatie van de ronde spermatiden van deze mannen in een nat preparaat van een testisbiopt, wat niet makkelijk is. Het doel was natuurlijk om de losgeprepareerde spermatiden in een eikel te injecteren. In Japan is deze hele procedure verder ontwikkeld en sinds 2016 biedt dit een nieuwe mogelijkheid om onvruchtbaarheid te behandelen. In een publicatie uit 2019 is beschreven hoe 90 baby's op deze manier zijn verwekt. Een erg efficiënte procedure is het niet, met een kans van slagen die nogal wat lager is dan bij een ICSI met testiculair zaad bij een niet obstructieve azoospermie (TESE, H16.1, H16.3.2).

Proefdieronderzoek met muizen heeft onze inzichten in het lot van ronde spermatiden in de eikel nog wel vergroot. Bij de muis is de injectie van ronde spermatiden net als ICSI technisch moeilijker, maar wel mogelijk. In een studie hiermee uitgevoerd in 2016 in het lab van Willy Baarends van het Erasmus MC te Rotterdam werd aangetoond dat de eikel echt anders met

het chromatine van een rond spermatide omgaat dan met een normale zaadcel. Voor de hand liggend maar je moet het wel eerst bewijzen. Ook het feit dat je aan mensen of muizen die geboren worden na injectie met ronde spermatiden in eerste instantie niets afwijkends ziet bewijst natuurlijk niet dat er sprake is van een normaal verloop van alle lichaamsfuncties. En dan blijft er nog de vraag of zich wellicht ook op de lange termijn problemen zullen voordoen, bijvoorbeeld in de groei naar volwassenheid of tijdens veroudering.

Gedegen vervolgonderzoek naar de “veiligheid” van iedere nieuwe loot aan de boom van de kunstmatige voortplantingstechnieken blijft dus geboden. Helaas is op basis van proefdieronderzoek veel niet goed voor de mens te evalueren.

Laat me nog even terugkeren naar de Els Borstlezing van 2018, met die belangstelling voor *in vitro* gametogenese uit terug geprogrammeerde lichaamscellen. Zoals in een recent overzicht over *in vitro* gametogenese van leidend onderzoeker Katsuhiko Hayashi uit Japan te lezen is, stond dit onderwerp al heel vroeg in de belangstelling. Hij haalt experimenten uit 1920 aan waarin geprobeerd werd om stukjes testisweefsel buiten het lichaam te laten functioneren. Pas veel later werd een echte boost aan dit soort van onderzoek gegeven, na de ontdekking van de “induced” pluripotente stamcel (iPS, box 2) en de ontwikkeling van diverse manieren om deze zich *in vitro* te laten differentiëren en specialiseren.

Kennis hierover gaat de strekking van dit boek grotendeels te buiten. Wel is in hoofdstuk 7 uitgelegd hoe dit biologische gereedschap vooral bij de mens gebruikt is om het begin van de kiembaan vanuit de embryonale epiblast te reconstrueren (fig 43).

Bij *in vitro* gametogenese moet er in de iPS cellen eerst specificatie worden geïnduceerd (H7) waarna de langdurige processen van oogenese en spermatogenese tot aan de vorming van functionele gameten buiten het lichaam plaats vinden. De hierbij benodigde hulpcellen, zoals de Sertoli-, granulosa- en overige follikelcellen (fig 31 en fig 28), moeten of uit natuurlijk weefselmateriaal geogst worden, of idealiter ook *in vitro* via een stamcelmodel worden gegene-reerd. In 2016 werd door de groep van Katsuhiko Hayashi in Nature beschreven hoe vanuit iPSC (geïnduceerde pluripotente stamcellen, in dit geval afgeleid van embryonale bindweefselcellen of van fibroblastcellen uit een staartpunt) iPGCLCs (“induced pluripotent germ cells like cells”) gewonnen werden die op hun beurt weer werden gebruikt om de oogenese *in vitro* mogelijk te maken. Met behulp van hulpcellen die waren geïsoleerd uit het embryonale ovarium, ontwikkelden zij een systeem dat *in vitro* eicellen produceert. Na de meiose te hebben doorlopen en te zijn bevrucht, konden deze eicellen tot volwassen muizen uitgroeien. In de literatuur wordt een dergelijk resultaat een “proof of principle” genoemd, het bewijs dat het kan. Maar kijk je

naar de details in de publicatie, dan geven de auteurs een aantal hele serieuze indicaties voor biologische problemen. Problemen die veelvuldig vanaf de bevruchting in het prenatale traject optreden en leiden tot een bijzonder lage efficiëntie van het proces. De muizen die geboren werden zijn ook niet nagekeken op genetische of epigenetische veranderingen. In een uitgebreid overzicht van oktober 2021 rapporteren de Japanse onderzoekers over de vooruitgang en huidige stand van zaken, inclusief het klinisch perspectief. Duidelijk zijn ook nu de problemen met de *in vitro* oogenese techniek nog niet opgelost. Maar men zit vooral in Japan niet stil. In september 2021 rapporteerde de groep van Mitinori Saitou voor de mannelijke kiembaan over de geboorte van normaal functionerende muizen, die m.b.v. *in vitro* spermatogenese verkregen uit embryonale stamcellen waren gegenereerd. Waar eerder in de ingewikkelde proefopzet de *in vivo* situatie nog steeds een grotere of kleinere rol speelde, werd nu de spermatogenese tot aan het ronde spermatide stadium *in vitro* volbracht. Na injectie van de ronde spermatiden in eicellen werden er levende muizen geboren, waar op het eerste oog niets bijzonders aan op te merken was. In deze kleine proef werd opnieuw “proof of principle” verkregen. De vraag die er bij dit soort van proeven altijd blijft bestaan is of *in vitro* de kiembaan wel afdoende beschermd is. Immers, celbiologische mechanismen waaronder ook de regulatie van epigenetische karakteristieken (H2.3.2) kunnen zich *in vitro* onder kweekomstandigheden heel anders gedragen dan *in vivo*. Een additioneel probleem is dat de hogere spontane mutatiefrequentie van de bron van de iPS cel, nadat die werd afgeleid uit een **somatische** celpopulatie met daarin ook al extra nieuwgevormde mutaties (zie bijschrift tabel 3), nu rechtstreeks wordt geïntroduceerd in de kiembaan. Hier komt dan ook nog eens de verwachte hogere graad van mutatie *in vitro* bovenop.

De mannelijke gametogenese is in een 100% *in vitro* systeem nog bijna niet te realiseren. Samenvattend stelt onderzoeker Katsuhiko Hayashio dan ook dat er nog een behoorlijk lange weg te gaan is. Maar met welk doel zou deze aanpak moeten worden nagestreefd? Voor het redden van diersoorten die op uitsterven staan, een soort van argument dat in dit soort artikelen vaak wordt genoemd, is milieubehoud immers een eerste en veel belangrijkere voorwaarde. De vraag blijft daarom of voor vele diersoorten deze technologische noodsporg überhaupt wel toepasbaar is en of ze nog wel op tijd komt. Voor een behandelingsmethode met CRISPR technologie (box 3) van een op een genetische oorzaak berustende onvruchtbaarheid bij *Homo sapiens*, is een overgang naar een ART aanpak die volledig berust op *in vitro* gametogenese veel te vroeg. Bovendien kun je hierbij ook terecht de vraag stellen waarom we dit nu of later zouden moeten nastreven.

Milieu invloeden

17.1 Inleiding

Bestaat wanneer het om verstoringen van de vruchtbaarheid gaat het milieu dan helemaal niet meer, de formule was toch $P = G + E$ (H6.1)? Laten we het milieu voor het gemak splitsen in het natuurlijke milieu en het daaraan toegevoegde chemische milieu, het milieu waarin we nu leven: onze omgeving is een mix van natuurlijke omstandigheden en door de mens ingebrachte chemische verbindingen die een risico met zich mee kunnen dragen. Een aan het thema van dit boek verwante discipline is de reproductietoxicologie met als vertakking de genetische toxicologie. Deze subdiscipline houdt zich bezig het **mutagene** aspect van het milieu. Deze kant van de reproductiegenetica is hier alleen didactisch-anekdotisch langs gekomen, met ioniserende straling (H11, 12 en 13) en het stofje BPA (H11) als voorbeelden. De reden hiervoor is dat de complexiteit van de wereld van chromatine versturende stoffen dermate groot is, dat het meer voorkennis vereist dan hier geboden wordt.

Regelmatig halen milieueffecten van chemicaliën de krant, en komt de (mogelijke) mutageniciteit ervan ter sprake. Meestal gaat het dan over een enkele stof of over een groep van verwante stoffen. Maar soms gaat het verder zoals in het interview dat de NRC op 4 maart 2019 afdruckte met de toxicoloog Majorie van Duursen. Dan zitten die zeer waarschijnlijk ook in het ovarium, in de follikels (het aandachtsgebied van Van Duursen) en aan de buitenkant van de bloed-testis barrière (H12.4) in de testikels. De term combinatietoxicologie slaat op de kennis die nodig is om te begrijpen wat zulke complexe mengsels van verbindingen in cellen en weefsels kunnen aanrichten. Het werd gebruikt in een stuk van Rob Bouter in het blad Vogels van februari 2020. In dode mezen en mezenkuikens werden resten van tot 20 lichaamsvreemde stoffen zoals

bestrijdingsmiddelen en onkruidverdelgers aangetroffen, zij het in hele lage concentraties. Die cocktail van stofjes maakt het zo lastig, er is een grote kans dat interacties tussen stofjes een rol gaan spelen bij het bepalen van het uiteindelijke effect, in dit geval de dood. Al in de begintijd van chemische mutagenese studies in Harwell, in de jaren 70-80 van de vorige eeuw, begon Bruce Cattanaach (H12.7) het effect van chemische agentia in de **kiembaan** te combineren met toedienen van ioniserende straling. Zowel het ontwerpen van de proeven als het interpreteren van de proefuitkomsten werd bij maar twee agentia in een behoorlijk hoge dosis een stuk ingewikkelder. De interacties tussen al die verschillende stofjes, ook al hebben ze ieder een lage dosis, zijn nog veel moeilijker te analyseren, zo dat al mogelijk is. Maar het gecombineerde eventuele effect op het **genoom** en op het **methyloom** zou je wel kunnen bepalen.

In hoofdstuk 12.10 zagen we dat de indruk dat de spermaproductie bij de mens terugloopt een wetenschappelijk fundament begint te krijgen. In de voor iedereen toegankelijke database voor biomedische wetenschappelijke artikelen PubMed (van het National Center of Biotechnology Information in Bethesda MD, onderdeel van het National Institutes of Health) zijn artikelen over milieueffecten op de spermaproductie dan ook gemakkelijk te vinden. Het meest waardevol zijn de zogenaamde meta-analyses waarin men probeert alle publicaties over één onderwerp, bijvoorbeeld het effect van geneesmiddelen voor depressie op de spermatogenese, bij elkaar te brengen. Deze worden eerst geschift op een solide proefopzet. Vervolgens wordt het zo geselecteerde onderzoek in een model voor statistische analyse samengevoegd. In veel meta-analyse publicaties vullen humane observaties en die op proefdiermodellen elkaar aan. In de jaren 2018 en 2019 zijn er op het gebied van invloeden op kwantiteit en kwaliteit van het humane zaad meerdere verschenen.

Meestal is er geen eenduidige zwart-wit conclusie, maar wel “accumulative evidence” (zie de inleiding) wat duidt op voortschrijdend inzicht. Hieronder (H17.2-17.4) volgen daarvan wat voorbeelden. Het gaat hier dus niet over nauw zittend ondergoed, zittende beroepen al dan niet in combinatie met overgewicht en ook niet over onderliggend lijden zoals bijvoorbeeld suikerziekte.

17.2 Genotsmiddelen: alcohol, roken en cannabis

Bij een normaal gebruik van alcohol wordt niets afwijkends gevonden. Dit is de conclusie die gebaseerd is op publicaties die tezamen 16395 mannen omvatten. Voor roken ligt het ingewikkelder. Hierover publiceerde het gezaghebbende Amerikaans fertiliteitstijdschrift *Fertility and Sterility* in 2018 een “committee opinion”. Daarin werd naar voren gebracht dat roken schade

toebrengt aan de vruchtbaarheid. Het meest duidelijk is dit voor de vrouw en voor koppels verwezen naar een IVF omgeving. Voor mannen ligt het wat subtieler. Er is een redelijke mate van zekerheid voor een negatief effect, maar dat is niet zo groot, dat een effect op de conceptie makkelijk aan te tonen is. Ook een mogelijk effect van de rokende moeder op de zaadcelproductie van haar zoon wordt genoemd.

Al in de jaren 70 verschenen er studies over een negatief effect van cannabis op de spermatogenese van proefdieren. Het hele veld is in 2019 vanuit de medische wereld nog een keer onder de loep genomen. Dit leidde voor *Homo sapiens* nog niet tot een definitieve afkeuring maar wel tot een oproep aan dokters om de mogelijkheid van een negatief effect te vermelden bij het voorschrijven ervan als geneesmiddel. Ook werd aangeraden naar marihuana-gebruik te vragen wanneer mannen zich aanbieden voor een fertiliteitsonderzoek.

De schadelijke effecten van roken (en cannabis gebruik) en ook van chemische vervuiling in het algemeen worden nu ook in verband gebracht met veranderingen in het methyloom van zaadcellen. In een recent overzicht wordt dit fenomeen gezien als een belangrijk aandachtsgebied voor verder bewijzend onderzoek. Al langer is bekend dat kinderen van mannen die roken een statistisch grotere kans hebben op het krijgen van leukemie. Een onder vakgenoten inmiddels al geaccepteerde verklaring daarvoor is dat roken dus mogelijk ook (epi)mutagene werking kan hebben in de mannelijke kiembaan.

17.3 Chemische en fysische invloeden

Zoals in de inleiding vermeld is de reproductietoxicologie, die ook studie maakt van chemische en fysische invloeden op de overdracht van informatie naar de volgende generatie, een uitgebreid en complex wetenschapsgebied. De reden om er hier toch wat over te zeggen ligt besloten in de observaties die al vermeld werden in hoofdstuk 12.10: de trend naar een verminderde zaadcelproductie in de Westerse wereld. Als hiervoor verantwoordelijke agentia komen de “**endocrine disruptors**” dan al snel in beeld. Maar ook vele zware metalen kunnen onder de noemer “metallo-estrogens” via deze route verstorend werken. Verder is veel aandacht gericht op de verstorende effecten van pesticiden. De chemische verbindingen die inwerken op de vruchtbaarheid worden vaak ingedeeld in twee klassen: persistent en niet-persistent (oftewel makkelijk afbreekbaar). Veel literatuur over deze onderwerpen is epidemiologisch van aard en bestudeert blootstelling tijdens het reproductieve leven. Veel minder artikelen bestuderen het effect van deze stoffen in het embryonale en foetale stadium. Vanzelfsprekend zijn verbindingen die ver-

dacht zijn in het laatstgenoemde stadia ook vaak schadelijk tijdens het reproductieve leven en andersom geldt dit ook. Het gaat hier te ver om een overzicht te geven van de vele chemicaliën met (mogelijk) toxische werking op fertiliteit. In de online referentielijst staan een aantal overzichtsartikelen waarin vele kandidaat-verbindingen worden genoemd. Een meta-analyse met een systematische klasse indeling voor deze verbindingen is mij niet bekend. Voor de meeste geldt dat er sprake is van “accumulative evidence” voor hun betrokkenheid bij de vruchtbaarheid. De aanwijzingen zijn dus niet goed, en passen zo in de betooglijn van Niels Skakkebaek en collega’s (de onderzoeker die de “Testicular Dysgenesis Syndrome” hypothese opstelde, H12.10). In een review uit 2021 worden de (chemische) effecten van het gebruik van fossiele brandstoffen als noemer voor de “infertiliteitsepidemie” (cit.) gepresenteerd, het is een hypothese.

Het onderzoek naar de effecten van geneesmiddelen op de **gametogenese** is moeilijk. Van veel geneesmiddelen is het effect op bijvoorbeeld de spermatogenese nog niet goed onderzocht. Er zijn wel bronnen om te raadplegen zoals het farmacotherapeutisch kompas en Lareb. Voor zover er inzicht is berust deze bij de medisch specialisten, die op de hoogte moeten zijn van de effecten van cytostatica. Een geneesmiddel als de ontstekingsremmer en pijnstillers ibuprofen lijkt verdacht zoals blijkt uit een analyse van zaadmonsters vanuit Jordanië in 2019. Ook geneesmiddelen tegen depressie worden genoemd; negatief maar omkeerbaar.

Het negatieve effect van ioniserende straling is al heel lang bekend en eerder in dit boek voldoende aan bod gekomen. Op proefdierniveau is heel veel aandacht besteed aan de gevoeligheid van de stamcel van de spermatogenese voor straling (H12.7). In de discussies over deze proeven stond vaak de balans tussen DNA herstel en celdood centraal. Al vroeg was namelijk bekend dat ioniserende straling vooral complexe schade aan het DNA toe kan brengen, die met de technieken van de **cytogenetica** als een structurele chromosoomafwijking (zoals reciproke translocaties, fig 12) zichtbaar kan worden gemaakt (H3.4.1, H12.7). Nu kunnen we dit soort onderzoek met behulp van **NGS** complementeren.

In de nakomelingen van de overlevers van de atoombommen op Hiroshima en Nagasaki is op gezondheidsgebied niets opvallends gevonden. Grootschalig genetisch onderzoek met inzet van alle nu beschikbare technieken heeft echter (nog) niet plaats gevonden. Dit type onderzoek, uitgevoerd als “trio sequencing” (H3.2) wordt momenteel wel uitgevoerd op het DNA van kinderen van de redders van de in 1986 ontplofte kerncentrale van Tsjernobyl (de “liquidators”). Op het niveau van de enkele base levert dat geen significant effect op. Maar er zijn wel sterke aanwijzingen dat complexere DNA schade (waaronder reciproke translocaties, fig 12) door een bestraalde man op het nageslacht kan worden overgedragen (zie ook H12.7). Hoe bij de mens

DNA schade (en dan vooral dubbelstrengs DNA breuken) wordt verwerkt door stamcel spermatogonia, die gemiddeld mitotisch niet zo actief zijn, is nog steeds een vraag. Proeven die hier een licht op kunnen laten schijnen zijn alleen *in vitro* uitvoerbaar (H16.7). En hoeveel ruimte laat dit voor de selectie van stamcellen met minder DNA schade en/of een beter DNA herstel, die dan dominantier worden wanneer de tijd tussen belasting en conceptie langer wordt (H12.7)? Overigens zijn de achtergrondniveaus van ioniserende straling zo laag dat die geen rol spelen.

Al enige jaren is er meer aandacht voor de effecten van niet-ioniserende straling die via mobiele telefoons, laptops, microwave ovens, Wi-Fi verbindingen enzovoorts tot ons komt. Dit type straling wordt wel met de populaire verzamelnaam “electronic smog” aangeduid. De meer officiële wetenschappelijke afkorting is RF-EMF, Radiofrequency Electromagnetic Fields. Alhoewel de door weefsel geabsorbeerde energie hiervan niet voldoende is om een breuk in een DNA streng te bewerkstelligen zijn er toch aanwijzingen voor een negatief effect op de spermatogenese. “Data miners” uit Kuala Lumpur hielden van de 526 gepubliceerde artikelen over dit onderwerp (waarbij ze focusten op Wi-Fi verbindingen) er uiteindelijk 23 over, waarvan er 5 gingen over humane spermastalen en de rest over zaadcellen en over observaties van testisweefsel van de rat (de meeste) en de muis (een paar). De variatie in blootstellingscondities (allemaal onder de WHO norm) in dit materiaal was groot. In de verwerkte publicaties was regelmatig sprake van een temperatuureffect en werden verder regelmatig signalen van **oxidatieve stress** waargenomen. Voor RF-EMF zou je graag, net als voor ioniserende straling, willen weten welke celtypen van de spermatogenese hier het gevoeligst voor zijn en hoe de spermatogenetische cellen de straling waarnemen. Als DNA laesies niet of nauwelijks optreden, zou het methyloom dan een goede uitleesparameter zijn om deze fundamentele vraag mee te beantwoorden? Effecten op de kleine niet coderende (snc)RNAs (H12.5.2, H15.2.3) zouden een mogelijke andere ingang kunnen zijn voor dit soort van onderzoek (H15.2.3).

17.4 Oxidatieve stress en voeding

Kan de samenstelling van ons dieet de vruchtbaarheid beïnvloeden? Mogelijk wel als daarmee een langdurende disbalans in het cellulaire reductie/oxidatie (redox) evenwicht teweeg wordt gebracht. Overmatige oxidatieve stress kan namelijk leiden tot lipide peroxidatie, waarvan met name de wanden van cellen schade kunnen ondervinden en zaadcellen zijn hier erg gevoelig voor (H12.7, H12.9.1, H12.9.4). Hieraan is het begrip “lipide peroxidatie” gekoppeld. Inmiddels hebben meerdere gerenommeerde onderzoekers hun naam verbonden aan voedingssupplementen die

moeten helpen om de oxidatieve stress in het mannelijke geslachtsapparaat te bestrijden. Zo is onderzoeker John Aitken betrokken bij het voedingssupplement met de mooie naam "Fertilix", waarvan de samenstelling is gepubliceerd. Ook op de website voor de op voedingssupplementen sturende fertilitateitsgeneeskunde van prof Frank Comhaire, voorheen in Gent (H12.8), staan supplementen vermeld. Naast selenium dat direct bij het reguleren van het redox evenwicht betrokken is, is ook zink vaak in de supplementen aanwezig.

Zink helpt bij het inpakken van het DNA (met behulp van protamines, H12.6 en H12.9.1) en dus bij het behoud van de stabiliteit van het DNA bij ejaculatie. Betrouwbaar wetenschappelijk bewijs voor de effectiviteit van voedsel supplementen op de vruchtbaarheid ontbreekt tot op heden, helaas. Het is moeilijk te verkrijgen vanwege de heterogeniteit en anonimiteit van de gebruikersgroep. De vele verhalen hierover ontberen nog steeds een wetenschappelijke onderbouwing.

17.5 Slotopmerkingen

Welke van de hier besproken effecten op vooral de spermatogenese vallen integraal binnen het werkveld van de reproductietoxicologie? Welke zijn meer specifiek onder te brengen bij de genetische toxicologie en hoe moeten we omgaan met **epigenetische** effecten die mogelijk veroorzaakt kunnen worden door aspecten van de voeding (H15.2.1, H15.2.3, H15.5)?

Antwoorden op deze vragen zijn meestal nog niet te geven omdat onze kennis vaak niet op een voldoende peil is. De wetenschappelijke waarde van een bevinding in het onderzoeksveld waar het primair thuishoort wordt immers pas duidelijk(er) als het moleculair-cellulair mechanisme achter het effect beter wordt begrepen. De begrippen veilige (voor chemische stoffen) en minimale (voor voedingssupplementen) dosis spelen hierbij een rol. Ook doemt de onbekendheid met de mogelijke interacties met andere lichaamsvreemde stoffen weer op. Voor ioniserende straling is het dan nog tamelijk makkelijk: een drempeldosis voor het verkrijgen van een effect bestaat in theorie niet: elke dosis, hoe klein ook, veroorzaakt naar rato DNA schade.

In dit hoofdstuk heb ik me voornamelijk geconcentreerd op actoren met een negatieve connotatie op het gebied van de spermatogenese. Zulke actoren zijn er natuurlijk ook met een effect op de eicel. Helaas is daarover veel minder bekend. Ook de rol van voeding op de moleculaire aspecten van de oogenese is een niet goed uitgewerkt onderwerp (maar zie H15.2.5). Voor voedingsaspecten in de vrouwelijke kiembaan worden geïnteresseerden daarom verwezen naar de literatuur over landbouwhuisdieren.

Samenvattend en terugkomend op de beginzinnen van dit hoofdstuk zou je kunnen stellen dat we op mondiale schaal bezig zijn om het ons omringende milieu en onze voeding voortdurend kunstmatig aan te passen, zonder daarbij te letten op de grote gevoeligheid voor omgevingsfactoren van gameten en jonge embryo's. Over die gevoeligheid heeft de groep van Ann van Soom vanuit de veterinaire faculteit in Gent in 2017 een mooi boekhoofdstuk geschreven. Dan vat de gedachte post dat de mens zelf de belangrijkste veroorzaker is van de systematische daling van in ieder geval de mannelijke vruchtbaarheid. Kan deze trend ook van invloed zijn op de belasting aan nieuwe mutaties, die er elk generatie (tabel 3) weer bij komt?

Een interessante observatie, die dit vermoeden voedt is de significante reductie in het verschijnen van *de novo* base veranderingen (tabel 3) bij de Amish, 7% minder. Deze bevinding uit 2020 wordt door de auteurs gelinkt aan de manier van leven geïnspireerd op de pre industriële periode. "Trio sequencing" bij afgelegen in bijna nog natuurlijke staat levende humane gemeenschappen kan zo een nog interessanter beeld opleveren.

Van individu naar populatie en weer terug

18.1 Het begrip “genetic load”

In principe neemt de genetische variatie per generatie toe. Dat komt omdat het **kiembaan DNA** niet foutloos kopieert en er altijd celbiologische bedreigingen zijn, die ook de **genetische code** kunnen veranderen. In principe is **mutatie** daarvan het gevolg (tabel 3). Oude variatie zien we op allerlei manieren en wordt mooi gedemonstreerd door de **SNPs** met een **allelfrequentie** van minimaal 1% in de menselijke bevolking (H3.2). Dat zijn de SNPs waarmee bedrijven als 23andMe bepalen waar je genetische wortels liggen, en waarmee je genetische associaties met kenmerken kunt bepalen (H3.2, H6.2). Maar onze totale genetische variatie, die ook in de coderende **gen** regio's (box 1) zit is veel groter. Door de analyses van het coderende DNA (box 1, fig 9) van de genen van 60.706 mensen bij elkaar op te tellen kwam men in 2016 tot de conclusie dat er op elke 8 basen een variant kan zitten. Daarbij komt dan nog de variatie in wat daar buiten betekenis heeft, zoals **promotors** en andere basenvolgorden die met de regulatie van genactiviteit en chromosoomgedrag te maken hebben. Over het hele **genoom** gemeten wordt een vergelijkbaar beeld verkregen (tabel 3). De bulk aan genetische variatie veroorzaakt hele kleine effecten en deze effecten zijn erg moeilijk aan een enkele veranderde basepositie toe te wijzen. Een groot deel is neutraal, dat wil zeggen dat er geen (of heel weinig) selectiedruk op plaats vindt. De minderheid heeft grotere en nadelige effecten, zoals de mutaties in genen die in de OMIM (H4.2) verschijnen. Tenslotte is er een kleine minderheid aan mutaties met een positief effect. Dat zijn de mutaties die Darwiniaanse selectie mogelijk maken. Het totaal aan mutaties met een kleinere of grotere negatieve bijdrage aan het individu wordt aangegeven met de term “genetic or mutational load” en in elke generatie komt daar logischerwijs weer wat bij (tabel 3).

In het kader van ART (H16.5) is de vraag gerezen of een kunstmatige manier van voortplanten de introductie van nieuwe mutaties bevordert. De technische handelingen die bij ART worden gebruikt zouden dus eventueel een additioneel **mutageen** aspect kunnen hebben. Gelukkig zorgt de natuurlijke selectie op **embryo** niveau ervoor dat hiertegen een dam wordt opgeworpen. Maar we weten nog niet of deze dam hoog genoeg is voor alle typen mutaties (tabel 3).

Onder de titel “Mutation and human exceptionalism; our future genetic load”, heeft de bekende kwantitatieve en populatiegeneticus Michael Lynch de situatie samengevat. Michael Lynch is onder andere bekend van het uitstekende tekstboek kwantitatieve genetica met de brede titel “Evolution and selection of quantitative traits” (H6.1). Met “human exceptionalism” wordt hier bedoeld dat door de invloed die we op onze omgeving hebben, en mede door de sociale- en kennissystemen, die bijvoorbeeld in de gezondheidszorg worden gebruikt, wij de rol van natuurlijke selectieprocessen hebben ingedamd. In de populatiegenetische theorie zijn de aanmaak van “negatief-effect-mutaties” en de afvoer door het reproductieve nadeel ervan, met elkaar in evenwicht. Natuurlijke selectie heeft dus belangrijke functionele betekenis. Wanneer ze niet meer in volle omvang werkt, wordt de mensheid door het generaties lang optreden van DNA veranderingen geconfronteerd met het negatieve aspect van mutatie. Voor onze soort zou dat een achteruitgang in de algemene gezondheid en een verslechterende vruchtbaarheid tot gevolg kunnen hebben. Een dergelijk scenario staat ook wel bekend onder de naam genetische erosie.

Dit was kortweg het thema van het afscheidscollege van Rolf Hoekstra als hoogleraar genetica aan de Wageningen Universiteit in 2010. We hebben in de Westerse wereld tenslotte al een paar generaties van sterk verminderde natuurlijke selectie achter de rug. Als we dit extrapoleren naar de toekomst, hoeveel meer generaties zou je nodig hebben om de daaruit resulterende problemen nu echt rond je heen en eventueel bij jezelf te gaan merken? Rolf, bekend van het universitaire tekstboek “Evolution, an introduction” stond voor een allengs wat beteuterd luisterende en kijkende zaal. Van zijn betoog herinner ik me een getal van 10 generaties voordat een zakkend “**fitness effect**” zichtbaar wordt (een schatting die berust op werk met modelorganismen). Zo’n zelfde schatting komt ook bij Michael Lynch voorbij. Hij berekent met een afname van 1% per generatie, dat we er na een paar generaties (over een periode van ongeveer 100 jaar gerekend) in een maatschappij met een hoog niveau van medische zorg al mee te maken zullen hebben. Die 1% is een conservatieve aanname. Is er dan echt geen selectie op individu niveau meer? Dit is nog wel het geval, maar naarmate er meer vroege levens en levens tot de reproductieve leeftijd worden gered, is het wel steeds minder. Het redden van levens op individu niveau en van

“de groep”, dat is iets wat diep in onze cultuur verankerd is. Deze redenatie staat nog los van de groei van ART, waarvan vooralsnog de mate van een populatiegenetische effect op de algehele gezondheid en vruchtbaarheid nog niet aan te geven is (zie bijvoorbeeld H12.11). En natuurlijk zijn er ook kleinere trends die de fitness kunnen verhogen zoals de toename van huwelijken tussen leden van de verschillende mondiale bevolkingsgroepen met een langere genetische historie.

Ook de praktijk van de IVF draagt bij tot het reproduceren van fitness verlagende mutaties. Dit aspect kwamen we al tegen bij de beschrijving van AZFc deleties (H12.12.2). In 2016 werden de eerste spermatellingen gepubliceerd van de mannen die via ICSI verwekt waren. Hun spermaconcentratie was een kleine helft van die van hun tijd- en leeftijdsgenoten. Dit is maar een voorbeeld van genetische erosie, maar eentje die ook voor vrouwelijke sub- en infertiliteit zal gelden. Fertiliteit heeft nu eenmaal een omvangrijke genetische basis, er zijn veel genen bij betrokken.

Een manier waarop de “genetic load” zich op een heel indringende manier manifesteert, is via de monogene, op een enkel gen gebaseerde aangeboren afwijkingen. Hiervan zijn er in de OMIM nu meer dan 4000 beschreven (H4.2, 4668). Van de 3673 genen waarvan begin 2022, bekend is dat ze verantwoordelijk zijn voor (monogene) overerfbare afwijkingen, vererft 55,1% **recessief**, 28,8% **dominant**, 10,2% zowel recessief als dominant en is 5,6% gelokaliseerd op het X chromosoom (en zijn dan onderworpen aan X chromosoom inactivatie, box 4). De grote meerderheid hiervan is erg zeldzaam, maar bij elkaar is het wel veel! Onze evolutionaire geschiedenis is, in generaties en verwevenheid (H6.2) gemeten, oud genoeg om ons allen drager te maken van tenminste 2 recessief overervende mutaties, en dat lijkt nog een onderschatting. Dit heeft weer tot gevolg dat er in 1 op de 100 koppels genetisch sprake is van een **heterozygoot** x heterozygoot paring die, wanneer het leidt tot een **homozygoot** (-/-) ernstig aangedaan kind, het gezin treft als een uit het niets opdoemend tragisch ongeval, waar je, met alle medische en sociale hulp die er is, mee moet leren leven.

Monogene aandoeningen komen in de verschillende fasen van het leven tot expressie. Een schatting van de impact ervan tot aan de leeftijd van 25 jaar is 1,7 op 1000 aangedaan door recessieve overerving en 1,4 op 1000 door een dominant overervingspatroon. Op basis van de prevalentie van een recessief patroon in 1,5 op de 100 paren verwacht je er voor deze categorie 3,8 op de 1000 over het hele leven. Dit alles geldt voor een populatie waarin de graad van genetische verwantschap tussen de partners laag is. Het begrip consanguiniteit is van toepassing op 0,06% van de paren met een Nederlandse afstamming. Van de ongeveer 2000 nu bekende

genen met “min” **allelen** die recessief zijn dragen er 115 bij aan 90% van de getroffen kinderen. Deze genen hebben dus de hogere allelfrequenties. Focus je de analyse op iets meer dan de helft van de ongeveer 2000 genen met allelen voor een recessief patroon van overerving, waarvan het homozygote (-/-) **fenotype** als ernstig wordt aangemerkt, dan zijn dat er 70.

De ziektedruk die de populatie ondervindt van monogene aandoeningen is onderdeel van een veel grotere groep van meestal zeldzame ziekten, die al langer in de belangstelling van medici en genetici staan omdat er een genetische oorzaak wordt vermoed. De definitie van deze categorie van aandoeningen is dat ze in minder dan 1 op de 2000 personen optreden. Voor het totale aantal aandoeningen wordt een richtgetal van 10.000 genoemd, waardoor de ziekte incidentie in de populatie tot 6% kan oplopen. Wanneer als model voor deze ziekten een **polygeen** model (H6) wordt afgewogen tegen een monogeen model zijn er meerdere argumenten om met dat laatste te beginnen. Ook in het polygene model kan een enkel gen spelbreker zijn en ten tweede is men er zich er nu veel meer van bewust dat zovele genen bij de verschillende lichaamsprocessen, met als uiterste voorbeeld het functioneren van de hersenen, betrokken zijn. Het is dan ook niet verwonderlijk dat er in 2014 vanuit de afdeling genetica van het Radboudumc in Nijmegen voor het “monogeen scenario” een doorbraak te melden was. In een kleine steekproef van 50 patiënten met een IQ lager dan 50, werd het coderende DNA (het **exoom**) van nakomeling en ouders vergeleken. Op die manier werden 20 dominante *de novo* mutaties geïdentificeerd, die het criterium van een betrouwbare diagnose konden doorstaan. “Trio sequencing” (H3.2) bleek zo een heel beloftevolle strategie om de genetische basis van onze lichaamsprocessen, in dit geval hersenfuncties, via de daarin spontaan optredende mutaties te onderzoeken. Wat deze strategie ook doet is dat het de aandacht vestigt op mutaties die nog niet geaccepteerd zijn als merktekens voor de medische diagnostiek maar waarvan de genen waarin ze optreden mogelijk ook bij het betreffende proces betrokken zijn. Ongeveer 80-90% van de nieuwe mutaties vallen binnen de categorieën baseverandering en indel (tabel 3). Wanneer de in tabel 3 opgegeven *de novo* mutatie frequentie wordt gecorrigeerd voor het coderende deel van het genoom (box 1) kom je op een getal van 1 à 2 mutaties per generatie. Van ongeveer 80% daarvan verwacht je een effect op het eiwit en nog wat minder voor een effect op het functioneren ervan (zie ook box 1). Dat zijn toch zeldzame gebeurtenissen, en dan zo effectief in het opsporen van de genetische basis van een fenotype?!

“Trio sequencing” wordt nu op een steeds grotere schaal toegepast. Een voorbeeld hiervan is het internationale consortium “deciphering developmental disorder”. In een rapportage uit 2020, en waar Christian Gilissen en collega’s van de afdeling genetica van het Radboudumc bij

betrokken waren, zijn de genoom DNAs van 31.058 trio's geanalyseerd. In totaal werden hierin 24.348 *de novo* base veranderingen en 4.229 indels in de coderende regio's (tabel 3) gevonden. Uit deze oogst destilleerden de onderzoekers 257 genen die op basis van de literatuur en databases diagnostisch betrouwbaar met ontwikkelingsstoringen kunnen worden geassocieerd. Daar bovenop kwamen 28 kandidaat genen boven water, waarvan er een paar ook al via de OMIM waren gerapporteerd. Het toepassen van **WGS** leidt tot een verhoging van ongeveer 10% aan mutaties die dan natuurlijk vaker als een grovere DNA verandering aan te merken zijn (de structurele varianten inclusief **copy number variation** (CNV) van tabel 3). Omdat er per generatie per persoon maar heel weinig direct met het exoom verband houdende mutaties bijkomen heb je bij een kenmerk waar heel veel genen bij betrokken zijn een grote steekproef nodig om tot een soort van verzadiging van het mutatie-doelwit (lees het aantal bij het kenmerk betrokken genen) te komen. D.w.z. dat alle genen waarbij een dominante mutatie kan leiden tot het ziektebeeld (en dat komt meestal door **haplo-insufficiëntie**), nu wel een keer de kans hebben gehad om te muteren. In deze studie wordt vermeld dat het aantal patiënten dat in relatie met het DNA van hun ouders onderzocht moet worden om dit criterium te bereiken, meer dan 300.000 is. Dit is nog steeds een (te) eenvoudige weergave van deze gecompliceerde tak van de genetica, maar het geeft wel de richting van de ontwikkelingen van het onderzoek voor de nabije toekomst aan. Al met al leidde het onderzoek van dit consortium tot het vinden van een *de novo* mutatie in ongeveer 25% van de patiënten. Dit percentage is overigens afhankelijk van de te onderzoeken ziekte. Voor kenmerken als doofheid, slechtziendheid, of een verstandelijke handicap ligt, met gebruik van alle genetische informatie (waar dikwijls DNA onderzoek bij verwanten een rol speelt), de genetisch opgeloste fractie in de orde van 40%. Voor sommige individuen of families zal de gevonden genmutatie echter niet geassocieerd zijn met een duidelijk fenotype. Dit verschijnsel staat bekend onder de naam incomplete penetrantie, al een hele oude term.

Het is een direct gevolg van het feit dat, zoals eerder vermeld, genproducten niet in isolatie opereren maar vaak hun rol hebben in grote tot zeer ingewikkelde cellulaire complexen, *i.e.* "protein-machines". Deze complexen worden vaak door **PTMs** en de genetica die daar weer achter zit, gereguleerd, waardoor de functies van individuele subeenheden in zo'n complex niet altijd tot uiting komen. Dan is het nog verwonderlijk dat een dominante "loss of function" mutatie zo vaak een negatief effect heeft op het fenotype. Voor veel genen is de gendosis, tot uitdrukking komend in het begrip haplo-insufficiëntie dan ook belangrijk. Dat een deletie van een stuk van het genoom ook bij **diploidie** ernstiger is dan een duplicatie weten we ook al heel lang (H3.4.2, H11.4, H16.3.1). *De novo* mutaties vinden in de kiembaan overwegend tijdens de

gametogenese plaats maar de vroeg embryonale ontwikkeling is er ook gevoelig voor: een klein deel, minder dan 10%, ontstaat in deze levensfase.

Uit het voorgaande is af te leiden dat bij de analyse van de rol van mutaties in het verklaren van de aandoening, *de novo* mutagenese kwantitatief belangrijker is dan Mendeliaanse overerving van in de populatie aanwezige mutaties. Voor een ontwikkelingsstoring in een populatie met een Europese achtergrond verklaart recessieve Mendeliaanse overerving 3,6%. Bij paren met een grote kans op een genetische verwantschap, zoals dat voorkomt bij mensen met bijvoorbeeld een Pakistaanse achtergrond waar huwelijken tussen verwanten veelvuldig voorkomen, is dat 31% en daar is het beeld dus heel anders.

18.2 Hoe gaan we met de belasting van de "genetic load" om?

Genetische erosie is een gevoelig thema. Waar we veredelen ten behoeve van de voedselproductie gaat het er juist om de genetische erosie, oftewel die "minor detrimental alleles", ook wel "slight detrimentals" genoemd (H12.12.3), te verwijderen en selectie is daartoe het beproefde middel. Ook wil je nog wat genetische variatie behouden, want zonder dat is er geen selectierespons meer. Over de toename van de inteelt die onvermijdelijk is bij een kleine effectieve populatiegrootte (**Ne**, H6.2) maak je afspraken. Bij de landbouwhuisdieren probeer je als fokkerijorganisatie (dit zijn bedrijven en vaak multinationals) zo snel mogelijk van nieuw optredende aangeboren afwijkingen af te komen.

Drijft de internationale Holstein fokkerij van voor melkproductie opgevoerde melkkoeien op een N_e waarde van rond de 100, voor de van oorsprong Europese humane bevolking is een schatting van dit getal 10.000 (H6). Voor een soort is dit een enorm groot getal. Bij zo'n hoge voortplantingscapaciteit zal ieder type mutatie die in het DNA kan plaatsvinden ook wel een keer voorkomen. Maar, wanneer zulke mutaties recessief zijn zullen ze eerst vele generaties "ondergronds" gaan en zich zo uitbreiden.

Door die lange gang van het Radboud ziekenhuis lopend herkende ik aan het begin van deze eeuw een oud student van me in een ochtendjas en op slippers. Gedurende de vele jaren die waren voorbijgegaan sinds hij werkte aan zijn afstudeervak had ik hem niet meer gezien. We raakten aan de praat en al snel ging het over genetica en de invloed daarvan op onze samenleving. "Zo gaat het niet langer" was een van de eerste dingen die hij zei. Ging het om onze ecologische voetafdruk? Nee, zijn opmerking had te maken met de genetische erosie oftewel, in de woorden van Lynch ons "human exceptionalism". Maar wat dan? Laten we hoe dan ook

blijven streven naar een humane maatschappij leek mij. De opmerking van mijn oud student doelde echter op het veredelen van de mens. Iets wat op zichzelf niets nieuws is en historisch voldoende afschrikwekkend, maar wat toch voortdurend in allerlei gedaantes in de media blijft opspelen. Zo berichtte Merijn de Waal in de NRC van 2 augustus 2019 over plannen van Jeffrey Epstein die op een afgelegen plek in New Mexico zeker 20 vrouwen zou hebben willen insemineren met zijn eigen sperma om zo aan rasverbetering te doen (transhumanisme, ratio te vinden via het internet).

Aan de andere kant van het brede spectrum dat veroorzaakt wordt door de maatschappelijke manifestatie van de “genetic load”, staan de integere medische professionals die, met het leed dat dit voortbrengt, bijna dagelijks worden geconfronteerd. Geen wonder dat wetenschappers zich dus wel eens afvragen of met behulp van DNA screening en gentechnologie hier geen halt aan toe te roepen is. Voor nieuwe spontane “*de novo*” genetische afwijkingen is dit om technische en logistieke redenen niet uitvoerbaar en zoals we hiervoor zagen valt een behoorlijk hoog deel van de aangeboren afwijkingen hieronder. Maar wat zouden we kunnen en mogen doen aan recessief overervende allelen met al wel een lange historie in de populatie?

Een relatief jong voorstel om de effecten van recessieve mutaties op populatieniveau beter te controleren is “genetic tinder”. Dit voorstel stamt van George M Church van het Dep of Genetics van Harvard Medical School, Boston, een buitengewoon productieve DNA wetenschapper met een zeer uitgebreid CV (Wikipedia). Onder andere is Church bekend door zijn bijdrage aan het ontwikkelen van een DNA basenvolgordebepaling techniek maar ook door ideeën over de herintroductie van de mammoet. Door een DNA profiel te koppelen aan een dating site als Tinder, zou je kunnen voorkomen dat heterozygoten elkaar treffen (was zijn stelling). Nog afgezien van de sociale hectiek die bij het in praktijk brengen van dit “paringsprogramma” zou ontstaan, leidt dit plan ons ook in de verkeerde richting. Op een termijn van vele generaties (het is een heel langzaam proces) zou de allelfrequentie van recessief overervende monogene aandoeningen juist toenemen, omdat het evenwicht tussen de aanmaak en het (door selectie) verwijderen van de door mutatie “mank” geworden allelen uit de populatie is verstoord. Dit komt doordat de populatie minder mutatie allelen verliest omdat homozygoten (-/-) die te ziek zijn zich meestal niet voortplanten.

Verwant aan de ideeën rond “genetic tinder” is het zoeken naar heterozygotie voor recessief overervende monogene aandoeningen, nadat men voor elkaar gekozen heeft en gezinsuitbreiding nastreeft. Tenslotte is er bij 1 op de 100 paren sprake van twee individuen die heterozygoot zijn voor een negatief allel van hetzelfde gen, dat bij homozygotie tot een ernstig fenotype leidt.

Deze benadering wordt aangeduid als een screen op preconceptie dragerschap. In Nederland bestaan daar op dit moment geen uniforme afspraken over. Wat wordt aangeboden is afhankelijk van initiatieven in universitair medische centra. Zo is Amsterdam UMC actief voor aparte doelgroepen, zoals Volendammers en mensen met een Ashkenazi Joodse achtergrond. In beide groepen is er een verhoogde frequentie van dragers van een schadelijk gemuteerd allel. Mensen met een Mediterrane en Surinaamse/Antilliaanse achtergrond worden ook genoemd. Rond Groningen kan men zich, na verwijzing door huisartsen aldaar, laten testen op heterozygotie voor 90 genen die betrokken zijn bij 70 monogeen recessief overervende ziekten. Van een veel grotere omvang is een jonger initiatief vanuit de klinische genetica afdelingen van de universitair medische centra in Maastricht en Nijmegen, gericht op paren die voorouders uit recentere generaties delen: er is sprake van consanguiniteit. De kans op een kind met een aangeboren afwijking is in deze situaties, waarin de volle neef-nicht huwelijken het grootste risico dragen, ongeveer 2,5 x hoger. De toename aan ziektebeelden met een monogeen recessief overervingspatroon draagt daar heel significant aan bij. In Maastricht kunnen echtparen met een familiehistorie van consanguiniteit voor ongeveer 2000 genen, gebaseerd op de OMIM, worden gecontroleerd op dragerschap voor negatieve mutaties, die wanneer ze van beide ouders komen het recessieve fenotype geven. De mutatie van dit ene gen, die zowel bij de moeder als bij de vader aanwezig is, hoeft op DNA niveau niet dezelfde te zijn. De resultaten van de eerste 100 stellen zijn in 2021 gepubliceerd. Bij 28 paren deelden de partners een mutatie voor hetzelfde gen. Op theoretische gronden was al eerder duidelijk dat juist bij consanguiniteit via exoom sequencing alle genen die een homozygoot recessief fenotype op kunnen leveren in het onderzoek betrokken moeten worden. Consanguiniteit bij de partnerkeus is cultureel bepaald, bevat een element van voordeel op sociaal en economisch gebied en vindt over grote delen van de wereld plaats. Het komt afhankelijk van de samenleving bij wel van 20 tot 50% van de huwelijken voor. Hoe nauwer de ouders verwant zijn, hoe groter het deel van het genoom dat als een theoretisch onderbouwde schatting ("identity by descent", met een betrouwbaarheidsinterval) gedeeld wordt. Dat leidt ertoe dat het risico op een kind met een recessief homozygoot fenotype dat ernstig is 16 x hoger wordt wanneer de ouders volle neef en nicht zijn. In getallen: de kans op een kind met een ernstig recessief fenotype is dan 4%. Deze risico-inschatting komt heel goed overeen met de nog als een pilot te beschouwen eerste bevindingen uit Maastricht.

De technisch meest spectaculaire manier om de geboorte van monogeen bepaalde genetische pathologie te voorkomen is PGD, pre implantatie embryo diagnostiek (nu PGT-M genoemd, zie de lijst van afkortingen). Er is altijd sprake van een IVF traject met als doel embryoselectie

mogelijk te maken. Omdat de genetische diagnose op een enkele **blastomeer** (8 cellige embryo's) of enkele cellen (van de trofoblast van **blastocysten**, fig 43) tijd in beslag neemt, moeten de embryo's worden ingevroren omdat terugplaatsing natuurlijk pas plaats kan vinden nadat de uitslag bekend is. In Nederland is PGD vanuit het Maastricht UMC vanaf 1995 operationeel, voor een zich gestaag uitbreidend aantal monogene aandoeningen. Van 2009 tot 2018 waren dat er in totaal iets meer dan 100, verdeeld over dominant (de meeste) en recessief overervende of X chromosoom gekoppelde genen. Families met een structurele chromosoomafwijking (H3.4.1, fig 12) en een reële kans op aangedaan nageslacht, komen ook in aanmerking. Het jaarverslag van 2020 vermeldt dat 261 paren het traject in zijn gegaan, De verhouding tussen monogene ziekte of een chromosoomafwijking als aanleiding was ongeveer 4 : 1. Bij de chromosomale afwijkingen was vooral sprake van reciproke en Robertsonische translocaties (2 : 1) (H3.4.1, fig 12).

Bij dominant overervende condities, denk aan de ziekte van Huntington, is de fractie embryo's die niet teruggeplaatst kunnen worden het hoogst, 50%. Bij recessieve condities het laagst (25%), omdat er bij dragerschap geen fenotype is. Bij X gekoppelde aandoeningen gaat het om de helft van de mannelijke embryo's (25%), maar is het biologisch-sociale proces wat ingewikkelder (box 4).

Het volgende voorbeeld dient als uitleg. Een vrij veel voorkomend (ongeveer 1 op 4000 geboren jongens) en dramatisch voorbeeld is spierdystrofie (Duchenne en Becker). Het hiervoor verantwoordelijke gemuteerde dystrofine gen, één van de grootste genen uit het menselijke genoom, heeft een hoge *de novo* mutatiefrequentie van 8×10^{-5} per generatie. Het gen komt via "drager" vrouwen tot volledige expressie in de zonen met het verkeerde X chromosoom en kan via de 50% "drager" dochters van deze vrouwen in de populatie blijven. In principe is bij selectie op embryoniveau de efficiëntie (de mate waarin je het gemuteerde allel verwijdert) 100% wanneer tegen het aangedane X chromosoom wordt geselecteerd. Je houdt dan gemiddeld nog 50% van de embryo's over, namelijk de embryo's die het goede X chromosoom dragen. Maar een zover doorgevoerde selectie mag van de huidige embryowet in Nederland niet omdat de vrouwelijke embryo's die drager zijn van de mutatie na de prenatale ontwikkeling een "normaal" postnataal leven kunnen leiden. De werkelijkheid rond de beslissing bij dit soort X gelokaliseerde erfelijke afwijkingen (het Nederlandse PGD verslag van 2018 vermeldt er 29) is dus noodzakelijkerwijs genuanceerd en onder andere afhankelijk van het gemuteerde gen. Draagsters zijn niet altijd volledig symptoom vrij. Weten dat een dochter weer drager is en later weer voor dezelfde dilemma's komt te staan is psychisch belastend voor families. Ook dit kan een argument zijn om

embryoselectie toe te passen. Een dergelijk besluit verminderd statistisch het aantal terug te plaatsen embryo's met 1/3^e.

Verandert PGD iets aan de frequenties van de betrokken allelen in de populatie? Bij dominante condities wel. Het evenwicht tussen “verschijnen en verdwijnen” van de mutatie komt op een lagere allelfrequentie te liggen. Bij recessieve condities zou je ook moeten selecteren tegen de heterozygoten, want daar zitten veruit de meeste mutante allelen. Dit is natuurlijk niet mogelijk, want we zijn allemaal drager (H18.1). Bij X gekoppelde condities vershuift het evenwicht tussen aanmaak en verwijdering bij selecteren tegen de mannelijke embryo's wel in een gunstiger richting, maar niet zo snel als bij een dominant overervend ziektebeeld. Samenvattend is PGD is er dus vooral op gericht om genetisch leed in families niet te laten voortduren. Voor de dominant overervende monogene aandoeningen die nu de grote meerderheid vormen is er het meest duidelijk een populatiegenetisch effect.

De eigenlijke bottleneck van PGD is het aantal goede embryo's na superovulatie bij normaal fertiele paren op een zich rond het gemiddelde bewegende reproductieve leeftijd (H16.1, H16.3). In 2018 zijn er in Nederland 105 kinderen geboren na PGD. Embryoselectie zoals hier beschreven leidt niet tot heel veel lagere kansen op een doorgaande zwangerschap dan in de IVF praktijk gebruikelijk is (H16.3).

In het kader van het verminderen van de “genetic load” gaat de aandacht ook uit naar de mogelijkheden die de CRISPR-Cas (box 3) methodologie kan bieden voor de correctie van de mutatie. Eerst iets over het technische aspect. Na de aanvankelijke euforie zie je nu een veel bedachtzamere houding, de techniek moet op het niveau van de **zygote** 100% betrouwbaar zijn, bij wijze van spreken nog beter dan de natuur zelf. Daarbij komt dat je op het moment van toepassen het **genotype** van de zygote niet kent. Ook mag de techniek het niet-aangedane + allel niet alsnog muteren.

De op “gene editing” (box 3) bij humane zygoten gerichte proeven vinden vooral in China plaats. In die zin zijn het tot nakomelingschap leidende experiment van Dr Jiankui He, waarvoor hij eind 2019 tot 3 jaar cel is veroordeeld, geen incident. De experimenten waren mogelijk omdat een vorm van ethische en maatschappelijke controle op dit werk ontbrak, de toepassing ging weer eens sneller dan het inzicht. In Europa en in de USA is het introduceren van genetische veranderingen op het niveau van de zygote en leidend tot verankering in de kiembaan nog wettelijk verboden.

Vele stappen in het gebruik van CRISPR-Cas technologie zijn zich nu aan het verfijnen, waardoor de selectiviteit voor de doel-locatie gaat toenemen en het gevaar van “off-target”

effecten wordt verkleind. Ook de nu bestaande afhankelijkheid van het aanbrengen van een dubbelstrengs breuk om tot genetische correctie te komen, zal afnemen (H13.5.2, box 3). Reproductiegenetici brengen de toepassing van CRISPR-Cas in verband met PGD. Daarbij wordt gedacht aan de mogelijkheid om alle embryo's, dus ook de heterozygoten voor een recessieve monogene aandoening, genetisch te repareren (van +/- naar +/+). Dat zou de "load" aan recessieve min-allelen in de populatie verminderen, maar het tempo van de reductie is heel erg traag. Ook moet er voor iedere mutatie weer een strategie uitgedacht worden om tot reparatie van het DNA te komen. Dat heeft te maken met het verschijnsel **mutatiespectrum**. Daarmee wordt de hele waaier aan DNA basenvolgorde modificaties bedoeld die het gen lam kunnen leggen en in de populatie worden gevonden. Genen verschillen in de uitgebreidheid van dat spectrum. Op familieniveau is het voordeel duidelijker. Voor het betreffende gen is dan voor latere generaties geen preconceptionele screening meer nodig.

De novo genetische chromosoomafwijkingen (voornamelijk aantalsafwijkingen) kunnen pre-nataal worden opgespoord met de NIPT test (niet-invasieve prenatale test). Deze test wordt nu in Nederland aan iedere zwangere aangeboden. De test berust erop dat DNA van het **foetale** deel van de placenta in kleine hoeveelheden in het bloed van de moeder aanwezig is. Op basis van NGS methodologie kan dit DNA vanaf een zwangerschap van 11 weken herkend worden. De analyse toont het aantal kopieën van een heel chromosoom of een deel ervan aan. Het oplossend vermogen voor chromosoomsegmenten is 10-15 mb aan DNA, te vergelijken met de hoeveel DNA in een chromosoombandje (zie fig 12). Om deze technologie voor risicogroepen op een kind met een afwijking van het aantal chromosomen en voor de hele populatie te evalueren, gebeurt er in Nederland mooi en heel degelijk onderzoek waarbij alle academische ziekenhuizen betrokken zijn. De geslachtschromosomen worden niet geanalyseerd. Bij de **trisomieën** (H3.4.2) gaat het om de bekende chromosomen 13, 18 en 21, omdat die de grootste potentie tot ontwikkeling hebben. Ook andere trisomieën worden wel gevonden. De NIPT uitslag moet worden bevestigd m.b.v. een al bestaande invasieve procedure zoals een kweek van vruchtwatercellen (van het embryo) of een vlokcentest (van de foetale placenta). Vooral voor chromosoom 18 en iets minder voor chromosoom 21 is de voorspelling van het aanwezig zijn van de chromosoomafwijking bij het kind accuraat, voor chromosoom 13 was dat zo rond de 50%, een kwestie van techniek en beperking van de kosten. Met de NIPT test en daaropvolgende validatie wordt in 0,5% van de zwangerschappen een afwijkend chromosomaal beeld gevonden, waarvan de trisomieën 13, 18 en 21 het merendeel vormen. Gelukkig valt het met een in

eerste instantie positieve NIPT uitslag voor andere cytogenetische afwijkingen dan de bekende trisomieën, de zogenaamde “bijvangst”, mee (0,4%).

Deze is heteroöten en bestaat in dit stadium van de zwangerschap uit zeldzame trisomieën, uit de genetisch ongebalanceerde producten van een reciproke translocatie (fig 12) bij een van de ouders of uit een **mozaïek** voor een grote duplicatie. Dat zijn er op deze groep van bijna 57000 zwangerschappen toch 200. Wanneer er sprake is van een uitslag in de “bijvangst groep”, wordt deze op dezelfde manier gecontroleerd als voor de trisomieën. Dan komen de zogenaamde “discordant positives” (de NIPT diagnose wordt niet bevestigd) ook boven water, iets dat bij deze groep nog vaker voor komt dan bij trisomie 13. Samenvattend melden de onderzoekers dat het traject tot vermijden van een kind met een aangeboren chromosoomafwijking belastend is. Het debat over populatie brede screening hiervoor zal dus blijven, hetgeen ook tot uiting komt in de deelname die nu bij de 50% ligt. Vanaf 2007 werd in Nederland de triple test aangeboden om onder andere de aanwezigheid van een vrucht met het syndroom van Down op het spoor te komen en vanaf 2014 de NIPT test. Het aanbieden van de triple test is oktober 2021 gestopt. Bij evaluatie nu blijkt dat in Nederland NIPT niet heeft geleid tot een verdere daling van geboorten van een kind met het syndroom van Down. Gebruik makend van tabel 4 kun je wel vaststellen dat in Denemarken het aandeel kinderen met Down bij de geboorte door prenataal testen met ongeveer 70% is afgenomen.

Begin april 2019 organiseerde de stichting De Snoo-van 't Hoogerhuijs, een stichting met als doel het bevorderen van kennis van de voortplanting, een symposium getiteld “Towards a genetically perfect society”. Uit het voorgaande mag blijken dat dit een ambitieus en eigenlijk onmogelijk streven is. Met “perfect society” wordt bedoeld dat de kwade allelen de wereld uit zijn. Een andere beweging die je in de genetica van de kiembaan en dus van ons kunt ontwaren is die van de “genetic enhancement”. Daaronder verstaat men selectie met behulp van embryo genotypering. Onlangs verscheen er een Israëlië-Amerikaanse-Griekse publicatie waarin werd onderzocht of op basis van het DNA profiel van een bipt van het pre implantoire embryo (H16.3.1) een uitspraak kan worden gedaan over de genetische aanleg voor bijvoorbeeld sport of geestelijke vermogens. Het artikel werd meteen daarna door Henk Bovenhuis van de afdeling fokkerij en **genomica** te Wageningen op college gebruikt om het wetenschappelijk tegen het licht te houden, en de conclusie van de auteurs te onderschrijven: de schattingen van de genetische potentie waren nog lang niet nauwkeurig genoeg (zie ook appendix 1). Voor veefokkers is het begrip “genomic prediction” te beschouwen als de waterpomptang van de dierveredeling door middel van selectie. Hoe nauwkeuriger het genomisch potentiaal van een fokdier bepaald

kan worden, hoe sneller het fokdoel is bereikt (H6.2). In de Holstein Friesian fokkerij vindt selectie mede op het niveau van pre-implantoire embryo's plaats en is gebaseerd op een SNP-profiel (H6.2). Een chip met 10.000 SNP-posities is echt voldoende om tot een betrouwbare schatting van de fokwaarde te komen (H6.2) omdat de structuur van de rundveefokkerij bijzonder is (de combinatie van een kleine effectieve populatiegrootte (N_e) met grote halfzuster-families (een KI-stier krijgt vele dochters). Zo kunnen embryo's, die van superovulatie en/of embryo-productie *in vitro* (zie in H16.3.2 bij het paard) afkomstig zijn, voor bijvoorbeeld de genetische aanleg om melk te produceren op rangorde worden gezet. Dan kan het generatie-interval worden verkort en de selectiescherpte worden verhoogd, maar hoe nuttig is dat (fig 18)?

Is dit soort van onderzoek bij de mens dan een doodlopende straat? Niet wanneer het durfkapitaal het bij het rechte eind heeft. In de USA is er op dit thema een bedrijf opgericht dat zich bezig gaat houden met het ten behoeve van echtparen op een volgorde van genetische potentie zetten van embryo's. Dat kan alleen voor kenmerken waarvan de genetische basis, de "**genetic architecture**" (H6.2), in principe bekend is, wat meestal zal inhouden dat er veel genen bij betrokken zijn. Alleen al omdat er maar uit weinig embryo's te kiezen is (goede embryo's zijn relatief schaars, H16.3.1, H16.3.2), is selectie binnen een familie niet zo erg effectief. Wanneer meerdere eigenschappen een rol gaan spelen wordt het effect helemaal triviaal. Maar je kunt dit alles natuurlijk ook zien als een volgende stap in het bereiken van autonomie van de moderne mens/familie. Want dan, en in het bezit van afdoende financiële middelen, kun je je los maken van alles wat als beperkend wordt ervaren.

Wat rest er dan nog om de "genetic load" te verminderen wanneer genetische selectie in de reproductieve leeftijd niet aan de orde is? Een discussie over deze vraag kwam op tijdens een universitaire bijeenkomst van vakgenoten waar de spreker een voordracht hield over aangeboren erfelijke afwijkingen in het kader van de dagelijkse praktijk van een ziekenhuis. Aan het eind van de indrukwekkende lezing kwam de vraag aan de aanwezigen: moeten we prenataal genetisch gaan testen voor iedereen? Dan doemen er vervolgvragen op: wat kan zo'n test in een technologische verdere ontwikkeling op NIPT dan allemaal aantonen?

Alle met ziekte geassocieerde allelen zoals die in de OMIM (H4.2) opduiken of nog meer? Komen genen die vatbaar zijn voor *de novo* mutatie en gekoppeld zijn aan een ernstig dominant fenotype ook in het vizier? Toen er werd nagedacht over de biologische en technische aspecten van deze vragen kwamen er nog kwesties van een heel andere aard bovendrijven. Een die vlug opkwam: wanneer de hoeveelheid DNA-informatie, waar biologische betekenis aan kan worden gegeven toeneemt en de DNA-analysetechnologie prenataal zich verder ontwikkelt, waar liggen

dan de grenzen? Wat is afwijkend en wat wordt als niet afwijkend beschouwd? De glijdende schaal in de antwoorden die hierop mogelijk zijn zal zich vanzelf aandienen. En wat doet het met de rust rond een nog jonge zwangerschap (?) en welke ethisch-morele overwegingen zijn er nog meer? Tijdens de bijeenkomst was niemand goed op deze vragen en de discussies daarover voorbereid. De kernvraag bleef in de lucht hangen, het was voor even te veel. Toch zal de technologie in combinatie met de ernst van aangeboren afwijkingen invloed hebben op hoe we er in de toekomst binnen onze maatschappij mee omgaan. “Al zoekende zullen we vinden”, zoals een ingewijde zei. Genetische variatie is nu eenmaal een continuüm, en wordt bevorderd door wat Michael Lynch ons “human exceptionalism” noemt (H18.1).

Genetische variatie zit dus centraal in het “**nature nurture**” paradigma. Genetische verandering bij de mens gaat langzaam. Het wordt aangestuurd door *de novo* mutagenese en ook door partnerkeus (waar ook het begrip “sociale monogamie” onder valt).

Ook al is het een open deur, de leefomgeving verandert echt veel sneller, en de aanjaegers daarvan zijn niet onbekend. In de Els Borstlezing van 2018 over menselijke reproductie stelde spreker Annelien Bredenoord duidelijk dat de autonomie van ieder mens niet eindigt bij de voortplanting. Het is een gedragsparadigma dat de norm kan zijn of nagestreefd wordt, en zich uit in het onbeperkt zijn van goederen en diensten voor iedereen die dat kan betalen. Omdat de groep van mensen die autonomie willen en kunnen nastreven sterk groeit zijn de milieu-implicaties enorm. De tegenbeweging, een minder materialistische houding, natuurlijker en zoekend naar vervangende waarden in kunst, spiritualiteit en natuurbeleving is altijd kleiner geweest en zal in omvang alleen nog verder afnemen. Het milieu, inclusief onze handelingen in de sociale context, is uiteindelijk dominantier dan de natuurlijke genetische verandering die de mens ondergaat. Dat geldt dus ook voor de effecten op onze fertiliteit en genetische gezondheid.

Slot

Een reis door de **kiembaan**, het was en is een fascinerende tocht. De technische mogelijkheden binnen het moleculair en genetisch onderzoek breiden zich nog steeds uit, vooral in de richting van het karakteriseren van **DNA** en **RNA** in individuele cellen, waardoor variatie tussen cellen zichtbaar wordt. De mondiale wereld van de ART is de entreepoort tot beter celbiologisch en genetisch inzicht van vooral de eerste stappen van de **embryonale** ontwikkeling. De resultaten van DNA onderzoek met **SNP** en **NGS** platforms per enkele **blastomeer** zijn al bijzonder. Het zal niet lang meer duren (of is al zover) voordat daar het **methyloom** en een karakterisering van de bibliotheek aan RNA moleculen (het **transcriptoom**) aan worden toegevoegd. Zullen daar de **biomarkers** uit voort komen die met een hoge precisie gaan voorspellen welk embryo het haalt en welke niet? Maar ook binnen het **spermatogenese** onderzoek, bijvoorbeeld bij het begrijpen van het gedrag van de stamcellen rukt de karakterisering van individuele cellen op.

Doordat de cel en de populaties die ze vormen nu ook voer voor “big data” analyse zijn geworden, ben je benieuwd naar de antwoorden die dat kan brengen. Tot nu toe komen die celbiologische doorkijkjes vooral van individuele genen in muis **knockout** modellen met een eiwit als het ontbrekende product. Maar de begripsvorming over celbiologische processen wordt, zeker met onze toenemende systeembioologische kennis over de samenhang van moleculaire interacties binnen de cel, steeds moeilijker. Het zich ontvouwende spectrum van de functies van “non-coding” RNA speelt daar ook een rol bij. Dat de hele moleculaire biologie van de cel van flexibele interacties aan elkaar hangt, is in zijn totale complexiteit niet te bevatten (H1, een voorbeeld hiervan in fig 24).

19.1 Seksuele reproductie, een wonder

Een reis door de kiembaan staat gelijk aan het omarmen van de seksuele voortplanting, met zijn fabelachtige vermogen tot het genereren van variatie, en daardoor ook het vermogen tot aanpassing wanneer het milieu verandert. Voor de liefhebbers, de literatuur is groot maar verdiep je eens in de koolmees als een interessant onderzoeksobject.

De biologie wordt ook wel eens beschreven als de wetenschap van de variatie. Waar komt die obsessie met kloneren dan vandaan? Een obsessie die misschien niet zo zeer in Nederland merkbaar is, maar wel in menig andere cultuur, de Oost Aziatische en Zuid Amerikaanse voorop.

De gedachten gaan terug naar de zomer van 1969 toen ik op bezoek was bij de ARC “reproductive physiology unit”, Huntington Road in Cambridge. Na de ervaringen met de microscopie op eicellen in Göttingen (H13.7) wilde ik graag zien hoe een expert deze wonderbaarlijke cellen op een glaasje vleide, er een dekglasje overheen legde en ze voor observatie van het meiotische stadium aan kleurde. Chris Polge, de uitvinder (in 1949) van het diepvriezen van sperma, wilde deze techniek op een zonovergoten zomermiddag wel even voor doen; het stelde inderdaad niets voor. Er was nog iemand die de meester op de vingers keek, Ian Wilmut, geestelijk vader van het eerste gekloneerde zoogdier, het naar Dolly Parton vernoemde schaap Dolly (Nature 1996).

In 1998 kwam ik Wilmut weer tegen op een Gordon conferentie in New Hampshire. Bij zijn voordracht over de proeven in Edinburgh voor een deskundige en kritische zaal, had hij het zwaar gehad. De lage efficiëntie van het proces en de vele misvormingen tijdens de embryonale ontwikkeling waren daar de oorzaak van. Een proef als die rond Dolly kun je beschouwen als een “proof of principle”. Ja, een eicel kan een somatische kern terug programmeren (H9), maar het is een bijzondere eicel die dat kan en het zal nooit helemaal foutloos gaan. Kloneren, alhoewel het nu wel wat beter zal gaan, leidt toch tot een spectrum van onvolledig gereprogrammeerde stadia met de bekende variabele efficiëntie en een kans op embryonale ontwikkelingsstoringen tot gevolg. Inzicht in het “resetten” van de kiembaan (H9) bestond toen al, daar was Dolly niet voor nodig. Wanneer je nu de beweegredenen die indertijd achter kloneren schuil gingen terugleest, genetische manipulatie was zeker een drijfveer, is dat door de ontwikkeling van de CRISPR technologie achterhaald. Kloneren is, behalve als gereedschap in het onderzoek, te ingewikkeld en veel te veel belast met welzijnsproblemen, rakend aan de grenzen van de ethiek. Wat kloneren wel goed doet is het opnieuw, en mogelijk ten overvloede zichtbaar maken dat de vrouwelijk **gametogenese** en reproductieve tractus de fundamenteën van de voortplanting

zijn. Des te pijnlijker is het dat door de noodzaak van eiceldonatie en het herhaalde gebruik van draagmoeders om tot de geboorte van een kloon te geraken, daar bij deze technologie misbruik van moet worden gemaakt.

Maar toch was het BNNVARA in 2016 heel wat waard om in een programma gepresenteerd door Sophie Hilbrand en filosoof Bas Haring in Zuid Korea op onderzoek uit te gaan. Daar moest een cel van de Rotterdamse hond Joep dienen om hem niet te vergeten en als Pipo opnieuw geboren te laten worden. Het jeugdjournaal pakte het thema “dieren kloneren” in de serie “Uitgezocht” begin 2020 weer op, de suggestie bevestigend dat, alhoewel met wat obstakels omgeven, het toch in de normale mondiale maatschappelijke dienstverlening past.

Overigens is kloneren in Europa vanwege proefdiergebruiksoverwegingen verboden. Kloneren is echt alles wat seksuele reproductie niet is. Je wilt iets dat de seksuele reproductie juist vermijdt (uniformiteit) en bovendien zit er een 2^e hands aspect aan.

Anders dan je zou vermoeden uit de tekst in dit boek over DNA herstel in de kiembaan is het **genoom**, zeker voor DNA replicatiefouten, beter beschermd tegen mutaties dan het genoom van somatische cellen (zie de legenda van tabel 3). De in het leven opgelopen **somatische** mutaties komen bij kloneren in de volgende generatie terecht. Uit moleculair chromatineonderzoek blijkt, dat door het kloneren er extra variatie in methyloom en histon **PTMs** (tabel 1) ontstaat. Ook worden er problemen met **genomische imprinting** (H10) gezien. Soms zijn de effecten echt verassend: wanneer er weefsel van een reu wordt opgestuurd, kan daar in Korea een naar het uiterlijk te beoordelen teef uit tevoorschijn komen (in 10 van 44 gevallen). Daar zat Pipo dus niet bij. Door het spontaan optreden van inactiverende methylatie komt het **SRY** gen (H8) niet tot expressie, waardoor er geen testis ontstaat en door de afwezigheid van geslachtshormonen komen innerlijke en uiterlijke mannelijke kenmerken niet tot ontwikkeling. Samenvattend is kloneren eerder een matig project van de tovenaar dan een verzinsel van de profeet, de maatschappijvisies uit de inleiding weer van stal halend.

Fertiliteit bevindt zich in de kern van de biologie: Het is een van de belangrijkste zo niet het belangrijkste begrip (inleiding).

Laat het blijven in het gebied van “de commons”, van wat ons allemaal raakt. We moeten fertiliteit dus niet uitverkopen aan het bedrijfsleven. De genetisch perfecte maatschappij zoals door vakmensen voorgespiegeld in de titel van het De Snoo symposium april 2019 in Utrecht (H18) bestaat echt niet, het is een *fata morgana*. Accommodeer juist de genetische variatie die het kenmerk is van de seksuele voortplanting. Dat betekent ook dat je maatschappelijke tendensen

die leiden tot meer uniformering en bijvoorbeeld worden bevorderd door de digitalisering van de samenleving moet kunnen herkennen en kritisch moet volgen. Ook individualisme (hier als tegenhanger van het groepsbelang), past eigenlijk slecht bij ons genetisch exceptionalisme (zie de uitleg over de formulering daarvan door Michael Lynch in H18). Wanneer individualisme een slingerbeweging is, dan hoop ik dat deze nu op het hoogste punt is aanbeland. Ook hoop ik dat in alle ethisch morele beschouwingen hierover, de balans tussen individu, populatie en milieu wordt hersteld.

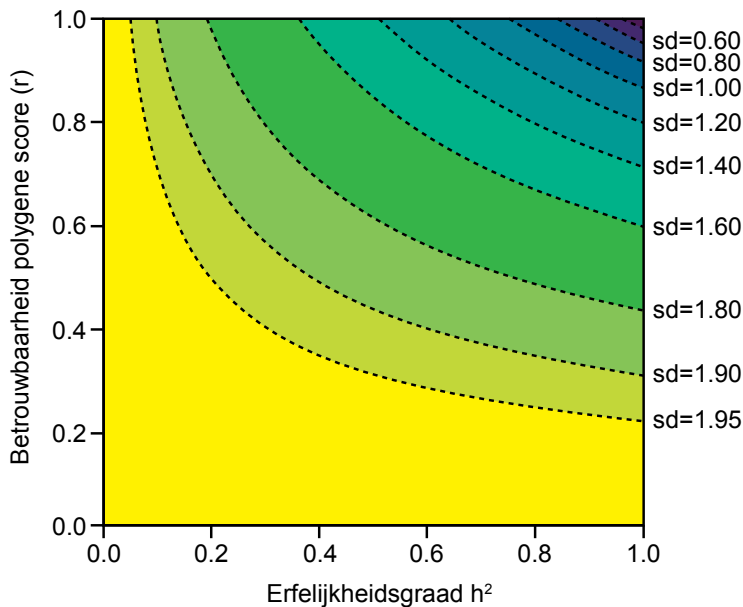
Weer terug naar de inleiding, waarin ik de tovenaar en de profeet uit het boek van Mann (2018) al noemde. *In vitro* gametogenese en CRISPR-Cas kiembaan modificatie passen typisch in het arsenaal van de tovenaar. Meer aandacht voor het milieu, ook het sociaal culturele milieu, past beter bij de profeet. De balans in dit boek zit meer in de richting van de profeet, maar de tovenaar is ook nodig. In het werkveld van de somatische celgenetica is dat heel beloftevol. Een betere match tussen patiënt en medicijn, en tussen kankercel en therapie, uitzicht op somatische gen-therapie of gerichte RNA interventies, allemaal dankzij de groei van de genomica in combinatie met de moleculaire biologie. Voor het proberen te begrijpen van de reproductiegenetica zijn de methoden van de tovenaar zoals gebleken ook niet te versmaden. Het heeft ons veel geleerd en er komt nog meer aan. Maar in de toepassingsfeer ligt mijn sympathie bij de profeet.

Het andere dat ik geprobeerd heb over te brengen is de ongelofelijke complexiteit van het leven op celniveau en in ieder individu. De balans tussen orde en wanorde en regulatie op ieder niveau. Valt dat alles nog wel onder het begrip "begrijpen"? Schoonheid en verwondering; het bijna religieuze gevoel dat hierbij opgewekt wordt, is dat wellicht meer iets voor de profeet? Het idee van onze sterk door de tovenaar gedomineerde cultuur, dat met een beetje sleutelen ieder, op reproductie gerichte biologisch vraagstuk wel op te lossen is, overdrijft de werkelijkheid. Er is behoefte aan een breder gedeelde bredere blik. Met deze uitgave hoop ik daaraan een kleine bijdrage geleverd te hebben.

Appendix 1

Door middel van **DNA** onderzoek is het mogelijk iets te zeggen over de erfelijke aanleg van een individu. Deze appendix gaat over erfelijke aanleg die op meerdere tot vele **genen** berust. Bij de mens staat deze benadering bekend als de **polygenic risk score** (de PRS, H6.2). De schatting van de erfelijke aanleg op grond van DNA is behept met een schattingsfout. Bovendien komt de erfelijke aanleg niet één op één tot expressie in het **fenotype**. Door omgevingsinvloeden kan het hoger uitpakken maar ook lager. De totale schattingsfout heeft dus twee bronnen: je weet de erfelijke aanleg niet zeker en ten tweede zijn er milieu-invloeden. De eerste schattingsfout hangt af van de nauwkeurigheid (r) waarmee de erfelijke aanleg wordt geschat, en de tweede hangt af van de **erfelijheidsgraad** (de h^2 , H6.1, fig 17). De nauwkeurigheid r staat hier voor de statistische correlatie tussen de “echte” erfelijke aanleg en de schatting ervan. Hoe beter de **“genetic architecture”** van een kenmerk bekend is (H6.2), hoe hoger de r en hoe kleiner de schattingsfout van de erfelijke aanleg. Hoe hoger de erfelijheidsgraad, hoe minder je er naast kunt zitten door milieu-invloeden.

Je kan dan de vraag stellen: als ik de schatting van de erfelijke aanleg heb, tussen welke waarden kan de expressie van die erfelijke aanleg (het fenotype), dan variëren? Wanneer je een grotere kans wil hebben dat de feitelijke expressie ook binnen die variatiegrenzen valt moet je die grenzen ruimer kiezen. Het is vrij gangbaar om als grenzen te nemen de schatting minus 2 x de schattingsfout en de schatting plus 2 x de schattingsfout. Als je de grenzen zo ruim kiest is de kans 2,5% dat de expressie in de praktijk toch nog lager uitvalt dan je benedengrens en ook 2,5% dat hij hoger uitvalt dan je bovengrens. In statistische termen uitgedrukt loopt het fenotypische bereik binnen de grenswaarden van plus 2 x de standaardafwijking tot minus 2 x de standaardafwijking (fig 17).



Wat staat er nu in de figuur. Op de X-as staat de h^2 en op de Y-as r . Op de overgangen tussen de kleurzones staat de aanduiding van fenotypische interval waarbinnen de schatting van het **genotype** valt. Dit is de schattingsfout van zonet, weergegeven in de fenotypische standaardafwijking als eenheid, waar we de waarde 1 aan hebben toegekend. De grenswaarden lopen dan van min dit getal x de standaardafwijking tot plus dit getal x de standaardafwijking. In het theoretische geval dat de h^2 en de r beide 1 zijn, valt het fenotype samen met de genetische informatie, het genotype. Bij een grotere h^2 en r wordt de waarde van de onder- en bovengrens kleiner. Maar in de figuur is te zien dat dit bijzonder langzaam gaat. Zelfs in de situatie dat beide gelijk zijn aan 0,8 (wat veel hoger is dan realistisch) is de grens nog steeds 1,42. De lezer zal misschien verbaasd zijn hoe groot de intervallen zijn. Dat heeft deels niets met DNA te maken, maar met het feit dat naar fenotypes wordt gekeken. Ter illustratie: een h^2 van 0,6 is in de praktijk een behoorlijke grote waarde. Als je in dat geval het genotype zeker weet is de schattingsfout toch altijd nog $\sqrt{1 - 0,6^2} = 0,8$ x de spreiding van de fenotypes. Dat simpele feit blijft je dus achtervolgen, hoe goed je het genotype ook maar leert kennen. Pas bij heel hoge erfelijkheidsgraden, dus vrijwel geen milieu-invloeden op de expressie van het genotype neemt de schattingsfout echt af. In een artikel in het gerenommeerde Amerikaanse tijdschrift *Genetics* van 2019 geeft de groep van Peter Visscher een formule waaruit je af kunt leiden dat vooral de grootte van de

referentiepopulatie, waarop de verdeling van de PRS is gebaseerd, bijdraagt aan een nauwkeurigere schatting. Het komt erop neer dat de ingewikkeldheid van het **genoom** in termen van het aantal bij een kenmerk betrokken **loci** bestreden moet worden met een zo groot mogelijke steekproef voor de statistiek van de PRS, denk aan 1 miljoen mensen. Van zo'n groep moet het genoom zijn gesequenced (**WGS**) en het te bestuderen fenotype moet beschikbaar zijn. Die steekproef is zo groot omdat ook mutaties die zeldzaam zijn maar wel een effect hebben op het fenotype, helpen om de invloed van het genotype op het fenotype vast te stellen.

De formule gebruikt bij het berekenen van de betrouwbaarheid van de genomische informatie:

$$\sigma_{P/A} = \sqrt{(1-r_{AA}^2 h^2)} \sigma_P$$

In deze formule staat $\sigma_{P/A}$ voor de schattingsfout op het geschatte fenotype. Het is een functie van σ_P , de spreiding van fenotypes, en verder van de nauwkeurigheid waarmee het genotype is geschat (r) en de erfelijkheidsgraad (h^2).

In de praktijk kan je aan de hoogte van [formule: h^2] iets doen door de fenotypes te corrigeren voor systematische invloeden zoals bijvoorbeeld leeftijd en geslacht. Je kijkt dan naar het fenotype dat bijvoorbeeld geldt op een leeftijd van 30 jaar, gemiddeld voor vrouwen en mannen. Welke systematische invloeden van belang zijn hangt van het kenmerk af. Bij ziektes kan je bijvoorbeeld denken aan correctie voor risicofactoren zoals roken, alcoholgebruik en overgewicht. Maar ook als je dat doet blijft een erfelijkheidsgraad van 0,6 best een mooie hoge waarde.

De waarde van r kan verhoogd worden door meer te weten op DNA niveau. Bijvoorbeeld door de werking van meer genen te kennen en/of door hele genomen te sequensen. Ook helpt het om gegevens van familieleden in de schattingen te betrekken en alle aspecten van het fenotype die iets zeggen over het kenmerk waarover het gaat. In de veefokkerij worden al die bronnen benut, DNA informatie en fenotypes van het individu en familieleden. In het geval van veel familieleden (honderden nauwe verwanten) kan je dan komen tot een r die heel dicht bij de 1 ligt, maar bij de mens is ook voor deze parameter 0,6 waarschijnlijk best hoog.

NR Wray et al., Complex Trait Prediction From Genome Data: Contrasting EBV in Livestock to PRS in Humans: Genomic Prediction. *Genetics* 2019 Apr;211(4):1131-1141. PMID: 30967442, DOI: 10.1534/genetics.119.301859 [Review]

Nawoord

Tijdens de meer dan vier jaar die er aan dit boek is gewerkt, hebben vele mensen er op de een of andere manier aan bijgedragen. Door te stimuleren, door materiaal aan te leveren, door te zorgen voor een collegiale omgeving, of door kleinere tot soms behoorlijk grote stukken van het boek van commentaar te voorzien.

Zonder de bereidheid van Martien Groenen, hoofd van de afdeling fokkerij en genomica van de WUR en de mensen om hem heen, om huisvesting op de afdeling te verlenen, was het allemaal niets geworden. Ik (PdB) kon er binnen lopen bij Henk Bovenhuis, Piter Bijma, Mario Calus, Ole Madsen, Aniek Bouwman, Henri Woelders en Richard Crooijmans, een beetje zoals het vroeger was. In de voorbereidende fase zijn Fons Debets en Bas Zwaan van de afdeling erfelijkheidsleer van de WUR zeer behulpzaam geweest en ook John van der Oost van de afdeling microbiologie heeft mij geïnspireerd. Vanuit mijn Nijmeegse verleden is door Didi Baart, Jan Kremer, Ad Geurts van Kessel, Han Brunner, Lisenka Vissers en Liliana Ramos positief op dit plan gereageerd.

Willy Baarends, Aniek Bouwman, Mario Calus, Han Brunner, Alwin Derijck, Godfried van der Heijden (titel boek), Kamlesh Madan (tabel 4), Manon Oud, Johan van Ooijen, Joke de Pater, Antoine Peters, Dick de Rooij, en Henk Sulkers hebben me voorzien van materiaal en dat is ook gebeurd door enkele anonieme reviewers. Pim Brascamp heeft de basis gelegd voor de appendix (met de figuur van Mario Calus), lang nadat we in 1970 samen per Fiat 850 naar onze stages op het IVO "Schoonoord" in Zeist reden.

Commentaar van en discussie met proofreaders is onmisbaar. Dank je wel Willy Baarends, Mario Calus, Edwin Cuppen, Christian Gilissen, Martien Groenen, Anton Grootegoed, Godfried van der Heijden, Ewart Kuijk, Aafke van Montfoort, Manon Oud, Antoine Peters, Liliana Ramos,

Hein te Riele, Dick de Rooij, Klaas Swart, Elmar Tobi en Marieke de Vries, dank jullie wel. Ook Peter Visscher voegde een correctie toe.

Een speciaal woord voor Bé Wieringa. Het eerste hoofdstuk “Impressie van een cel” is gebaseerd op zijn afscheidscollege in Nijmegen (2018). Dank je Bé voor het op niveau brengen van de celbiologie in hoofdstuk 1 inclusief je werk aan box 1, dat maakt het verschil. Een nog groter verschil ontstond toen je als editor namens Radboud University Press een grote rol toebedeeld kreeg. Geen steen bleef onomgekeerd, het heeft de soliditeit van het werk goed gedaan. De reviewers van het boek worden hartelijk bedankt voor de bijdragen die ze geleverd hebben.

Zoals al bleek zijn Mario Calus en Pim Brascamp grotendeels verantwoordelijk voor de appendix over de betrouwbaarheid van de “polygenic risk scores”. Maar het blijft lastig om hun genetisch-statistisch inzicht in logische taal weer te geven, oordeel zelf.

In dit boek is een grote hoeveelheid kennis die de periode vanaf de jaren 50 beschrijft, bij elkaar gebracht. Interpretatie dilemma's zijn dan onvermijdelijk en fouten zullen ook nog wel te vinden zijn. De auteur blijft verantwoordelijk. Een boek als dit wordt ook in delen door de tijd ingehaald. Dat geldt bijvoorbeeld voor de resultaten van **NGS** op populatieniveau. Maar de eerste bevindingen van deze benadering worden hier wel vermeld, ondanks het feit dat ze nog te veel beperkt zijn tot de westerse wereld.

Hoe verder in dit project werd gedwaald, hoe groter en indrukwekkender de kleine wereld van de cel in zijn algemeenheid en de gameten in het bijzonder werden. Voorstellen kun je het je niet. Cellen als levensvorm en wat ze alleen en in samenhang met andere celtypen opbouwen, een nauwelijks tot niet in het bewustzijn op te nemen wereld en wel daarom een platform voor religieus gevoel om op te landen, of diepe verwondering wanneer je dat gevoel niet hebt. Die extreem lange ontstaansgeschiedenis afwegen tegen het langzaam, langzaam toevoegen van nieuwe genetische variatie, is achteruitkijken makkelijker dan vooruit? Dat voelt als een groot contrast met de korte termijn van onze cultuur; door extreme specialisatie gedreven snelle veranderingen, lokaal en mondiaal met als sluitpost “het milieu”. Het fenotype is nu eenmaal afhankelijk van genotype en milieu (H6).

Het benaderen en hopelijk ordenen van het grotere verband tussen genetica en voortplanting was wel de hoofddrijfveer de afgelopen jaren en dat heeft ook risico's, zoals de kans om in de chaos van de omgevallen boekenkast te belanden. De kwaliteit van de figuren is de beste dam die we daartegen kunnen opwerpen. De samenwerking met Marc is bijzonder geweest. Een speciaal woord van dank is gericht aan Olga Commandeur en Duco Bauwens van “Nederland in beweging”.

De werkrelatie met Radboud University Press is pas in de laatste fase van dit project begonnen. Die is soepel verlopen, dank je Natalia, Elisabeth, Hanan, Romy en Rita.

Lieve Alie, zonder jouw nabijheid was het wederom niet gelukt om de bewustzijnsvernauwing, waar dit soort van projecten mee gepaard gaat, een beetje te beheersen, heel veel dank!

Saane, J.W. van. *De rol van gevoelens en emoties in de religieuze ervaring. Een theoretisch psychologische benadering*. Dissertatie Vrije Universiteit Amsterdam. Kampen: Kok, 1998

Verklarende begrippenlijst

Acrosoom Blaasje dat over de kern van de zaadcel geschoven zit en essentieel is voor de bevruchting (fig 39, 42).

Acrosoomreactie Fusiereactie tussen het membraan van het **acrosoom** en de celmembraan van de zaadcel waardoor als inleiding op de bevruchting de inhoud van het acrosoom vrij komt (fig 39, 42).

Allel Eén van de verschillende vormen van een **gen** op dat bepaalde **locus** (is **chromosomale** positie) (fig 13).

Allelfrequentie De maat voor het in de populatie aanwezig zijn van een bepaald **allel**: wordt berekend als het absolute aantal van dit specifiek allel gedeeld door 2x het aantal individuen waarin dat is bepaald.

Aminozuur Het organische molecule dat dient als de fundamentele bouwsteen van eiwitten. Verschijnt in 20 soorten.

Androgenen Klasse van mannelijke geslachtshormonen.

Androgenont Een embryo met alleen maar van de vader afkomstig genetisch materiaal.

Aneuploïd Relatief geringe afwijkingen van het voor de soort specifieke aantal **chromosomen**, op **haploïd** en **diploïd** niveau.

Apoptose Het cellulaire mechanisme dat verantwoordelijk is voor geprogrammeerde celdood.

Atresie Het door **apoptose** in regressie gaan van weefsel, in dit geval van toepassing op ovariële follikels (fig 28, 29).

Autoradiografie Microscopische techniek waarbij de radioactieve straling van een geïncorporeerd molecule na het ontwikkelen van een fotografische emulsie over het preparaat zichtbaar wordt.

Autosomen Alle **chromosomen** die niet met de geslachtsbepaling te maken hebben (fig 12).

Azoosperm De afwezigheid van zaadcellen in het ejaculaat.

Biomarker Meetbare indicator, bijvoorbeeld de hoeveelheid van een organisch molecuule, bedoeld om inzicht te krijgen in de toestand van een cel, celklompje of individu.

Bivalenten De gepaarde **homologe chromosomen** tijdens de **meiose** (fig 13, 14, 15).

Blastocyst Pre implantatie embryo waarin vanuit een klompje cellen een holte is verschenen (zie fig 43).

Blastomeren De enkele cellen in een pre implantatie embryo tot aan het **blastocyst** stadium.

Capacitatie Het proces waarin zaadcellen het vermogen verkrijgen om de **acrosoomreactie** te ondergaan (fig 39, 42).

Centromeer Een gespecialiseerde regio (in termen van de **DNA** basenvolgorde) op **eukaryotisch chromosomen** waarin eiwitten zich zo organiseren dat er verbinding met de **spoelfiguur** van de celdeling plaats kan vinden (fig 3).

Chiasma De X-achtige configuratie van **homologe chromosomen** die bij het spiraliseren van de **bivalenten** op de plaats van **crossing over** ontstaat, en die met de lichtmicroscop waar te nemen is (fig 14).

Chimaera Individu dat bestaat uit (meestal) twee verschillende **genotypen**, ontstaan door de fusie van twee verschillende **zygoten**.

Chip array Een systematische ordening van stukjes **DNA** met een bekende **genoompositie** op microniveau, te gebruiken voor het geautomatiseerd opsporen van afwijkingen van **diploidie** op **chromosomale** en subchromosomale schaal.

Chromatiden De twee replica's van een **chromosoom** na de chromosoomverdubbeling tijdens de S fase, ook wel zusterchromatiden genoemd (zie fig 3).

Chromatine Verzamelnaam voor het moleculaire materiaal van het **chromosoom**.

Chromosoom De organisatievorm van een enkel lang **DNA** molecuule met alle **chromatine** eiwitten en **RNA** soorten die daarbij horen (fig 3, 7).

Chromosoom mutatie Een verandering in het aantal chromosomen en/of de **DNA** samenstelling van een **chromosoom** (of chromosomen), wanneer de verandering betrekking heeft op een gebied groter dan 50 basen.

CNV Zie "**Copy number variation**".

"**Copy number variation**" Variatie tussen en binnen individuen met betrekking tot het aantal herhalingen van een in grootte variërend **DNA** segment (in tandem).

Cohesine complex Het eiwitcomplex dat de zuster**chromatiden** vanaf de S-fase bij elkaar houdt (fig 4, 6).

Complementatie De productie van een wildtype **fenotype** uit twee gameten die niet volledig **haploïd** zijn. De afwezigheid van genetisch materiaal in de ene wordt gecompenseerd door het dubbel aanwezig zijn ervan in de andere om tot en **diploïd genotype** te komen.

Congenitale afwijkingen Aangeboren afwijkingen.

Crossing over Het moleculaire proces van reciproke uitwisseling tussen **homologe chromosoomsegmenten** (fig 14).

Cryopreservatie Het gecontroleerd invriezen en in vloeibare stikstof bij -196 graden Celsius bewaren van in dit geval zaadcellen, eicellen en pre implantatie **embryo's**.

Cytogenetica De tak van de genetica die zich op microscopisch niveau met de vorm en het gedrag van **chromosomen** bezig houdt, in de **mitose**, in de **meiose** en als gevolg van **DNA** beschadigingen.

Cytoplasma De hele inhoud van de cel met uitzondering van de kern.

DDR Zie bij "**DNA damage response**".

Dimeer Een structuur die uit twee gelijke subeenheden bestaat, bijvoorbeeld twee identieke eiwitten. De term wordt ook gebruikt voor twee opeenvolgende **DNA** basen.

Diploïd Een cel of individu met twee sets **chromosomen**, ieder met in principe dezelfde informatie (met uitzondering van de X en Y bij mannen).

Disomie Slaat op de **haploïde** situatie, waarbij van één bepaald chromosoom er twee exemplaren aanwezig zijn.

DNA Ketens van gekoppelde **nucleotiden** gekarakteriseerd door de DNA basen A,C,G,T met deoxyribose als suikermolecule. Naast **RNA** een van de twee nucleïnezuren. In **chromosomen** zijn de twee ketens in tegengestelde oriëntatie in de vorm van een dubbele helix aanwezig (dubbelstrengs, fig 5, 7). Bij het functioneren van chromosomen kunnen korte stukken ook enkelstrengs voorkomen.

"DNA damage response" **DDR** De georkestreerde reactie van een cel op beschadigingen inclusief chemische modificaties van het DNA.

"DNA fingerprint" Een voor ieder individu uniek bandenpatroon (bar code) dat ontstaat door het **DNA** te knippen (met een restrictie-enzym), de fragmenten te elektroforesen en daarna het DNA te **hybridiseren** met een gemerkt stukje zoek-DNA met daarop de sequentie van een minisatelliet (zie H2.3.3).

Dominant Het **allel** waarvan het **fenotype** zichtbaar is in een **heterozygoot**.

Dosis compensatie Het mechanisme dat er in grote lijnen voor zorgt dat bijvoorbeeld voor het X chromosoom de hoeveelheid genproduct in beide geslachten (XX en XY) gelijk is.

Effectieve populatiegrootte, Ne Een manier om de populatiegrootte te berekenen op basis van de bijdrage van iedere ouder aan de volgende generaties.

Embryo Het ontwikkelingstraject van nieuw leven vanaf de bevruchting tot en met de fase waarin de organen zijn aangelegd, bij de mens in de 8^e week, en bij de muis na 14 dagen (zie ook bij **foetus**).

Embryonale stamcel Cellen afkomstig uit de “**inner cell mass**” of de **epiblast** (fig 43) die het vermogen hebben behouden om in ieder type lichaamscel te kunnen differentiëren, dus **pluripotent** zijn.

“Endocrine disruptor” Chemische stof/verbinding die, vaak prenataal interfereert met de hormoonhuishouding, waaronder de geslachtshormonen. Kan van natuurlijke oorsprong zijn, bijvoorbeeld plantaardig.

Endonuclease Een klasse van enzymen die de **DNA** dubbele helix knippen en dat vaak doen op geleide van een simpele DNA code van 4 – meerdere basen.

Epiblast De cellen die zich rond de implantatie vanuit de “**inner cell mass**” ontwikkelen en waaruit de drie **kiembladen**, endoderm, mesoderm en ectoderm ontstaan (fig 43).

Epigenetica De overdracht, naar volgende cel- en individu-generaties, van een patroon van **genexpressie** waarbij een verandering van de **DNA** code niet aan de orde is.

Epistasie Beschrijft de interactie tussen genen, waarbij een mutatie in het ene **gen** de expressie van een ander gen (of andere genen) verandert of onmogelijk maakt.

Epitheel Weefsellaag die een onderliggende of bovenliggende laag afsluit. Geldt zowel voor een naar buiten gericht oppervlak (huid) als een intern oppervlak zoals bij holten en bloedvaten, de afvoerbuis van de testis, de interne bekleding van eileider en baarmoeder.

Erfelijkheidsgraad Ook wel h^2 genoemd. De genetische variantie uitgedrukt als fractie van de fenotypische variantie. Deze maat is gebonden aan de bestudeerde populatie en geldt voor het milieu waarin de metingen aan het **fenotype** worden verricht (fig 17).

Euchromatine De meerderheid van **chromatine** die of een open pakking heeft, of makkelijk in een open pakking, compatibel met **transcriptie** kan transformeren.

Eukaryoten Organismen bestaande uit één cel of (meestal) meerdere cellen met een duidelijke kern omgeven door **cytoplasma**.

Euploid Geeft aan dat het voor de soort correcte aantal **chromosomen** en in de correcte vorm aanwezig is.

Exon, Exonen Die delen van het **gen** die volgens de **genetische code** worden vertaald in eiwit. Daartoe worden de exonen in een proces dat met rijping wordt aangeduid uit het primaire transcript (**messenger RNA, mRNA**) geknipt (fig 9).

Exoom Het totaal van tot expressie gebracht **DNA** van een cel of weefsel, uitgedrukt als de productie van rijp **messenger RNA**.

F1, F2, F3 etc. F betekent "filial", het cijfer de generatie. De F1 is het product van de eerste kruising. Deze manier van noteren wordt toegepast wanneer de volgende paringen binnen de eerste nakomelingschap plaatsvinden.

Fenotype De uiterlijke verschijning van een individu, kan gaan om het totaal maar vaak om een specifiek kenmerk.

FISH Fluorescentie in situ hybridisatie Microscopisch onderzoek van **chromosomaal DNA** (op glas of in de celkern) waarbij een stukje gemerkt zoek-DNA (de probe), gaat **hybridiseren** (een dubbele helix gaat vormen) met het te onderzoeken chromosomale DNA. Het stukje zoek-DNA dat bijvoorbeeld specifiek is voor een gen, kan na hybridisatie m.b.v. **fluorescentie microscopie** zichtbaar gemaakt worden.

Fitness Maat voor het relatieve voortplantingssucces van een individu, **genotype** of (sub)populatie.

Fluorochroom, fluorescentie microscoop Een vorm van microscopie waarbij gebruik wordt gemaakt van een fluorochroom, een molecule dat bij aanstralen met licht van een bepaald golflengtebereik, licht met een langere golflengte uitstraalt (in de meest simpele vorm blauw, groen of rood). Zo'n fluorochroom fungeert als detectiemolecuul en is meestal gekoppeld aan een specifiek antilichaam, maar er zijn er ook die direct binden aan bijvoorbeeld **DNA**.

Foetus De vrucht in de prenatale ontwikkelingsstadia vanaf het embryonale stadium tot aan de geboorte, wanneer groei en verdere rijping gaan domineren (zie ook bij **embryo**).

Gameten De mannelijke en vrouwelijke (**haploïde**) voortplantingscellen.

Gametogenese Het proces van celdifferentiatie en celdeling dat de **haploïde gameten** produceert.

Gen De eenheid van erfelijkheid bestaande uit een regulatorisch domein (om **transcriptie** mogelijk te maken) en een domein dat wordt vertaald (getranscriptieerd) in **RNA**.

Genconversie Eén van de uitkomsten van de reparatie van dubbel strengs breuken tijdens de meiotische profase, waarbij er een **allel** van het ene **homoloog** verandert in het allel van het andere (2:2 >> 3:1).

Gendosis effect Proportionaliteit tussen de mate van functionaliteit van het **gen** en het aantal gen kopieën.

Genenkaart Grafisch voorstelling van de ligging van de genen op het **chromosoom** met de kans op **recombinatie** als maat voor de onderlinge afstanden.

Generatie interval De gemiddelde leeftijd van de ouders bij de geboorte van het “gemiddelde” kind (algemeen nakomelingen).

“Genetic architecture” De genetische basis van een kenmerk dat berust op de expressie van meerdere, vaak vele genen.

“Genetic redundancy” Het verschijnsel dat het missen van genetisch materiaal niet aan het **fenotype** merkbaar is. Er is sprake van **genen** met overlappende functies.

Genetische achtergrond Ook wel restgenotype genoemd. Daarmee wordt het overall genotype bedoeld waarin bijvoorbeeld een **mutant** wordt bestudeerd.

Genetische code De vertaling van de **DNA** basenvolgorde (in **tripletten**) in **aminozuren**. De code staat genoteerd in **RNA** taal.

Genetische dissectie Het uit elkaar rafelen van de genetische achtergrond (in voornamelijk **genen**, de “**genetic architecture**”) van in principe alle **fenotypische** kenmerken.

Genetische koppeling. Het verschijnsel dat **allelen** die op hetzelfde **chromosoom** liggen bij de overdracht naar de volgende generatie bij elkaar blijven, omdat de kans op **crossing over** tussen de **genen** met die verschillende **allelen** lager is dan 1.

Genomica, “genomics” De wetenschap die zich met de informatie-inhoud van het complete **DNA** van soorten bezig houdt.

Genomische imprinting Het **epigenetische** verschijnsel dat de activiteit van een **gen** in het nageslacht afhankelijk kan zijn van de afkomst van de **gameet** (van vader of moeder). De expressie vererft dus alleen via de vader of de moeder. Minder absolute vormen komen voor (veel expressie versus weinig expressie).

Genoom De totale genetische informatie over alle **chromosomen**. Wordt zowel in een **haploïde** (een set) als in een **diploïde** context (twee sets) gebruikt. Binnen de **genomica** slaat het op de diploïde situatie.

Genoom brede associatie studie (Engels: **GWAS**, “**genome wide association study**”) Methode om met behulp van vele over het genoom verspreide genetisch polymorfismen (lees **SNPs**) in grote populaties een statistische samenhang te ontdekken tussen een subpopulatie van die polymorfismen (lees **allelen**) en het te bestuderen kenmerk. GWAS is een opmaat tot het ontdekken van de “**genetic architecture**”.

Genotype Meestal gebruikt om de **allel** compositie van een enkel **gen** of een aantal genen mee aan te duiden, maar het slaat ook op het hele **genoom** in de **diploïde** betekenis.

Germinal cel Zie bij **kiemcel**.

Geslachtschromosomen De **chromosomen** die (leidend) betrokken zijn bij de geslachtsdeterminatie en waarvan de af- of aanwezigheid correspondeert met het geslacht.

Gonadotrope hormonen De boodschapper hormonen afkomstig van de hypofyse die via receptoren op **somatische** cellen in de gonade, van essentieel belang zijn voor de sturing van de **gametogenese**.

Gray (Gy) Maat voor de hoeveelheid door weefsel geabsorbeerde stralingsenergie.

GWAS Zie bij **genoom brede associatie studie**.

Gynogenont Een embryo met alleen maar genetisch materiaal van de moeder.

h² Zie bij **erfelijkheidsgraad**.

Haploïd Een cel of organisme met maar één set **chromosomen**.

Haplo-insufficiëntie Situatie waarbij één enkele genkopie onvoldoende is om het normale **fenotype** te genereren (of voor meerdere genen: enkelvoudige kopieën).

Haplotype Het **genotype** van een segment van een **chromosoom** in enkelvoud (dus in **haploïde** toestand).

Heterochromatine constitutief Intens kleurend **chromatine**, dat vaak rond de **centromeren** zit, soms elders in het **chromosoomportret**, en in een interfase kern altijd inactief is.

Heterochromatine facultatief. Intens kleurend **chromatine**, afhankelijk van de inactiviteit ervan. Het bekendste voorbeeld is het X **chromosoom**.

Heterosis Het verschijnsel dat de **F1** vitaler is dan de uitgangslijnen, ook wel “hybrid vigor” genoemd.

Heterozygoot De aanwezigheid van twee verschillende **allelen** op een **locus** van een **gen** in een **diploïd** organisme (fig 13). Maar toepasbaar op ieder **DNA** motief, speciaal **SNPs** (fig 16).

Histologie De tak van de biologie die de microscopische anatomie van cellen en weefsels bestudeert.

Histonen Familie van geconserveerde kleine basische eiwitten waaruit de **nucleosomen** zijn opgebouwd (fig 7, 8).

Homeostase Het vermogen van meercellige organismen om het interne milieu in evenwicht te houden, ondanks veranderingen in de omgeving waarin het organisme zich bevindt.

Homologen De van beide ouders gekregen zelfde (of overeenkomstige) **chromosomen** die **meiotisch** kunnen paren (fig 13, 14).

Homologe recombinatie Het proces van uitwisseling van homologe **chromosoomsegmenten**, dat door de **meiotische** paring mogelijk wordt gemaakt (fig 13, 14).

Homozygoot De aanwezigheid van twee identieke **allelen** op een **locus/gen** in een **diploïd** organisme.

“Human genome project” Het internationale onderzoeksproject dat in 2003 eindigde met de ontrafeling van de **DNA** code van het menselijke **genoom**.

Hybriden De nakomelingen van kruisingen tussen partners met een zekere genetische afstand, tot uitdrukking komend in **allelverschillen**.

Hybridisatie Het in een laboratoriumomgeving tot stand brengen van de vorming van een dubbele **DNA** helix uit twee enkelstrengs DNA moleculen. Ook **RNA** kan in de helixvorming participeren.

ICM Zie bij **“inner cell mass”**.

Immunofluorescentie Het door middel van **fluorescentie** en met behulp van antilichamen microscopisch aantonen van vaak minieme moleculaire structuren.

Impact factor De in de wetenschappelijke wereld gebruikte maat om het belang van een tijdschrift aan te tonen. Deze is gebaseerd op het aantal citaties van de artikelen over de afgelopen twee jaar.

Imprinting Zie **genomische imprinting**.

Indel Samentrekking van insertie en deletie als kleinschalige, één tot enkele basen omvattende mutatiegebeurtenis, waarbij respectievelijk een **DNA** base (- basen) worden toegevoegd of verdwijnen.

“Inner cell mass” Het klompje cellen dat bij de vorming van een holte in het pre implantaire **embryo** (op de overgang van het morula naar het blastocyst stadium, fig 43), aan één zijde verschijnt.

Intron Contrasterend met het **exon** zijn dit de stukken van het **gen** die wel worden afgelezen, **getranscribeerd**, maar die bij de vorming van het rijpe **messenger (m)RNA** er in de kern uit worden geknipt (fig 9).

Ioniserende straling Verzamelnaam voor energierijke straling die in staat is de covalente bindingen die tot molecuulvorming leiden, te verbreken. Veroorzaakt schade aan bijvoorbeeld **DNA**.

Karyogram Systematische ordening van de **mitotische** chromosomen, vaak na toepassing van **chromosoom** bandering om de **homologe** paren samen te stellen.

Karyotype Het individu- of soortspecifieke **karyogram**.

Kiembaan De door **mitotische** en **meiotische** delingen verbonden opeenvolgende cel stadia vanaf de vorming van de eerste identificeerbare **kiemcellen** tot en met de **gametogenese**, waardoor de generaties met elkaar worden verbonden.

Kiembladen De producten van de eerst differentiatie in de drie basale **embryonale** celtypen ectoderm, mesoderm, en endoderm uit de **epiblast** in de late blastocyst (fig 43).

Kiemcel Cel in de **kiembaan** vanaf het identificeerbare stadium in de vroege embryogenese tot aan de rijpe **gameten**.

Kinase Een klasse van enzymen die fosfaatgroepen aan eiwitten kunnen hechten en daarmee de activiteit van die eiwitten mede reguleren.

“**Knockin**” Het via genetische manipulatie veranderen van een **gen** of het toevoegen van een nieuw gen.

“**Knockout**” Uitdrukking gebruikt voor het via genetische manipulatie uitschakelen van een **gen**.

Locus Meestal de plaats op het **chromosoom** waar het **gen** zich bevindt, maar kan betrekking hebben op ieder onderscheidbaar **DNA** motief.

“**Maternal to Zygote**” **overgang** De fase tijdens de eerste klievingsdelingen van het **embryo** waarin de invloed van het maternale **cytoplasma** afneemt en de invloed van de vroeg embryonale genexpressie van het eigen **genoom** toeneemt.

Meiose De twee opeenvolgende delingen in de **gametogenese** die leiden tot de **haploïde gameten** (fig 13).

messenger RNA, mRNA Term voor het **transcript** dat na rijping in de kern ontstaat. De rijpe vorm bevat alleen nog maar de voor eiwit coderende informatie van de **exonen** (fig 9). Het primaire transcript wordt ook wel pre messenger RNA genoemd.

Metabolisme Het totaal aan chemische reacties dat in een levende cel, weefsel en individu plaats vindt met de **metaboliëten** als tussenstap of eindproduct.

Methyloom De methylatie status van cytosine, meestal in de context van een CpG dimeer, en in principe over het hele **genoom** (fig 11).

“**Mismatch repair**” (**MMR**) Eén van de **DNA** base gerichte hoofdroutes voor DNA herstel, het meest actief tijdens de DNA replicatie (fig 5). Met mismatch wordt bedoeld dat er niet-correcte basenparen aanwezig zijn (tegenover een A geen T, en zo verder).

Mitose Een kerndeling, meestal gepaard gaand met een celdeling, die twee genetisch gelijke dochtercellen produceert.

MMR Zie bij “**mismatch repair**”.

Monosomie Situatie waarbij van een enkel **chromosoom** er in een **diploïde** cel of organisme maar één kopie aanwezig is.

Mozaïek Organisme opgebouwd uit cellen met verschillen in het **genotype**, die uit één **zygote** na de bevruchting zijn ontstaan. Door X **chromosoom** inactivatie is elk individu met twee of meer X chromosomen een mozaïek, in dit geval veroorzaakt door verschillen in genexpressie.

MtZ Zie bij “**maternal to zygote**”.

Mutagen, mutagene stof of fysische behandeling Stoffen (of behandelingen zoals met **ioniserende straling**) die het vermogen hebben het **DNA** te beschadigen, waardoor er na reparatie een verandering in het DNA kan zijn ontstaan (de reparatie verloopt niet altijd foutloos).

Mutatie Een door een **mutagen** geïnduceerde of spontaan optredende verandering in het **DNA**. De cel of het individu met de mutatie is een **mutant**.

Mutatiefrequentie De kans dat een **allel**kopie bij overdracht naar een volgende generatie verandert. Dit begrip wordt ook toegepast op een **somatische** celgeneratie.

Mutatiespectrum De waaier aan genetische veranderingen die in de geschiedenis is opgetreden voor een enkel **gen/locus**. Vooral van belang voor aandoeningen die berusten op een enkel gen.

Mutator fenotype Grotere genetische variatie in het nageslacht veroorzaakt door een verhoging van de spontane **mutatiefrequentie** als gevolg van een genetisch defect in het onderhoud (“repair”) van het **DNA**.

“**Nature versus nurture**” Misleidend gezegde, voortkomend uit een te betwisten overmacht van of het **genotype** of de omgeving op de manifestatie van het **fenotype**. Het genotype is in een constante wisselwerking met de omgeving met soms een dominantere rol voor het genotype, soms de omgeving en meestal iets ertussen in.

Ne Zie bij **effectieve populatie grootte**.

“**Next generation sequencing**” (**NGS**) Geautomatiseerde grootschalige **DNA** basenvolgorde bepaling, mogelijk gemaakt door microtechnologie en data verwerking. Diagnostisch vaak op het **exoom**, de genen die tot expressie komen, maar steeds vaker voor het hele **genoom**.

NGS Zie hiervoor “**next generation sequencing**”.

Non disjunctie Een niet-correcte verdeling over de dochtercellen van **chromosomen** en **chromatiden** in **mitose** en **meiose**. De letterlijke vertaling, “niet uit elkaar gaan”, dekt niet alle mechanismen (fig 30).

Nucleolus Dichte structuur in de kern nabij de in vele kopieën voorkomende genen voor ribosomaal **RNA** (rRNA) dat in de nucleolus wordt verwerkt en nodig is voor de eiwitsynthese (fig 2).

Nucleosoom De basiseenheid van de organisatie van het **chromosoom**, een “bal” van 8 histoneiwitten waaromheen het **DNA** gewonden zit (fig 7, 8).

Nucleotide De basisbouwsteen van **DNA** en **RNA**, bestaande uit de stikstof bevattende base aangeduid met A, C, G en T (in DNA) of U (in RNA), een suikermolecule (deoxyribose in DNA, ribose in RNA) en een fosfaatgroep (box 1).

Oestrogenen Klasse van vrouwelijke geslachtshormonen.

Oestrus De periode in de ovariële cyclus van zoogdieren waarin paringsactiviteit met de mannelijke partner wordt toegestaan.

Oligospermie Telling van zaadcellen in het ejaculaat die onder een door vakgenoten bepaalde grens zakt (tabel 5).

Oogenese Het cellulaire differentiatieproces dat leidt tot de productie van rijpe te bevruchten eicellen.

Organel Een microscopisch te identificeren structuur of subcompartiment van een **eukaryotische** cel met omschreven functies.

Orthologen Genen in verschillende soorten met een nog steeds te herkennen evolutionair zelfde oorsprong in een gemeenschappelijke voorouder.

Oxidatieve stress Een te hoge dichtheid van reactieve zuurstofmoleculen in en rond de cellen.

PAR Zie bij “**pseudo autosomal region**”.

Paralogen Sterk aan elkaar verwante genen binnen het genoom, ontstaan door de verdubbeling van genetisch materiaal (term verwant aan het begrip genfamilie).

Parthenogenese, parthenogenont Organisme ontstaan door activatie van de eicel, zonder tussenkomst van de zaadcel.

Pluripotentie Het vermogen tot differentiatie in ieder type lichaamscel.

Pluripotente stamcel Een vroeg embryonale of **somatisch** geïnduceerde cel die nog in ieder type lichaamscel kan differentiëren.

Polygeen Wordt gebruikt voor kenmerken die op meerdere, vaak vele **genen** berusten. Ook andere **DNA** motieven, die bijvoorbeeld te maken hebben met de regulatie van het gen, kunnen een rol spelen. Het contrasterende begrip is monogen.

Polyplöidie De aanwezigheid van meer dan twee sets **chromosomen** (het **haploïde** aantal) per cel of individu.

Post translationele modificatie Een bewerking van een eiwit direct na de translatie en daarna, waarbij een variatie aan moleculen, waarvan fosfaat de meest bekende is, op specifieke plekken

aan het eiwit worden gehecht. Er bestaan zeker meer dan 50 van dergelijke modificerende moleculen.

Primordiale kiemcellen Het eerste gespecialiseerde **kiemcel** stadium dat embryonaal geïdentificeerd kan worden (fig 22).

Promotor Dat deel van het **gen** dat sterk betrokken is bij de regulatie van de activiteit ervan en waaraan het **RNA** polymerase (fig 9) kan hechten.

Proteïne kinase Zie bij **kinase**.

Proteoom De verzameling eiwitten in een cel of weefsel. "Proteomics" is de wetenschap die zich met deze verzameling en de functies ervan bezig houdt.

PRS "Polygenic risk score" Statistische maat (schatting) per individu voor de genetische bijdrage aan de variantie van lichaamskenmerken.

"Pseudo autosomale region" PAR Een relatief kleine deel van een **geslachtschromosoom** dat na de evolutie van een oorspronkelijk volledig **homoloog** paar, de homologie heeft behouden om **crossing over** tussen de nu grotendeels verschillende geslachtschromosomen mogelijk te laten blijven (fig 15, 37, 38).

PTM Zie bij **post translationele modificatie**.

Recessief, recessief allel Een **allel** waarvan het **fenotypische** effect niet in een **heterozygoot** te zien is.

Recombinase Een verzamelnaam voor enzymen met een kernfunctie in de processen die leiden tot **recombinatie**.

Recombinatie Kernbegrip (naast **mutatie**) in de genetica. Het ontstaan van nieuwe combinaties van **allelen** voor verschillende **genen**. Wanneer deze op verschillende **chromosomen** liggen wordt de recombinatie weergegeven in de tweede wet van Mendel (H5.3). Wanneer de genen voor deze allelen op eenzelfde chromosoom liggen zorgt **crossing over** hiervoor.

Replicatie Het kopiëren van **DNA**, meestal als voorbereiding op een volgende celcyclus.

Retrotransposons Een klasse mobiele genetische elementen, die bewegen door a) **transcriptie** en vervolgens b) de activiteit van een "**reverse transcriptase**" gevolgd door herintegratie in het **genoom**.

"Reverse transcriptase" Een enzym dat **DNA** kan synthetiseren met **RNA** als voorbeeld en matrijs.

RNA Eén van de twee nucleïne-zuren. Ketens van **nucleotiden** die ontstaan via **transcriptie** van **DNA**. Er worden twee categorieën onderscheiden: "coding" *i.e.*; te vertalen in de aminozuurvolgorde van een eiwit (de rijpe **messenger RNAs**), en "non coding". Deze tweede groep valt

ruwweg uiteen in twee subgroepen, “long” en “small non coding”. Binnen de “small non coding” worden er meerdere fracties onderscheiden, waaronder de tRNAs essentieel voor de eiwitsynthese (fig 9). Daarnaast is er nog “non coding” ribosomaal RNA, ook nodig voor de eiwitsynthese (rRNA, in de ribosomen: (fig 2), zie ook bij **nucleolus**). RNA functioneert meestal enkelstrengs maar kan ook dubbelstrengs voorkomen.

RNA polymerase Klasse van enzymen die **RNA** synthetiseren met **DNA** als voorbeeld en matrijs.

Sex chromosomen Zie bij **geslachtschromosomen**.

“Sex body” Het **chromatine** compartiment in de mannelijke profase van de eerste **meiotische** deling, dat de **geslachtschromosomen** bevat (fig 15, 37).

“Single nucleotide polymorphism” (SNP) Een voor een enkele basepositie in het **DNA** bestaande keus tussen meestal twee basen waarvan de minst voorkomende gemiddeld nog altijd bij één op de 50 individuen van die populatie voor komt (zie ook bij **allelfrequentie**). SNPs komen veel voor.

SNP Zie **“Single nucleotide polymorphism”**.

Soma, somatisch Alles dat betrekking heeft op lichaamscellen, contrasterend met de cellen van de **kiembaan**.

Somatische celgenetica De tak van de genetica die zich bezig houdt met **mutatie** en eventueel **recombinatie** in lichaamscellen.

Spermatogenese Het cellulaire differentiatieproces dat leidt tot de productie van spermatozoa (zaadcellen), die in principe klaar zijn voor de bevruchting.

Spermiatie Het van de wand van de testisbuisjes los komen van de geëlongeerde spermatiden, die zich nu spermatozo of zaadcel mogen noemen.

Spermiogenese De metamorfose van de in de meiose geproduceerde ronde spermatiden tot geëlongeerde spermatiden (fig 31) eindigend met de **spermiatie**.

Spermiogram De getalsmatige weergave van de zaadkwaliteit op het gebied van aantal, morfologie en bewegelijkheid (zie tabel 5).

Spoelfiguur Het geheel van gecontraheerde **chromosomen** in evenwicht met de tubuline trekdraden, klaar voor de **mitose** (de celdeling, fig 3).

Synaptonemaal complex Het uit drie delen bestaande eiwitcomplex dat in de profase van de eerste **meiotische** deling als verbinder van de **homologe chromosomen** fungeert en zo **crossing over** faciliteert. In de elektronenmicroscopie is deze driedeling zichtbaar.

Telomerase Een enzym dat m.b.v. een korte **RNA** matrix als “**reverse transcriptase**” **chromosoom**einden kan verlengen. Hierdoor ontstaat een groot aantal herhalingen in tandem in het **DNA**, gebaseerd op de instructie van de korte RNA matrix.

Telomeren Het complex van korte **DNA** herhalingen en eiwitten die de einden van de **chromosomen** afhechten zodat die niet als DNA breuken worden herkend.

Teratocarcinoma Een uit een **kiemcel** voortkomende tumor waarin chaotisch **embryonale** structuren te herkennen zijn. Kan zowel in de vrouwelijke als in de mannelijke **kiembaan** ontstaan, in de mannelijke vroeg en in de vrouwelijke laat.

Totipotentie Het vermogen van in de regel een vroeg embryonale cel om zich te kunnen ontwikkelen tot iedere cel van de embryonale membranen (als componenten van de placenta) en ieder type lichaamscel.

Transcriptie Het synthetiseren van **RNA** op geleide van een **DNA** matrix (fig 9).

Transcriptiefactor Een eiwit dat bindt aan specifieke **DNA** motieven (meestal aan **promotor** van een gen) om **transcriptie** mogelijk te maken of te reguleren. Verschillende (transcriptie-) factoren werken in een complex samen.

Transcriptoom Het geheel aan **RNA** moleculen van een cel of weefsel.

Transgeen Individu met extra genetisch materiaal, met meestal de structuur van een gen. Dit **gen-DNA** kan van de eigen soort of van een andere soort afkomstig zijn.

Translatie Eiwitsynthese op basis van rijp **messenger RNA**, die gebruik maakt van de **genetische code**.

Transposon “**transposable elements**” Verzamelnaam voor korte stukjes **DNA** die al dan niet via een **RNA** tussenfase, op verschillende locaties in het **genoom** kunnen verschijnen. Zie ook **retrotransposons**.

Triplet Zie bij **genetische code**.

Triploidie De aanwezigheid van drie sets **chromosomen**.

Trisomie De aanwezigheid van drie kopieën van een **chromosoom** in een **diploïde** cel of organisme in plaats van normaal twee.

Univalent Ongepaard **chromosoom** tijdens de eerste **meiotische** deling.

Vrije zuurstofradicalen Reactieve vormen van zuurstof met een vrij elektron.

WES Zie “**Whole exome sequencing**”.

WGS Zie “**Whole genome sequencing**”.

“**Whole exome sequencing**” (**WES**) Geautomatiseerde basenvolgorde bepaling van het totaal aan rijp **messenger RNA** in een cel of weefsel.

“Whole genome sequencing” (WGS) Geautomatiseerde basenvolgorde bepaling van het hele **genoom** van een cel, weefsel of organisme.

Zona pellucida De gelatine achtige laag die in groeiende ovariële follikels rond de eicel wordt aangelegd en onderhouden. Gaat voorafgaand aan de innesteling van het pre implantaire embryo verloren (fig 39, 42).

Zygote Alle stadia tussen de fusie van de **gameten** en de eerste klievingdeling van het pre implantaire embryo.

Lijst van afkortingen

De afkortingen van genen staan altijd cursief, in hoofdletters bij mens en alleen met de eerste letter als hoofdletter bij muis. Het genproduct staat rechtop.

* staat ook in de verklarende begrippenlijst.

AMC	Amsterdam medisch centrum
APC	“anaphase promoting complex”
ARC	animal research council
ART	“artificial reproduction techniques/technology”
<i>Atm</i>	het gen “ataxia-telangiectasia mutated”
ATP	adenosine trifosfaat
<i>Atr</i>	het gen “ataxia-telangiectasia and rad3-related”
BER	“base excision repair”
BMI	“body mass index”
<i>Blimp-1</i>	het gen “B-lymphocyte-induced maturation protein-1”
bp	basenbaar
BPA	de chemische stof bisfenol A
<i>BRCA</i>	de genen “breast cancer 1,2, early onset”
CeRA	Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie Münster
CIN	chromosomale instabiliteit
CNV*	“copy number variation”
CRISPR	“clustered regularly interspaced short palindromic repeats”
DDR*	“DNA damage response”

DMR	“differentially methylated region”
DNA*	“deoxyribonucleic acid” deoxyribonucleinezuur
ESHRE	European society of human reproduction and embryology
FISH*	fluorescentie in situ hybridisatie
GWAS*	“genome wide association study”
Gy*	Grey
HCG	“human chorion gonadotropin”
HR*	homologe recombinatie
HRR	“homologous recombination repair”
ICM*	“inner cell mass”
ICR	“imprinting control region”
ICSI	intra cytoplasmatische sperma injectie
Indel*	samenvoeging van insertie en deletie
IMPC	international mouse phenotyping consortium
INRA	institut national de la recherche agronomique
iPS, iPSC	“induced” pluripotente stamcel
IUI	intra uterine inseminatie
IVF	in vitro fertilisatie
KI	kunstmatige inseminatie
LH	luteïniserend hormoon
LINE	“long intersperced element”
MMR*	“mismatch repair”
mRNA*	messenger RNA
MRC	medical research council
mt	mitochondriële
MtZ*	“maternal to zygote” overgang
ncRNA*	non coding RNA, * bij RNA
Ne*	effectieve populatie grootte
NER	“nucleotide excision repair”
NGS*	“next generation sequencing”
NHEJ	“non-homologous end joining”
NIH	national institutes of health
NIPT	niet-invasieve prenatale test

NKI	Nederlands kanker instituut
NVOG	Nederlandse vereniging voor obstetrie en gynaecologie
OAT	oligo astheno teratozoöpermie
OMIM	online mendelian inheritance in man
PAK	polycyclische aromatische koolwaterstoffen
PAR*	“pseudo autosomal region”
PESA	“percutaneous sperm aspiration” (uit de bijbal, de epididymis)
PGC*	“primordial germ cell”, zie bij primodiale kiemcel
PGD	pre implantatie genetische diagnostiek
PGT-A	pre implantatie genetische test-aneuploidie
PGT-M	pre implantatie genetisch test monogen
PGT-SR	pre implantatie genetische test “structural rearrangement”
PHA	phytohaemagglutinine
PMSG	“pregnant mare serum gonadotropin”
<i>Prdm9</i>	het gen “PR/SET domain containing protein 9”
PRS*	“polygenic risk score”
PTM*	post translationele modificatie
<i>Rad51</i>	het gen Radiation 51 (van gist nomenclatuur)
RNA*	“ribonucleic acid” ribonucleïnezuur
lncRNA*	“long non coding” RNA
mRNA*	messenger RNA
miRNA	micro RNA
ncRNA*	“non coding” RNA
piRNA	met het eiwit Piwi interacterend RNA
rRNA*	ribosomaal RNA
siRNA	“small interfering” RNA
sncRNA*	“small non coding” RNA
tRNA*	transfer RNA
tsRNA	van transfer RNA afkomstig klein (small) RNA
SAC	“spindle assembly checkpoint”
STR	“short tandem repeat”
SINE	“short intersperced element”
SNP*	“single nucleotide polymorphism”

SOS	“severe (strong) oxidative stress”
SOS	“Sertollicell only syndrome”
TAD	“topologically associated domain”
TDS	“testicular dysgenesis syndrome”
TESE	testiculaire sperma extractie
UMC	universitair medisch centrum
VNTR	“variable number of tandem repeats”
WES*	“whole exome sequencing”
WGS*	“whole genome sequencing”
WHO	world health organisation
WUR	Wageningen university and research

bp basenpaar

kb kilobase 1000

mb megabase 1000.000

μm 1/1000 mm

μl 1/1000 ml

Referenties

Referenties van een groter belang zijn gemerkt met het symbool *. Het teken # is eraan toegevoegd om aan te geven welke publicaties hebben bijgedragen aan welke figuur en het teken ^ voor de tabellen. Deze verwijzingen vallen op in de layout.

Inleiding

*B Alberts et al., *Essential Cell Biology*, 4th edition. Garland Science, 2014

*AJF Griffiths, SR Wessler, SB Carroll, RC Lewontin, *Introduction to genetic analysis*, 12th edition. WH Freeman and Co, 2020

CC Mann, *The wizard and the prophet*. Picador New York, 2019. ISBN 9781509884186

*CC Mann, *De tovenaer en de profeet*. Nieuw Amsterdam, 2018. ISBN 9789046823859

Hoofdstuk 1

B Henderson, MA Fares, ACR Martin, *Protein Moonlighting in Biology and Medicine*. Wiley-Blackwell, 2016

DHEW Huberts, IJ van der Klei, Moonlighting proteins: An intriguing mode of multitasking. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2010;1803(4):520-525. PMID: 20144902, DOI:10.1016/j.bbamcr.2010.01.022

C. Jefferey, An introduction to protein moonlighting. *Biochem Soc Trans.* 2014;42(6):1679-1683. PMID: 25399589, DOI: 10.1042/ BST20140226

Y Liu et al., Impact of Alternative Splicing on the Human Proteome. *Cell Rep.* 2017 Aug 1;20(5):1229-1241. PMID: 28768205, DOI: 10.1016/j.celrep.2017.07.025

*#2 R Milo, R Phillips, N Orme, *Cell biology by the numbers.* Garland Science, 2015. ISBN 9780815345374

S Plaza, G Menschaert, F Payre, In Search of Lost Small Peptides. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2017 Oct 6;33:391-416. PMID: 28759257, DOI: 10.1146/annurev-cellbio-100616-060516 [Review]

* B. Wieringa: “.....is 't grote niet weerd!?”, rede (in verkorte vorm) uitgesproken bij het afscheid als hoogleraar Celbiologie aan de Radboud Universiteit/het Radboudumc op vrijdag 1 juni 2018. © Prof. dr. B. Wieringa, Nijmegen, 2018

M Wu Orr, Y Mao, G Storz, S-B Qian, Alternative ORFs and small ORFs: shedding light on the dark proteome. *Nucleic Acids Res.* 2020 Feb 20;48(3):1029-1042. PMID: 31504789, DOI: 10.1093/nar/gkz734 [Review]

Hoofdstuk 2 tabel 2

C Ade, AM Roy-Engel, PL Deininger, Alu Elements: An Intrinsic Source of Human Genome Instability. *Curr Opin Virol.* 2013 Dec;3(6):639-645. PMID: 24080407, DOI: 10.1016/j.coviro.2013.09.002 [Review]

* B Alberts, D Bray, K Hopkins, A Johnson, J Lewis, M Raff, K Roberts, P Walter (Eds). *Essential Cell Biology*, 4th edition. Garland Science, 2014. ISBN 9780815344551

*^2 ME Aldrup-Macdonald, BA Sullivan, The past, present, and future of human centromere genomics. *Genes (Basel)* 2014 Jan 24;5(1):33-50. PMID: 24683489, DOI: 10.3390/genes5010033

N Altemose et al., Complete genomic and epigenetic maps of human centromeres. *Science* 2022 Apr;376(6588):eabl4178. PMID: 35357911, DOI: 10.1126/science.eabl4178

* SKr Anand, A Sharma, N Singh, P Kakkar, Entrenching Role of Cell Cycle Checkpoints and Autophagy for Maintenance of Genomic Integrity. *DNA Repair (Amst)* 2020 Feb;86:102748. PMID: 31790874, DOI: 10.1016/j.dnarep.2019.102748 [Review]

FH Andrews, BD Strahl, TG Kutateladze, Insights Into Newly Discovered Marks and Readers of Epigenetic Information. *Nat Chem Biol.* 2016 Aug 18;12(9):662-668. PMID: 27538025, DOI: 10.1038/nchembio.2149 [Review]

GA Armeev et al., Linking Chromatin Composition and Structural Dynamics at the Nucleosome Level. *Curr Opin Struct Biol.* 2019 Jun;56:46-55. PMID: 30529788, DOI: 10.1016/j.sbi.2018.11.006 [Review]

- TD Babatz, KH Burns, Functional Impact of the Human Mobilome. *Curr Opin Genet Dev.* 2013 Jun;23(3):264-270. PMID: 23523050, DOI: 10.1016/j.gde.2013.02.007 [Review]
- * G Bernardi, Chromosome Architecture and Genome Organization. *PLoS One* 2015 Nov 30;10(11):e0143739. PMID: 26619076, DOI: 10.1371/journal.pone.0143739. eCollection 2015
- PRJ Bois, Hypermutable Minisatellites, a Human Affair? *Genomics* 2003 Apr;81(4):349-355. PMID: 12676558, DOI: 10.1016/s0888-7543(03)00021-1 [Review]
- T Cremer et al., The 4D Nucleome: Evidence for a Dynamic Nuclear Landscape Based on Co-Aligned Active and Inactive Nuclear Compartments. *FEBS Lett.* 2015 Oct 7;589(20 Pt A):2931-2943. PMID: 26028501, DOI: 10.1016/j.febslet.2015.05.037
- * Z Dou et al., Recent Progress on the Localization of the Spindle Assembly Checkpoint Machinery to Kinetochores. *Cells* 2019 Mar 23;8(3):278. PMID: 30909555, DOI: 10.3390/cells8030278 [Review]
- M Escalera-Zamudio, AD Greenwood, On the classification and evolution of endogenous retrovirus: human endogenous retroviruses may not be 'human' after all. *APMIS.* 2016 Jan-Feb;124(1-2):44-51. PMID: 26818261, DOI: 10.1111/apm.12489 [Review]
- *#7 TM Escobar et al., Active and Repressed Chromatin Domains Exhibit Distinct Nucleosome Segregation during DNA Replication. *Cell* 2019 Oct 31;179(4):953-963.e11. PMID: 31675501, DOI: 10.1016/j.cell.2019.10.009
- *^2 M Friedli, D Trono, The developmental control of transposable elements and the evolution of higher species. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2015;31:429-451. PMID: 26393776, DOI: 10.1146/annurev-cellbio-100814-125514 [Review]
- *^2 JM Goldmann, *Characterization of de novo mutations in the human germline.* Proefschrift afdeling human genetica Radboud umc december 2018. <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=50582882>
- *^4 AJF Griffiths, J Doebley, C Peichel, DA Wassarman, *Achieve for Introduction to Genetic Analysis*, 12th edition. WH Freeman and Co, 2020. ISBN 9781319401375
- *^2 DC Hancks, HH Kazazian Jr., Roles for Retrotransposon Insertions in Human Disease. *Mob DNA* 2016 May 6;7:9. PMID: 27158268, DOI: 10.1186/s13100-016-0065-9. eCollection 2016 [Review]
- * https://nl.wikipedia.org/wiki/Centraal_dogma_van_de_moleculaire_biologie: F Crick 1958 en 1970
- *^2 <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=50582882>
- <https://www.mirbase.org/cgi-bin/browse.pl>
- <http://www.noncode.org/analysis.php>
- *#6 K-I Ishiguro, The cohesin complex in mammalian meiosis. *Genes Cells* 2019 Jan;24(1):6-30. PMID: 30479058, DOI: 10.1111/gtc.12652 [Review]

- * AJ Jeffreys, V Wilson, SL Thein, Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature* 1985 Mar 7-13;314(6006):67-73. PMID: 3856104, DOI: 10.1038/314067a0
- AJ Jeffreys et al., Complex gene conversion events in germline mutation at human minisatellites. *Nat Genet.* 1994 Feb;6(2):136-145. PMID: 8162067, DOI: 10.1038/ng0294-136
- * T Jenuwein, CD Allis, Translating the Histone Code. *Science* 2001 Aug 10;293(5532):1074-1080. PMID: 11498575, DOI: 10.1126/science.1063127 [Review]
- * WL Johnson, AF Straight, RNA-mediated Regulation of Heterochromatin. *Curr Opin Cell Biol.* 2017 Jun;46:102-109. PMID: 28614747, DOI: 10.1016/j.ceb.2017.05.004 [Review]
- M Kataria, H Yamano, Interplay Between Phosphatases and the Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome in Mitosis. *Cells* 2019 Aug 2;8(8):814. PMID: 31382469, DOI: 10.3390/cells8080814 [Review]
- H Kimura, Histone modifications for human epigenome analysis. *Journal of Human Genetics*, 06 Jun 2013, 58(7):439-445. PMID: 23739122, DOI: 10.1038/jhg.2013.66 [Review]
- C Maison et al., Higher-order Structure in Pericentric Heterochromatin Involves a Distinct Pattern of Histone Modification and an RNA Component. *Nat Genet.* 2002 Mar;30(3):329-334. PMID: 11850619, DOI: 10.1038/ng843
- SM McNulty, LL Sullivan, BA Sullivan, Human Centromeres Produce Chromosome-Specific and Array-Specific Alpha Satellite Transcripts That Are Complexed With CENP-A and CENP-C. *Dev Cell* 2017 Aug 7;42(3):226-240.e6. PMID: 28787590, DOI: 10.1016/j.devcel.2017.07.001
- * A Mendez-Bermudez, M-J Giraud-Panis, J Ye, E Gilson, Heterochromatin replication goes hand in hand with telomere protection. *Nat Struct Mol Biol.* 2020 Apr;27(4):313-318. PMID: 32231287, DOI: 10.1038/s41594-020-0400-1 [Review]
- *#6 M Moronta-Gines, TRH van Staveren, KS Wendt, One ring to bind them - Cohesin's interaction with chromatin fibers. *Essays Biochem.* 2019 Apr 23;63(1):167-176. PMID: 31015387, DOI: 10.1042/EBC20180064 [Review]
- AL Olins, DE Olins, Spheroid chromatin units (v bodies). *Science* 1974 Jan 25;183(4122):330-332. PMID: 4128918, DOI: 10.1126/science.183.4122.330
- * N Palmer, P Kaldis, Regulation of the Embryonic Cell Cycle During Mammalian reimplantation Development. *Current Topics in Developmental Biology* 2016;120:1-52. PMID 27475848, DOI: 10.1016/bs.ctdb.2016.05.001 [Review]
- * El Prieto, K Maeshima, Dynamic chromatin organization in the cell. *Essays in Biochemistry* 2019;63:133-145. PMID: 30967477, DOI: 10.1042/EBC20180054

- *² SR Richardson et al., Influence of LINE-1 and SINE Retrotransposons on Mammalian Genomes. *Microbiol Spectr.* 2015 Apr;3(2):MDNA3-0061-2014. PMID: 26104698, DOI: 10.1128/microbiolspec.MDNA3-0061-2014 [Review]
- T Sexton, G Cavalli, The Role of Chromosome Domains in Shaping the Functional Genome. *Cell* 2015 Mar 12;160(6):1049-1059. PMID: 25768903, DOI: 10.1016/j.cell.2015.02.040
- * JW Shay, WE Wright, Telomeres and Telomerase: Three Decades of Progress. *Nat Rev Genet.* 2019 May;20(5):299-309. PMID: 30760854, DOI: 10.1038/s41576-019-0099-1 [Review]
- S Sivakumar, GJ Gorbisky, Spatiotemporal regulation of the anaphase-promoting complex in mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015 Feb;16(2):82-94. PMID: 25604195, DOI: 10.1038/nrm3934 [Review]
- * Z Su1, JM Denu, Reading the Combinatorial Histone Language. *ACS Chem Biol.* 2016 Mar 18;11(3):564-574. PMID: 26675328, DOI: 10.1021/acscchembio.5b00864 [Review]
- * Q Szabo, F Bantignies, G Cavalli, Principles of genome folding into topologically associating domains. *Sci Adv.* 2019 Apr 10;5(4):eaaw1668. PMID: 30989119, DOI: 10.1126/sciadv.aaw1668 [Review]
- *#10 S Viollet, C Monot, G Cristofari, L1 retrotransposition, The snap-velcro model and its consequences. *Mob Genet Elements* 2014 Jan 1;4(1):e28907. PMID: 24818067, DOI: 10.4161/mge.28907
- P Weller, AJ Jeffreys, V Wilson, A Blanchetot, Organization of the Human Myoglobin Gene. *EMBO J.* 1984 Feb;3(2):439-446. PMID: 6571704, DOI: 10.1002/j.1460-2075.1984.tb01825.x
- * H Yamano, APC/C: current understanding and future perspectives. *F1000Res.* 2019 May 23;8:F1000 Faculty Rev-725. PMID: 31164978, DOI: 10.12688/f1000research.18582.1 [Review]

Box 1

- F Abascal et al., Loose ends: almost one in five human genes still have unresolved coding status. *Nucleic Acids Res.* 2018 Aug 21;46(14):7070-7084. PMID: 29982784, DOI: 10.1093/nar/gky587
- M Pertea et al., CHES: a new human gene catalog curated from thousands of large-scale RNA sequencing experiments reveals extensive transcriptional noise. *Genome Biol.* 2018 Nov 28;19(1):208. PMID: 30486838, DOI: 10.1186/s13059-018-1590-2
- DR Zerbino, A Frankish, P Flicek, Progress, Challenges, and Surprises in Annotating the Human Genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2020 Aug 31;21:55-79. PMID: 32421357, DOI: 10.1146/annurev-genom-121119-083418 [Review]

Hoofdstuk 3, tabel 3 en 4

- *³ S Aganezov et al., A complete reference genome improves analysis of human genetic variation. *Science* 2022 Apr;376(6588):eabl3533. PMID: 35357935, DOI: 10.1126/science.abl3533
- PA Audano et al., Characterizing the Major Structural Variant Alleles of the Human Genome. *Cell* 2019 Jan 24;176(3):663-675.e19. PMID: 30661756, DOI: 10.1016/j.cell.2018.12.019
- *⁴ R Bandyopadhyay et al., Parental origin and timing of de novo Robertsonian translocation formation. *Am J Hum Genet.* 2002 Dec;71(6):1456-1462. PMID: 12424707, DOI: 10.1086/344662 [Review]
- *¹¹ TH Bestor, JR Edwards, M Boulard, Notes on the role of dynamic DNA methylation in mammalian development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Jun 2;112(22):6796-6799. PMID: 25368180, DOI: 10.1073/pnas.1415301111 [Review]
- J Boué, A Boué, P Lazar, Retrospective and Prospective Epidemiological Studies of 1500 Karyotyped Spontaneous Human Abortions. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2013 Jul;97(7):471-486. PMID: 23873813, DOI: 10.1002/bdra.23174 [Classical Article]
- J Byrne et al., Morphology of early fetal deaths and their chromosomal characteristics. *Teratology* 1985 Oct;32(2):297-315. PMID: 4049288, DOI: 10.1002/tera.1420320218
- BP Coe et al., Neurodevelopmental disease genes implicated by de novo mutation and copy number variation morbidity. *Nat Genet.* 2019 Jan;51(1):106-116. PMID: 30559488, DOI: 10.1038/s41588-018-0288-4
- * L Coelewijn, D Curtis, Mini-review: Update on the genetics of schizophrenia. *Ann Hum Genet.* 2018 Sep;82(5):239-243. PMID: 29923609, DOI: 10.1111/ahg.12259 [Review]
- *³ RL Collins et al., A structural variation reference for medical and population genetics. *Nature* 2020 May;581(7809):444-451. PMID: 32461652, DOI: 10.1038/s41586-020-2287-8
- T Ghi et al., Prenatal diagnosis versus first-trimester screening of trisomy 21 among pregnant women aged 35 or more. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2015 Apr;28(6):674-678. PMID: 24866349, DOI: 10.3109/14767058.2014.928852
- *³ DC Hancks, HH Kazazian Jr., Roles for Retrotransposon Insertions in Human Disease. *Mob DNA* 2016 May 6;7:9. PMID: 27158268, DOI: 10.1186/s13100-016-0065-9. eCollection 2016 [Review]
- PS Harper, The discovery of the human chromosome number in Lund, 1955-1956. *Hum Genet.* 2006 Mar;119(1-2):226-232. PMID: 16463025, DOI: 10.1007/s00439-005-0121-x
- *⁴ T Hassold, P Hunt, To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet.* 2001 Apr;2(4):280-291. PMID: 11283700, DOI: 10.1038/35066065 [Review]

*^3 SS Ho, AE Urban, RE Mills, Structural variation in the sequencing era. *Nat Rev Genet* 2020 Mar;21(3):171-189. PMID: 31729472, DOI: 10.1038/s41576-019-0180-9 [Review]

*#12 <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/chromosome-identification>

<https://www.ed.ac.uk/mrc-human-genetics-unit/about/mrc-hgu-history/john-evans>. Maken van chromosoomportretten op populatie niveau >10.000 babies

L Hu et al., Clinical significance of germline copy number variation in susceptibility of human diseases. *J Genet Genomics* 2018 Jan 20;45(1):3-12. PMID: 29396143, DOI: 10.1016/j.jgg.2018.01.001 [Review]

ISCN 2020 An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. J McGowan-Jordon, RJ Hastings, S Moore (eds). *Cytogenet Genome Res* 2020; 160:341-503. Doi 10.1159/000510090 and DOI: 10.1159/isbn.978-3-318-06867-2. Erratum. *Cytogenet Genome Res* 2021;161:476-477. DOI: 10.1159/000520838

*^4 PA Jacobs et al., Estimates of the frequency of chromosome abnormalities detectable in unselected newborns using moderate levels of banding. *J Med Genet.* 1992 Feb;29(2):103-108. PMID: 1613759, DOI: 10.1136/jmg.29.2.103 [Comparative Study]

*^3 KJ Karczewski et al., The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature* 2020 May;581(7809):434-443. PMID: 32461654, DOI: 10.1038/s41586-020-2308-7

*^3 MD Kessler et al., De novo mutations across 1,465 diverse genomes reveal mutational insights and reductions in the Amish founder population. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020 Feb 4;117(5):2560-2569. PMID: 31964835, DOI: 10.1073/pnas.1902766117

*^3 M Lek et al., Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* 2016 Aug 18;536(7616):285-291. PMID: 27535533, DOI: 10.1038/nature19057

*^3 G Logsdon, MR Vollger, EE Eichler, Long-read human genome sequencing and its applications. *Nat Rev Genet.* 2020 Oct;21(10):597-614. PMID: 32504078, DOI: 10.1038/s41576-020-0236-x [Review]

CR Marshall et al., Contribution of copy number variants to schizophrenia from a genome-wide study of 41,321 subjects. *Nat Genet.* 2017 Jan;49(1):27-35. PMID: 27869829, DOI: 10.1038/ng.3725 [Comparative Study]

*^3 L Moore et al., The mutational landscape of human somatic and germline cells. *Nature* 2021 Sep;597(7876):381-386. PMID: 34433962, DOI: 10.1038/s41586-021-03822-7

SI Nagaoka, TJ Hassold, PA Hunt, Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem. *Nat Rev Genet.* 2012 Jun 18;13(7):493-504. PMID: 22705668, DOI: 10.1038/nrg3245 [Review]

*^4 J Nielsen, M Wohler, Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Arhus, Denmark. *Hum Genet.* 1991 May;87(1):81-83. PMID: 2037286, DOI: 10.1007/BF01213097

S Ratcliffe, Long-term Outcome in Children of Sex Chromosome Abnormalities. *Arch Dis Child* 1999 Feb;80(2):192-195. PMID: 10325742, DOI: 10.1136/adc.80.2.192

*^3 SR Richardson et al., The Influence of LINE-1 and SINE Retrotransposons on Mammalian Genomes. *Microbiol Spectr.* 2015 Apr;3(2):MDNA3-0061-2014. PMID: 261046982, DOI: 10.1128/microbiolspec.MDNA3-0061-2014 [Review]

J Sebat et al., Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science* 2007 Apr 20;316(5823):445-449. PMID: 17363630, DOI: 10.1126/science.1138659

*^3 D Taliun et al., Sequencing of 53,831 diverse genomes from the NHLBI TOPMed program. *bioRxiv* 563866. DOI: 10.1101/563866

*^4 NS Thomas et al., De novo apparently balanced translocations in man are predominantly paternal in origin and associated with a significant increase in paternal age. *J Med Genet* 2010 Feb;47(2):112-115. PMID: 19638350, DOI: 10.1136/jmg.2009.069716

C Vinson, R Chatterjee, CG methylation. *Epigenomics.* 2012 Dec;4(6):655-63. PMID: 23244310, DOI: 10.2217/epi.12.55 [Review]

*^4 D Warburton, De novo balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints. *Am J Hum Genet.* 1991 Nov;49(5):995-1013. PMID: 1928105, PMCID: PMC1683246

F Zhang, W Gu, ME Hurler, JR Lupski, Copy number variation in human health, disease, and evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2009;10:451-481. PMID: 19715442, DOI: 10.1146/annurev.genom.9.081307.164217 [Review]

Hoofdstuk 4

S Aganezov et al., A complete reference genome improves analysis of human genetic variation. *Science* 2022 Apr;376(6588):eabl3533. PMID: 35357935, DOI: 10.1126/science.abl3533

* I Bartha, J di Iulio, J Craig Venter, A Telenti, Human Gene Essentiality, *Nat Rev Genet.* 2018 Jan;19(1):51-62. PMID: 29082913, DOI: 10.1038/nrg.2017.75 [Review]

* P Cacheiro, MA Haendel, D Smedley, International Mouse Phenotyping Consortium and the Monarch Initiative, New Models for Human Disease From the International Mouse Phenotyping Consortium. *Mamm Genome* 2019 Jun;30(5-6):143-150. PMID: 31127358, DOI: 10.1007/s00335-019-09804-5 [Review]

M Eriksson et al., Recurrent De Novo Point Mutations in Lamin A Cause Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. *Nature* 2003 May 15;423(6937):293-8. PMID: 12714972, DOI: 10.1038/nature01629

Z Gao et al., An estimate of the average number of recessive lethal mutations carried by humans. *Genetics* 2015 Apr;199(4):1243-1254. PMID: 25697177, DOI: 10.1534/genetics.114.173351

S Gonzalo, R Kreienkamp, P Askjaer, Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome: A premature aging disease caused by LMNA gene mutations. *Ageing Res Rev.* 2017 Jan;33:18-2. PMID: 27374873, DOI: 10.1016/j.arr.2016.06.007 [Review]

https://en.wikipedia.org/wiki/Birth_rate#/media/File:Countries_by_Birth_Rate_in_2017.svg

https://en.wikipedia.org/wiki/Human_Genome_Project

<https://gnomad.broadinstitute.org/> The Genome Aggregation Database (gnomAD) is a resource developed by an international coalition of investigators, with the goal of aggregating and harmonizing both exome and genome sequencing data from a wide variety of large-scale sequencing projects, and making summary data available for the wider scientific community.

<https://www.jax.org/search?q=Knockout+Mouse+Project+%28KOMP%29>

Knockout mouse project: <https://www.komp.org> Knockout Mouse Project (KOMP)

Scientists around the world are working to generate a targeted knockout mutation for every gene in the mouse genome through the Knockout Mouse Project (KOMP) which is providing critical tools for understanding gene function and the genetic causes of human diseases

<https://www.mousephenotype.org/> International mouse phenotype consortium

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>, #176670 - Hutchinson-Gilford progeria syndrome; HGPS Progeria syndrome, childhood-onset, included. Cytogenetic locations: 1q22. OMIM

<http://www.progeria.nu/index3.html>

<https://www.proteinatlas.org/humanproteome/tissue/>

KJ Karczewski et al., The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature* 2020 May;581(7809):434-443. PMID: 32461654, DOI: 10.1038/s41586-020-2308-7

LW Koblan et al., In vivo base editing rescues Hutchinson-Gilford progeria syndrome in mice. *Nature* 2021 Jan;589(7843):608-614. PMID: 33408413, DOI: 10.1038/s41586-020-03086-7

DG MacArthur et al., A systematic survey of loss-of-function variants in human protein-coding genes. *Science* 2012 Feb 17;335(6070):823-828. PMID: 22344438, DOI: 10.1126/science.1215040

* OMIM: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>

S Nurk et al., The complete sequence of a human genome. *Science* 2022 Apr;376(6588):44-53. PMID: 35357919, DOI: 10.1126/science.abj6987

EGM Reynolds et al., Non-additive association analysis using proxy phenotypes identifies novel cattle syndromes. *Nat Genet.* 2021 Jul;53(7):949-954. PMID: 34045765, DOI: 10.1038/s41588-021-00872-5

* J Rozman et al., Identification of Genetic Elements in Metabolism by High-Throughput Mouse Phenotyping. *Nat Commun.* 2018 Jan 18;9(1):288. PMID: 29348434, DOI: 10.1038/s41467-017-01995-2

A De Sandre-Giovannoli et al., Lamin a Truncation in Hutchinson-Gilford Progeria. *Science* 2003 Jun 27;300(5628):2055. PMID: 12702809, DOI: 10.1126/science.1084125

D Smeets, *Aantal genetische diagnoses 1978-2018*. Lezing afscheid prof Ad Geurts van Kessel. Nijmegen, 2019

D Taliun et al., Sequencing of 53,831 diverse genomes from the NHLBI TOPMed program. *bioRxiv* 563866. DOI: 10.1101/563866

DR Zerbino, A Frankish, P Flicek, Progress, Challenges, and Surprises in Annotating the Human Genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2020 Aug 31;21:55-79. PMID: 32421357, DOI: 10.1146/annurev-genom-121119-083418 [Review]

Hoofdstuk 5

*#14,15 B Arbeithuber, AJ Betancourt, T Ebner, I Tiemann-Boeg, Crossovers are associated with mutation and biased gene conversion at recombination hotspots. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Feb 17;112(7):2109-2114. PMID: 25646453, DOI: 10.1073/pnas.1416622112

SM Baker et al., Male Mice Defective in the DNA Mismatch Repair Gene PMS2 Exhibit Abnormal Chromosome Synapsis in Meiosis. *Cell* 1995 Jul 28;82(2):309-319. PMID: 7628019, DOI: 10.1016/0092-8674(95)90318-6

SM Baker et al., Involvement of Mouse Mlh1 in DNA Mismatch Repair and Meiotic Crossing Over. *Nat Genet.* 1996 Jul;13(3):336-342. PMID: 8673133, DOI: 10.1038/ng0796-336

AN Blackburn et al., Genotype phasing in pedigrees using whole-genome sequence data. *Eur J Hum Genet.* 2020 Jun;28(6):790-803. PMID: 31996801, DOI: 10.1038/s41431-020-0574-3

*#14,15 J Brooks Crickard, EC Greene, Biochemical attributes of mitotic and meiotic presynaptic complexes. *DNA Repair (Amst)* 2018 Nov;71:148-157. PMID: 30195641, DOI: 10.1016/j.dnarep.2018.08.018 [Review]

CL Campbell et al., Escape from crossover interference increases with maternal age. *Nat Commun.* 2015 Feb 19;6:6260. PMID: 25695863, DOI: 10.1038/ncomms7260

- S Claerhout et al., CSYseq: The first Y-chromosome sequencing tool typing a large number of Y-SNPs and Y-STRs to unravel worldwide human population genetics. *PLoS Genet.* 2021 Sep 7;17(9):e1009758. PMID: 34491993, DOI: 10.1371/journal.pgen.1009758
- F Cole, S Keeney, M Jasin, Preaching about the converted: how meiotic gene conversion influences genomic diversity. *Ann N Y Acad Sci.* 2012 Sep;1267:95-102. PMID: 22954222, DOI: 10.1111/j.1749-6632.2012.06595.x [Review]
- W Edlmann et al., Mammalian MutS homologue 5 is required for chromosome pairing in meiosis. *Nat Genet.* 1999 Jan;21(1):123-127. PMID: 9916805, DOI: 10.1038/5075
- * Y Erlich, T Shor, I Pe'er, S Carmi, Identity Inference of Genomic Data Using Long-Range Familial Searches. *Science* 2018 Nov 9;362(6415):690-694. PMID: 30309907, DOI: 10.1126/science.aau4832
- S Gilad et al., Ataxia-telangiectasia: founder effect among north African Jews. *Hum Mol Genet.* 1996 Dec;5(12):2033-2037. PMID: 8968760, DOI: 10.1093/hmg/5.12.2033
- RE Green et al., A Draft Sequence of the Neandertal Genome. *Science* 2010 May 7;328(5979):710-722. PMID: 20448178, DOI: 10.1126/science.1188021
- * P Gunz et al., Neandertal Introgression Sheds Light on Modern Human Endocranial Globularity. *Curr Biol.* 2019 Jan 7;29(1):120-127.e5. PMID: 30554901, DOI: 10.1016/j.cub.2018.10.065
- BV Halldorsson et al., Characterizing mutagenic effects of recombination through a sequence-level genetic map. *Science* 2019 Jan 25;363(6425):eaau1043. PMID: 30679340, DOI: 10.1126/science.aau1043
- K Hayashi, K Yoshida, Y Matsui, A Histone H3 Methyltransferase Controls Epigenetic Events Required for Meiotic Prophase. *Nature* 2005 Nov 17;438(7066):374-378. PMID: 16292313, DOI: 10.1038/nature04112
- WG Hill, BS Weir, Variation in actual relationship as a consequence of Mendelian sampling and linkage. *Genet Res (Camb)* 2011 Feb;93(1):47-64. PMID: 21226974, DOI: 10.1017/S0016672310000480
<https://alloyfus.nih.gov/>
- K-I Ishiguro et al., Meiosis-specific cohesin mediates homolog recognition in mouse spermatocytes. *Genes Dev.* 2014 Mar 15;28(6):594-607. PMID: 24589552, DOI: 10.1101/gad.237313.113
- K-I Ishiguro, The cohesin complex in mammalian meiosis. *Genes Cells* 2019 Jan;24(1):6-30. PMID: 30479058, DOI: 10.1111/gtc.12652 [Review]
- AJ Jeffreys, CA May, Intense and highly localized gene conversion activity in human meiotic crossover hot spots. *Nat Genet.* 2004 Feb;36(2):151-156. PMID: 14704667, DOI: 10.1038/ng1287

- KS Keegan et al., The Atr and Atm Protein Kinases Associate With Different Sites Along Meiotically Pairing Chromosomes. *Genes Dev.* 1996 Oct 1;10(19):2423-2437. PMID: 8843195, DOI: 10.1101/gad.10.19.2423
- K Korunes, MAF Noor, Gene conversion and linkage: effects on genome evolution and speciation. *Mol Ecol.* 2017 Jan;26(1):351-364. PMID: 27337640, DOI: 10.1111/mec.13736
- * J Krause, T Trappe, *De reis van onze genen, onze geschiedenis en die van onze voorouders.* Nieuw Amsterdam, 2020. ISBN 9789046826813
- * J Lange et al., The landscape of mouse meiotic double-strand break formation, processing and repair. *Cell* 2016 October 20; 167(3): 695-708.e16. PMID: 27745971, DOI:10.1016/j.cell.2016.09.035
- EYi Liu, High-resolution sex-specific linkage maps of the mouse reveal polarized distribution of crossovers in male germline. *Genetics* 2014 May;197(1):91-106. PMID: 24578350, DOI: 10.1534/genetics.114.161653
- *#16 S Lu et al., Probing meiotic recombination and aneuploidy of single sperm cells by whole-genome sequencing. *Science* 2012 Dec 21;338(6114):1627-1630. PMID: 23258895, DOI: 10.1126/science.1229112
- MF Lyon, S Rastan, SDM Brown, Genetic variants and strains of the laboratory mouse, third edition, vol 2. Oxford University Press, 1996. ISBN 0198548699
- CM Manhart, E Alani, Roles for mismatch repair family proteins in promoting meiotic crossing over. *DNA Repair (Amst)* 2016 Feb;38:84-93. PMID: 26686657, DOI: 10.1016/j.dnarep.2015.11.024 [Review]
- AJ McNairn, VD Rinaldi, JC Schimenti, Repair of Meiotic DNA Breaks and Homolog Pairing in Mouse Meiosis Requires a Minichromosome Maintenance (MCM) Paralog. *Genetics* 2017 Feb;205(2):529-537. PMID: 27986806, DOI: 10.1534/genetics.116.196808
- * VM Narasimhan et al., Health and Population Effects of Rare Gene Knockouts in Adult Humans With Related Parents. *Science* 2016 Apr 22;352(6284):474-477. PMID: 26940866, DOI: 10.1126/science.aac8624
- * D Reich, *Who we are and how we got there.* Oxford University Press, 2019. ISBN 9780198821267
- EP Rogakou, C Boon, C Redon, WM Bonner, Megabase Chromatin Domains Involved in DNA Double-Strand Breaks in Vivo. *J Cell Biol.* 1999 Sep 6;146(5):905-916. PMID: 10477747, DOI: 10.1083/jcb.146.5.905
- AR Rogers, NS Harris, AA Achenbach, Neanderthal-Denisovan ancestors interbred with a distantly related hominin. *Sci Adv.* 2020 Feb 21;6(8):eaay5483. PMID: 32128408, DOI: 10.1126/sciadv.aay5483

- C Rothblum-Oviatt et al., Ataxia telangiectasia: a review. *Orphanet J Rare Dis.* 2016 Nov 25;11(1):159. PMID: 27884168, DOI: 10.1186/s13023-016-0543-7 [Review]
- R Rowsey et al., Examining variation in recombination levels in the human female: a test of the production-line hypothesis. *Am J Hum Genet.* 2014 Jul 3;95(1):108-112. PMID: 24995869, DOI: 10.1016/j.ajhg.2014.06.008
- S Rubinacci, D M Ribeiro, RJ Hofmeister, O Delaneau, Efficient phasing and imputation of low-coverage sequencing data using large reference panels. *Nat Genet.* 2021 Jan;53(1):120-126. PMID: 33414550, DOI: 10.1038/s41588-020-00756-0
- *#14,15 A Sanchez, G Reginato, P Cejka, Crossover or non-crossover outcomes: tailored processing of homologous recombination intermediates. *Curr Opin Genet Dev.* 2021 Jul 19;71:39-47. PMID: 34293660, DOI: 10.1016/j.gde.2021.06.012 [Review]
- F Sa'ñchez-Quinto, C Lalueza-Fox, Almost 20 years of Neanderthal palaeogenetics: adaptation, admixture, diversity, demography and extinction. *Phil. Trans. R. Soc. B* 2015 Jan 19;370(1660):20130374. PMID: 25487326, DOI: 10.1098/rstb.2013.0374 [Review]
- S Sankararaman et al., The date of interbreeding between Neandertals and modern humans. *PLoS Genet.* 2012;8(10):e1002947. PMID: 23055938, DOI: 10.1371/journal.pgen.1002947
- S Sankararaman et al., The genomic landscape of Neanderthal ancestry in present-day humans. *Nature* 2014 Mar 20;507(7492):354-357. PMID: 24476815, DOI: 10.1038/nature12961
- H Scherthan et al., Centromere and Telomere Movements During Early Meiotic Prophase of Mouse and Man Are Associated With the Onset of Chromosome Pairing. *J Cell Biol.* 1996 Sep;134(5):1109-1125. PMID: 8794855, DOI: 10.1083/jcb.134.5.1109
- K Sonehara, Y Okada, Obelisc: an identical-by-descent mapping tool based on SNP streak. *Bioinformatics* 2021 Apr 5;36(24):5567-5570. PMID: 33135050, DOI: 10.1093/bioinformatics/btaa940
- *#15 F Sun et al., The relationship between meiotic recombination in human spermatocytes and aneuploidy in sperm. *Hum Reprod.* 2008 Aug;23(8):1691-7. PMID: 18482994, DOI: 10.1093/humrep/den027
- FAT de Vries et al., Mouse Sycp1 Functions in Synaptonemal Complex Assembly, Meiotic Recombination, and XY Body Formation. *Genes Dev.* 2005 Jun 1;19(11):1376-1389. PMID: 15937223, DOI: 10.1101/gad.329705
- SS de Vries et al., Mouse MutS-like Protein Msh5 Is Required for Proper Chromosome Synapsis in Male and Female Meiosis. *Genes Dev.* 1999 Mar 1;13(5):523-531. PMID: 10072381, DOI: 10.1101/gad.13.5.523

* B Walsh, M Lynch, *Evolution and Selection of Quantitative Traits*. Oxford University Press, 2018: table 4.2, p. 106. ISBN 9780198830870

Y Xu et al., Targeted disruption of ATM leads to growth retardation, chromosomal fragmentation during meiosis, immune defects, and thymic lymphoma. *Genes Dev.* 1996 Oct 1;10(19):2411-2422. PMID: 8843194, DOI: 10.1101/gad.10.19.2411

Hoofdstuk 6

AC Bouwman et al., Meta-analysis of genome-wide association studies for cattle stature identifies common genes that regulate body size in mammals. *Nat Genet.* 2018 Mar;50(3):362-367. PMID: 29459679, DOI: 10.1038/s41588-018-0056-5 [Meta-Analysis]

M Claussnitzer et al., A brief history of human disease genetics. *Nature* 2020 Jan;577(7789):179-189. PMID: 31915397, DOI: 10.1038/s41586-019-1879-7

* L Geddes, News in focus: Height's missing heritability found. *Nature* 2019;568:444-445. DOI: 10.1038/d41586-019-01157-y

* <https://allofus.nih.gov/>

<https://sourcebooks.fordham.edu/source/pop-in-eur.asp>

* <https://www.ukbiobank.ac.uk/>

* <https://www.uscdcb.com>

*#18 Council on Dairy Cattel breeding: <https://queries.uscdcb.com/eval/summary/trend.cfm>

* <https://www.nhlbiwgs.org/>. The Trans-Omics for Precision Medicine (TOPMed) program, sponsored by the National Institutes of Health (NIH) National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI), is part of a broader Precision Medicine Initiative, which aims to provide disease treatments tailored to an individual's unique genes and environment. TOPMed contributes to this Initiative through the integration of whole-genome sequencing (WGS) and other omics (e.g., metabolic profiles, epigenomics, protein and RNA expression patterns) data with molecular, behavioral, imaging, environmental, and clinical data.

https://en.wikipedia.org/wiki/Medieval_demography

* PM Visscher, NR Wray, CS Haley, "Arte Et Labore"-A Blackburn Rovers Fan's Legacy in Human Complex Trait Genetics. *J Anim Breed Genet.* 2019 Jul;136(4):273-278. PMID: 31247684, DOI: 10.1111/jbg.12384 [Review]

* VPRO Tegenlicht, 30 augustus 2020, "Mijn DNA"

* B Walsh, Michael Lynch, *Evolution and Selection of Quantitative Traits*. Oxford University Press, 2018. ISBN: 9780198830870

NR Wray et al., Common Disease Is More Complex Than Implied by the Core Gene Omnigenic Model. *Cell* 2018 Jun 14;173(7):1573-1580. PMID: 29906445, DOI: 10.1016/j.cell.2018.05.051 [Review]

* NR Wray et al., Complex Trait Prediction From Genome Data: Contrasting EBV in Livestock to PRS in Humans: Genomic Prediction. *Genetics* 2019 Apr;211(4):1131-1141. PMID: 30967442, DOI: 10.1534/genetics.119.301859

Hoofdstuk 7

* T Boroviak, J Nichols, Primate Embryogenesis Predicts the Hallmarks of Human naïve Pluripotency. *Development* 2017 Jan 15;144(2):175-186. PMID: 28096211, DOI: 10.1242/dev.145177 [Review]

* <https://en.wikipedia.org/wiki/Chimera>

<https://www.nuffieldfoundation.org>

<https://www.nuffieldbioethics.org/publications/time-limits-on-maintaining-human-embryos-in-research> (2017)

*#43 N Irie, A Sybirna, MA Surani, What Can Stem Cell Models Tell Us About Human Germ Cell Biology? *Curr Top Dev Biol*. 2018;129:25-65. PMID: 29801530, DOI: 10.1016/bs.ctdb.2018.02.010 [Review]

T Kobayashi et al., Principles of early human development and germ cell program from conserved model systems. *Nature* 2017 Jun 15;546(7658):416-420. PMID: 28607482, DOI: 10.1038/nature22812

*#43 T Kobayashi, MA Surani, On the origin of the human germline. *Development* 2018 Jul 23;145(16):dev150433. PMID: 30037844, DOI: 10.1242/dev.150433 [Review]

K Madan, Natural human chimeras: A review. *Eur J Med Genet*. 2020 Sep;63(9):103971. PMID: 32565253, DOI: 10.1016/j.ejmg.2020.103971 [Review]

J-A Mäkelä, JJ Koskenniemi, HE Virtanen, J Toppari, Testis Development. *Endocr Rev*. 2019 Aug 1;40(4):857-905. PMID: 30590466, DOI: 10.1210/er.2018-00140 [Review]

* A McLaren, Primordial germ cells in the mouse. *Dev Biol*. 2003 Oct 1;262(1):1-15. PMID: 14512014, DOI: 10.1016/s0012-1606(03)00214-8 [Review]

* Y Ohinata et al., Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. *Nature*. 2005 Jul 14;436(7048):207-13. PMID: 15937476, DOI: 10.1038/nature03813

MN Shahbazi et al., Self-organization of the human embryo in the absence of maternal tissues. *Nat Cell Biol.* 2016 Jun;18(6):700-708. PMID: 27144686, DOI: 10.1038/ncb3347

*#43 A Sybirna, FCK Wong, MA Surani, Genetic Basis for Primordial Germ Cells Specification in Mouse and Human: Conserved and Divergent Roles of PRDM and SOX Transcription Factors. *Curr Top Dev Biol.* 2019;135:35-89. PMID: 31155363, DOI: 10.1016/bs.ctdb.2019.04.004

Box 2

* R Abu-Dawud et al., Pluripotent Stem Cells: Induction and Self-Renewal. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2018 Jul 5;373(1750):20170213. PMID: 29786549, DOI: 10.1098/rstb.2017.0213 [Review]

* B Roelen, W Hoekstra, A van de Graaf (red.), *Cahier stamcellen.* Den Haag: Biowetenschap en Maatschappij, 2016

H Bolton et al., Mouse model of chromosome mosaicism reveals lineage-specific depletion of aneuploid cells and normal developmental potential. *Nat Commun.* 2016 Mar 29;7:11165. PMID: 27021558, DOI: 10.1038/ncomms11165

MJ Evans, MH Kaufman, Establishment in Culture of Pluripotential Cells From Mouse Embryos. *Nature* 1981 Jul 9;292(5819):154-156. PMID: 7242681, DOI: 10.1038/292154a0

M De Felici, S Dolci, From Testis to Teratomas: A Brief History of Male Germ Cells in Mammals. *Int J Dev Biol.* 2013;57(2-4):115-121. PMID: 23784821, DOI: 10.1387/ijdb.130069md [Review]

CE Ford, EP Evans, RL Gardner, Marker chromosome analysis of two mouse chimaeras. *J Embryol Exp Morphol.* 1975 Apr;33(2):447-457. PMID: 1236926

RL Gardner, Contributions of blastocyst micromanipulation to the study of mammalian development. *Bioessays* 1998 Feb;20(2):168-180. PMID: 9631662, DOI: 10.1002/(SICI)1521-1878(199802)20:2<168::AID-BIES9>3.0.CO;2-P

* HG Leitch, A Smith, The Mammalian Germline as a Pluripotency Cycle. *Development* 2013 Jun;140(12):2495-2501. PMID: 23715543, DOI: 10.1242/dev.091603

* J-A Mäkelä, JJ Koskenniemi, HE Virtanen, J Toppari, Testis Development. *Endocr Rev.* 2019 Aug 1;40(4):857-905. PMID: 30590466, DOI: 10.1210/er.2018-00140 [Review]

GR Martin, Isolation of a Pluripotent Cell Line From Early Mouse Embryos Cultured in Medium Conditioned by Teratocarcinoma Stem Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981 Dec;78(12):7634-7638. PMID: 6950406, DOI: 10.1073/pnas.78.12.7634

NE Skakkebaek, Possible carcinoma-in-situ of the testis. *Lancet* 1972 Sep 9;2(7776):516-517. PMID: 4115573, DOI: 10.1016/s0140-6736(72)91909-5

LC Stevens, CC Little, Spontaneous Testicular Teratomas in an Inbred Strain of Mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 1954 Nov;40(11):1080-1087. PMID: 16578442, DOI: 10.1073/pnas.40.11.1080

Box 3

AV Anzalone, LW Koblan, DR Liu, Genome editing with CRISPR-Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. Nat Biotechnol. 2020 Jul;38(7):824-844. PMID: 32572269, DOI: 10.1038/s41587-020-0561-9 [Review]

* B Davies, The technical risks of human gene editing. Hum Reprod. 2019 Nov 1;34(11):2104-2111. PMID: 31696232, DOI: 10.1093/humrep/dez162

*#21 JA Doudna, E Charpentier, Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. Science 2014 Nov 28;346(6213):1258096. PMID: 25430774, DOI: 10.1126/science.1258096 [Review]

* J Doudna, S Sternberg, *A crack in creation, the new power to control evolution*. London: Vintage, 2018. ISBN 9781784702762

* JA Doudna, The promise and challenge of therapeutic genome editing. Nature 2020 Feb;578(7794):229-236. PMID: 32051598, DOI: 10.1038/s41586-020-1978-5 [Review]

D Egli et al., Inter-homologue repair in fertilized human eggs? Nature 2018;560:E5-E7. Arising from H. Ma et al. Nature 2017;548 :413-419. DOI: 10.1038/nature23305

H Gu et al., Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. Science 1994 Jul 1;265(5168):103-106. PMID: 8016642, DOI: 10.1126/science.8016642

IJ Huijbers, Generating Genetically Modified Mice: A Decision Guide. Methods Mol Biol. 2017;1642:1-19. PMID: 28815490, DOI: 10.1007/978-1-4939-7169-5_1 [Review]

* <https://www.nap.edu/catalog/25665/heritable-human-genome-editing>, over de veiligheid van overerfbare humane genoom editing

*#20 https://en.wikipedia.org/wiki/Cre-Lox_recombination

* H Ledford, CRISPR gene editing in human embryos wreaks chromosomal mayhem. Three studies showing large DNA deletions and reshuffling heighten safety concerns about heritable genome editing. Nature 2020;583:17-18. DOI: 10.1038/d41586-020-01906-4 [News]

* S Mastenbroek, S Repping, Crispr-baby's komen eraan. NRC 4 december 2018

RD Palmiter, RL Brinster, Transgenic mice. Cell 1985 Jun;41(2):343-345. PMID: 2985274, DOI: 10.1016/s0092-8674(85)80004-0 [Review]

- K Prella, N Zink, E Wolf, Pluripotent stem cells--model of embryonic development, tool for gene targeting, and basis of cell therapy. *Anat Histol Embryol.* 2002 Jun;31(3):169-186. PMID: 12479360, DOI: 10.1046/j.1439-0264.2002.00388.x [Review]
- AJ Song, RD Palmiter, Detecting and Avoiding Problems When Using the Cre-lox System. *Trends Genet.* 2018 May;34(5):333-340. PMID: 29336844, DOI: 10.1016/j.tig.2017.12.008 [Review]
- KR Thomas, C Deng, MR Capecchi, High-fidelity gene targeting in embryonic stem cells by using sequence replacement vectors. *Mol Cell Biol.* 1992 Jul;12(7):2919-2923. PMID: 1620105, DOI: 10.1128/mcb.12.7.2919
- H Yang, H Wang, R Jaenisch, Generating genetically modified mice using CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Nat Protoc.* 2014 Aug;9(8):1956-1968. PMID: 25058643, DOI: 10.1038/nprot.2014.134

Hoofdstuk 8

- A Berglund et al., Incidence, Prevalence, Diagnostic Delay, and Clinical Presentation of Female 46,XY Disorders of Sex Development. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016 Dec;101(12):4532-4540. PMID: 27603905, DOI: 10.1210/jc.2016-2248
- * PS Burgoyne et al., Cell-autonomous Action of the Testis-Determining Gene: Sertoli Cells Are Exclusively XY in XX---XY Chimaeric Mouse Testes. *Development* 1988 Feb;102(2):443-450. PMID: 3166423, DOI: 10.1242/dev.102.2.443
- * B Capel, Women in reproductive science: To Be or Not to Be a Testis. *Reproduction* 2019 Dec;158(6):F101-F111. PMID: 31265995, DOI: 10.1530/REP-19-0151
- EM Eicher, LL Washburn, JB Whitney 3rd, KE Morrow, Mus poschiavinus Y chromosome in the C57BL/6J murine genome causes sex reversal. *Science* 1982 Aug 6;217(4559):535-537. PMID: 7089579, DOI: 10.1126/science.7089579
- T Endo et al., Retinoic Acid and Germ Cell Development in the Ovary and Testis. *Biomolecules* 2019 Nov 24;9(12):775. PMID: 31771306, DOI: 10.3390/biom9120775 [Review]
- EP Evans, CE Ford, MF Lyon, Direct evidence of the capacity of the XY germ cell in the mouse to become an oocyte. *Nature* 1977 Jun 2;267(5610):430-431. PMID: 559943, DOI: 10.1038/267430a0
- M De Felici, FG Klinger, Programmed cell death in mouse primordial germ cells. *Int J Dev Biol.* 2015;59(1-3):41-49. PMID: 26374524, DOI: 10.1387/ijdb.150064md [Review]
- JK Findlay, KJ Hutt, M Hickey, RA Anderson, How Is the Number of Primordial Follicles in the Ovarian Reserve Established? *Biol Reprod.* 2015 Nov;93(5):111. PMID: 26423124, DOI: 10.1095/biolreprod.115.133652

- N Frydman et al., Human foetal ovary shares meiotic preventing factors with the developing testis. *Hum Reprod.* 2017 Mar 1;32(3):631-642. PMID: 28073973, DOI: 10.1093/humrep/dew343
- N Gonen, R Lovell-Badge, The regulation of Sox9 expression in the gonad. *Curr Top Dev Biol.* 2019;134:223-252. PMID: 30999977, DOI: 10.1016/bs.ctdb.2019.01.004 [Review]
<https://en.wikipedia.org/wiki/Chimera>
- N Irie, A Sybirna, MA Surani, What Can Stem Cell Models Tell Us About Human Germ Cell Biology? *Curr Top Dev Biol.* 2018;129:25-65. PMID: 29801530, DOI: 10.1016/bs.ctdb.2018.02.010 [Review]
- PA Jost, Le controle hormonale de la différenciation du sexe. *Biol Rev.* 1948;23:201-236. DOI: 10.1111/j.1469-185X.1948.tb00462.x
- K Kashimada, P Koopman, Sry: the master switch in mammalian sex determination. *Development* 2010 Dec;137(23):3921-3930. PMID: 21062860, DOI: 10.1242/dev.048983 [Review]
- * P Koopman et al., Male Development of Chromosomally Female Mice Transgenic for Sry. *Nature* 1991 May 9;351(6322):117-121. PMID: 2030730, DOI: 10.1038/351117a0
- * J-A Mäkelä, JJ Koskenniemi, HE Virtanen, J Toppari, Testis Development. *Endocr Rev.* 2019 Aug 1;40(4):857-905. PMID: 30590466, DOI: 10.1210/er.2018-00140 [Review]
- *#2 S Nef, I Stévant, A Greenfield, Characterizing the bipotential mammalian gonad. *Curr Top Dev Biol.* 2019;134:167-194. PMID: 30999975, DOI: 10.1016/bs.ctdb.2019.01.002 [Review]
- * I Stévant, MD Papaioannou, S Nef, A brief history of sex determination. *Mol Cell Endocrinol.* 2018 Jun 15;468:3-10. PMID: 29635012, DOI: 10.1016/j.mce.2018.04.004 [Review]
- N Vernet et al., The expression of Y-linked Zfy2 in XY mouse oocytes leads to frequent meiosis 2 defects, a high incidence of subsequent early cleavage stage arrest and infertility. *Development* 2014 Feb;141(4):855-866. PMID: 24496622, DOI: 10.1242/dev.091165
- M Villemure et al., The presence of X- and Y-chromosomes in oocytes leads to impairment in the progression of the second meiotic division. *Dev Biol.* 2007 Jan 1;301(1):1-13. PMID: 17123505, DOI: 10.1016/j.ydbio.2006.10.034
- W Yamazaki et al., Effects of the Sex Chromosome Complement, XX, XO, or XY, on the Transcriptome and Development of Mouse Oocytes During Follicular Growth. *Front Genet.* 2021 Dec 20;12:792604. PMID: 34987552, DOI: 10.3389/fgene.2021.792604
- * J-Q Zhu, SL Tan, T Taketo, A Lack of Coordination Between Sister-Chromatids Segregation and Cytokinesis in the Oocytes of B6.Y^{TIR} (XY) Sex-Reversed Female Mice. *Sci Rep.* 2017 Apr 19;7(1):960. PMID: 28424461, DOI: 10.1038/s41598-017-00922-1

Hoofdstuk 9

- T Dahlet et al., Genome-wide analysis in the mouse embryo reveals the importance of DNA methylation for transcription integrity. *Nat Commun.* 2020 Jun 19;11(1):3153. PMID: 32561758, DOI: 10.1038/s41467-020-16919-w
- S Gkoutela et al., DNA Demethylation Dynamics in the Human Prenatal Germline. *Cell* 2015 Jun 4;161(6):1425-1436. PMID: 26004067, DOI: 10.1016/j.cell.2015.05.012
- H Guo et al., The DNA methylation landscape of human early embryos. *Nature* 2014 Jul 31;511(7511):606-610. PMID: 25079557, DOI: 10.1038/nature13544
- *#23 CW Hanna, H Demond, G Kelsey, Epigenetic regulation in development: is the mouse a good model for the human? *Hum Reprod Update* 2018 Sep 1;24(5):556-576. PMID: 29992283, DOI: 10.1093/humupd/dmy021 [Review]
- *#24 M Leseva, BB Knowles, DM Messerschmidt, Davor Solter, Erase-Maintain-Establish: Natural Reprogramming of the Mammalian Epigenome. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2015;80:155-163. PMID: 26763985, DOI: 10.1101/sqb.2015.80.027441 [Review]
- M Monk, M Boubelik, S Lehnert, Temporal and Regional Changes in DNA Methylation in the Embryonic, Extraembryonic and Germ Cell Lineages During Mouse Embryo Development. *Development* 1987 Mar;99(3):371-382. PMID: 3653008, DOI: 10.1242/dev.99.3.371
- D Schübeler, Function and Information Content of DNA Methylation. *Nature* 2015 Jan 15;517(7534):321-326. PMID: 25592537, DOI: 10.1038/nature14192 [Review]
- * MKY Seah, DM Messerschmidt, From Germline to Soma: Epigenetic Dynamics in the Mouse Preimplantation Embryo. *Curr Top Dev Biol.* 2018;128:203-235. PMID: 29477164, DOI: 10.1016/bs.ctdb.2017.10.011
- * A Stäubli, AHFM Peters, Mechanisms of maternal intergenerational epigenetic inheritance. *Curr Opin Genet Dev.* 2021 Apr;67:151-162. PMID: 33607605, DOI: 10.1016/j.gde.2021.01.008 [Review]
- *#23 WWC Tang et al., A Unique Gene Regulatory Network Resets the Human Germline Epigenome for Development. *Cell* 2015 Jun 4;161(6):1453-1467. PMID: 26046444, DOI: 10.1016/j.cell.2015.04.053
- * WWC Tang et al., Specification and Epigenetic Programming of the Human Germ Line. *Nat Rev Genet.* 2016 Oct;17(10):585-600. PMID: 27573372, DOI: 10.1038/nrg.2016.88 [Review]
- G Wu, L Lei, HR Schöler, Totipotency in the mouse. *J Mol Med (Berl).* 2017 Jul;95(7):687-694. PMID: 28102431, DOI: 10.1007/s00109-017-1509-5 [Review]
- P Zhu et al., Single-cell DNA methylome sequencing of human preimplantation embryos. *Nat Genet.* 2018 Jan;50(1):12-19. PMID: 29255258, DOI: 10.1038/s41588-017-0007-6

Hoofdstuk 10

- * SC Barton, MA Surani, ML Norris, Role of Paternal and Maternal Genomes in Mouse Development. *Nature* 1984 Sep 27-Oct 3;311(5984):374-376. PMID: 6482961, DOI: 10.1038/311374a0
- M Bosse et al. (red), *Cahier epigenetica*. Den Haag: Biowetenschappen en Maatschappij, 2022/2023
- AC Bouwman, et al., Meta-analysis of Genome-Wide Association Studies for Cattle Stature Identifies Common Genes That Regulate Body Size in Mammals. *Nat Genet.* 2018 Mar;50(3):362-367. PMID: 29459679, DOI: 10.1038/s41588-018-0056-5 [Meta-Analysis]
- FC Cassidy, M Charalambous, Genomic imprinting, growth and maternal-fetal interactions. *J Exp Biol.* 2018 Mar 7;221(Pt Suppl 1):jeb164517. PMID: 29514882, DOI: 10.1242/jeb.164517 [Review]
- *#26 H Chen et al., Heads, Shoulders, Elbows, Knees, and Toes: Modular Gdf5 Enhancers Control Different Joints in the Vertebrate Skeleton. *PLoS Genet.* 2016 Nov 30;12(11):e1006454. PMID: 27902701, DOI: 10.1371/journal.pgen.1006454
- CW Hanna, G Kelsey, The Specification of Imprints in Mammals. *Heredity (Edinb)* 2014 Aug;113(2):176-183. PMID: 24939713, DOI: 10.1038/hdy.2014.54 [Review]
- * CW Hanna, H Demond, G Kelsey, Epigenetic Regulation in Development: Is the Mouse a Good Model for the Human? *Hum Reprod Update* 2018 Sep 1;24(5):556-576. PMID: 29992283, DOI: 10.1093/humupd/dmy021 [Review]
- https://en.wikipedia.org/wiki/Molar_pregnancy
- <http://igc.otago.ac.nz>
- <https://www.geneimprint.com/>
- * <https://www.mousebook.org/introduction-data-imprinting-genes>
- * J McGrath, D Solter, Completion of Mouse Embryogenesis Requires Both the Maternal and Paternal Genomes. *Cell* 1984 May;37(1):179-183. PMID: 6722870, DOI: 10.1016/0092-8674(84)90313-1
- G E Moore et al., The role and interaction of imprinted genes in human fetal growth. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2015 Mar 5;370(1663):20140074. PMID: 25602077, DOI: 10.1098/rstb.2014.0074 [Review]
- GT O'Neill, MH Kaufman, Cytogenetic analysis of ethanol-induced parthenogenesis. *J Exp Zool.* 1989 Feb;249(2):182-192. PMID: 2723605, DOI: 10.1002/jez.1402490211
- MM Patten et al, The Evolution of Genomic Imprinting: Theories, Predictions and Empirical Tests. *Heredity (Edinb)* 2014 Aug;113(2):119-128. PMID: 24755983, DOI: 10.1038/hdy.2014.29 [Review]
- * JD Perez, ND Rubinstein, C Dulac, New Perspectives on Genomic Imprinting, an Essential and Multifaceted Mode of Epigenetic Control in the Developing and Adult Brain. *Annu Rev Neurosci.* 2016 Jul 8;39:347-384. PMID: 27145912, DOI: 10.1146/annurev-neuro-061010-113708 [Review]

*#27 J Peters, The Role of Genomic Imprinting in Biology and Disease: An Expanding View. *Nat Rev Genet.* 2014 Aug;15(8):517-530. PMID: 24958438, DOI: 10.1038/nrg3766 [Review]

AG Searle, CV Beechey, Complementation Studies With Mouse Translocations. *Cytogenet Cell Genet.* 1978;20(1-6):282-303. PMID: 648183, DOI: 10.1159/000130859

* V Tucci et al., Genomic Imprinting and Physiological Processes in Mammals. *Cell* 2019 Feb 21;176(5):952-965. PMID: 30794780, DOI: 10.1016/j.cell.2019.01.043 [Review]

F Zink et al., Insights into imprinting from parent-of-origin phased methylomes and transcriptomes. *Nat Genet.* 2018 Nov;50(11):1542-1552. PMID: 30349119, DOI: 10.1038/s41588-018-0232-7

Box 4

AP Arnold et al., The Importance of Having Two X Chromosomes. *Review Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2016 Feb 19;371(1688):20150113. PMID: 26833834, DOI: 10.1098/rstb.2015.0113

* BP Balaton, T Dixon-McDougall, SB Peeters, CJ Brown, The eXceptional Nature of the X Chromosome. *Hum Mol Genet.* 2018 Aug 1;27(R2):R242-R249. PMID: 29701779, DOI: 10.1093/hmg/ddy148 [Review]

* AC Christensen, Cats as an Aid to Teaching Genetics. *Genetics* 2000 Jul;155(3):999-1004. PMID: 10880464

* T Green, S Flash, AL Reiss, Sex Differences in Psychiatric Disorders: What We Can Learn From Sex Chromosome Aneuploidies. *Neuropsychopharmacology* 2019 Jan;44(1):9-21. PMID: 30127341, DOI: 10.1038/s41386-018-0153-2 [Review]

JBS Haldane, The mutation rate of the gene for haemophilia, and its segregation ratios in males and females. *Ann Eugen.* 1947 Jun;13(4):262-271. PMID: 20249869, DOI: 10.1111/j.1469-1809.1946.tb02367.x

N He et al., At Term, X_mO and X_pO Mouse Placentas Show Differences in Glucose Metabolism in the Trophectoderm-Derived Outer Zone. *Front Cell Dev Biol.* 2017 Jun 21;5:63. PMID: 28680878, DOI: 10.3389/fcell.2017.00063

https://nl.wikipedia.org/wiki/Wet_van_Hardy-Weinberg

https://en.wikipedia.org/wiki/Hardy%E2%80%93Weinberg_principle

PA Hunt, Survival of XO mouse fetuses: effect of parental origin of the X chromosome or uterine environment? *Development* 1991 Apr;111(4):1137-1141. PMID: 1879355, DOI: 10.1242/dev.111.4.1137

SD Koukoui, A Chaudhuri, Neuroanatomical, Molecular Genetic, and Behavioral Correlates of Fragile X Syndrome. *Review Brain Res Rev.* 2007 Jan;53(1):27-38. PMID: 16844227, DOI: 10.1016/j.brainresrev.2006.06.001

- MF Lyon, SG Hawker, Reproductive Lifespan in Irradiated and Unirradiated Chromosomally XO Mice. *Genet Res.* 1973 Apr;21(2):185-194. PMID: 4735820, DOI: 10.1017/s0016672300013355
- CI van der Made et al., Presence of Genetic Variants Among Young Men With Severe COVID-19. *JAMA.* 2020 Jul 24;324(7):1-11. PMID: 32706371, DOI: 10.1001/jama.2020.13719
- LS Mamsen et al., Characterization of Follicles in Girls and Young Women With Turner Syndrome Who Underwent Ovarian Tissue Cryopreservation. *Fertil Steril.* 2019 Jun;111(6):1217-1225.e3. PMID: 30922638, DOI: 10.1016/j.fertnstert.2019.02.003
- H Mira-Bontenbal, J Gribnau, New Xist-Interacting Proteins in X-Chromosome Inactivation. *Curr Biol.* 2016 Apr 25;26(8):R338-342. PMID: 27115694, DOI: 10.1016/j.cub.2016.03.022 [Review]
- JL Mueller et al., Independent specialization of the human and mouse X chromosomes for the male germ line. *Nat Genet.* 2013 Sep;45(9):1083-1087. PMID: 23872635, DOI: 10.1038/ng.2705
- AG Searle, Gene Frequencies in London's Cats. *J Genet.* 1949 Dec;49(3):214-220. PMID: 24536670, DOI: 10.1007/BF02986074
- AG Searle, *Comparative Genetics of Coat Colour in Mammals.* Academic Press, 1968. ISBN 978-0126334500
- * M Souyris, JE Mejía, J Chaumeil, J Guéry, Female predisposition to TLR7-driven autoimmunity: gene dosage and the escape from X chromosome inactivation. *Semin Immunopathol.* 2019 Mar;41(2):153-164. PMID: 30276444, DOI: 10.1007/s00281-018-0712-y [Review]
- * E Viggiano, M Ergoli, E Picillo, L Politano, Determining the Role of Skewed X-chromosome Inactivation in Developing Muscle Symptoms in Carriers of Duchenne Muscular Dystrophy. *Hum Genet.* 2016 Jul;135(7):685-698. PMID: 27098336, DOI: 10.1007/s00439-016-1666-6 [Review]

Hoofdstuk 11

- RR Angell, Predivision in Human Oocytes at Meiosis I: A Mechanism for Trisomy Formation in Man. *Hum Genet.* 1991 Feb;86(4):383-387. PMID: 1999340, DOI: 10.1007/BF00201839
- P de Boer, I Embryonale ontwikkeling voor de implantatie en embryonale sterfte bij varkens, II Cytogenetica van varkens. Rapport B 106. Instituut voor Veeteeltkundig onderzoek "Schoonoord", 1970
- P de Boer, FA van der Hoeven, The Use of Translocation-Derived "Marker-Bivalents" for Studying the Origin of Meiotic Instability in Female Mice. *Cytogenet Cell Genet.* 1980;26(1):49-58. PMID: 6929247, DOI: 10.1159/000131421

- P de Boer, FA van der Hoeven, Chromosome Damage and Non-Disjunction Measured at the First Cleavage Division in Normal and Chromosomally Mutant Female Mice Irradiated at the Diakinesis Stage of Female Meiosis. *Mutat Res.* 1991 May;248(1):155-162. PMID: 2030704, DOI: 10.1016/0027-5107(91)90097-8
- JG Brewen, HS Payne, RJ Preston, X-ray-induced Chromosome Aberrations in Mouse Dictyate Oocytes. I. Time and Dose Relationships. *Mutat Res.* 1976 Apr;35(1):111-120. PMID: 58377, DOI: 10.1016/0027-5107(76)90173-1
- J P de Bruin et al., The role of genetic factors in age at natural menopause. *Hum Reprod.* 2001 Sep;16(9):2014-2018. PMID: 11527915, DOI: 10.1093/humrep/16.9.2014
- A Caine, MF Lyon, The Induction of Chromosome Aberrations in Mouse Dictyate Oocytes by X-rays and Chemical Mutagens. *Mutat Res.* 1977 Dec;45(3):325-331. PMID: 201837, DOI: 10.1016/0027-5107(77)90142-7
- * C Charalambous, A Webster, M Schuh, Aneuploidy in mammalian oocytes and the impact of maternal ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2022 Sep 6. PMID: 36068367, DOI: 10.1038/s41580-022-00517-3 [Review]
- EY Cheng, et al., Meiotic Recombination in Human Oocytes. *PLoS Genet.* 2009 Sep;5(9):e1000661. PMID: 19763179, DOI: 10.1371/journal.pgen.1000661
- * G Coticchio, DF Albertini, L De Santis (eds), *Oogenesis*. London: Springer, 2013. ISBN 9780857298256, DOI: 10.1007/978-0-85729-826-3
- RG Edwards, AG Searle, Genetic radiosensitivity of specific post-dictyate stages in mouse oocytes. *Genet. Res.* 1963;4:389-398. DOI: 10.1017/S0016672300003785
- T Endo et al., Retinoic Acid and Germ Cell Development in the Ovary and Testis. *Biomolecules* 2019 Nov 24;9(12):775. PMID: 31771306, DOI: 10.3390/biom9120775 [Review]
- JJ Eppig, Reproduction: Oocytes Call, Granulosa Cells Connect. *Curr Biol.* 2018 Apr 23;28(8):R354-R356. PMID: 29689210, DOI: 10.1016/j.cub.2018.03.005 [Comment]
- X Fan et al., Single-cell reconstruction of follicular remodeling in the human adult ovary. *Nat Commun.* 2019 Jul 18;10(1):3164. PMID: 31320652, DOI: 10.1038/s41467-019-11036-9
- * JK Findlay, KJ Hutt, M Hickey, RA Anderson, How Is the Number of Primordial Follicles in the Ovarian Reserve Established? *Biol Reprod.* 2015 Nov;93(5):111. PMID: 26423124, DOI: 10.1095/biolreprod.115.133652 [Review]
- J Fontana et al., Metabolic cooperation in the ovarian follicle. *Physiol Res.* 2020 Feb 19;69(1):33-48. PMID: 31854191, DOI: 10.33549/physiolres.934233 [Review]

* JM Franasiak et al., The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15,169 consecutive trophectoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening. *Fertil Steril.* 2014 Mar;101(3):656-663.e1. PMID: 24355045, DOI: 10.1016/j.fertnstert.2013.11.004 [Review]

S Ganesan, AF Keating, Bisphenol A-Induced Ovotoxicity Involves DNA Damage Induction to Which the Ovary Mounts a Protective Response Indicated by Increased Expression of Proteins Involved in DNA Repair and Xenobiotic Biotransformation. *Toxicol Sci.* 2016 Jul;152(1):169-180. PMID: 27208089, DOI: 10.1093/toxsci/kfw076

Z Gao et al., Overlooked roles of DNA damage and maternal age in generating human germline mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019 May 7;116(19):9491-9500. PMID: 31019089, DOI: 10.1073/pnas.1901259116

* JM Goldmann et al., Germline De Novo Mutation Clusters Arise During Oocyte Aging in Genomic Regions With High Double-Strand-Break Incidence. *Nat Genet.* 2018 Apr;50(4):487-492. PMID: 29507425, DOI: 10.1038/s41588-018-0071-6

BV Halldorsson et al., Characterizing mutagenic effects of recombination through a sequence-level genetic map. *Science* 2019 Jan 25;363(6425):eaau1043. PMID: 30679340, DOI: 10.1126/science.aau1043

* SA Henderson, RG Edwards, Chiasma Frequency and Maternal Age in Mammals. *Nature* 1968 Apr 6;218(5136):22-28. PMID: 4230650, DOI: 10.1038/218022a0

CA Hodges et al., Experimental Evidence That Changes in Oocyte Growth Influence Meiotic Chromosome Segregation. *Hum Reprod.* 2002 May;17(5):1171-1180. PMID: 11980735, DOI: 10.1093/humrep/17.5.1171

* CA Hodges et al., SMC1beta-deficient Female Mice Provide Evidence That Cohesins Are a Missing Link in Age-Related Nondisjunction. *Nat Genet.* 2005 Dec;37(12):1351-1355. PMID: 16258540, DOI: 10.1038/ng1672

Z Holubcová, M Blayney, K Elder, M Schuh, Error-prone chromosome-mediated spindle assembly favors chromosome segregation defects in human oocytes. *Science* 2015 Jun 5;348(6239):1143-1147. PMID: 26045437, DOI: 10.1126/science.aaa9529

* <https://en.wikipedia.org/wiki/Miscarriage>

https://en.wikipedia.org/wiki/Lionel_Penrose

https://nl.wikipedia.org/wiki/Bisfenol_A

<https://nl.wikipedia.org/wiki/Miskraam>

- PA Hunt, Ethanol-induced Aneuploidy in Male Germ Cells of the Mouse. *Cytogenet Cell Genet.* 1987;44(1):7-10. PMID: 3816306, DOI: 10.1159/000132333
- PA Hunt et al., Bisphenol a Exposure Causes Meiotic Aneuploidy in the Female Mouse. *Curr Biol.* 2003 Apr 1;13(7):546-553. PMID: 12676084, DOI: 10.1016/s0960-9822(03)00189-1
- MH Kaufman, The Chromosome Complement of Single-Pronuclear Haploid Mouse Embryos Following Activation by Ethanol Treatment. *J Embryol Exp Morphol.* 1982 Oct;71:139-154. PMID: 7153693
- MH Kaufman, Ethanol-induced chromosomal abnormalities at conception. *Nature* 1983 Mar 17-23;302(5905):258-260. PMID: 6682181, DOI: 10.1038/302258a0
- * D-A Kim, E-K Suh, Defying DNA Double-Strand Break-Induced Death During Prophase I Meiosis by Temporal Tap63 α Phosphorylation Regulation in Developing Mouse Oocytes. *Mol Cell Biol.* 2014 Apr;34(8):1460-1473. PMID: 24515437, DOI: 10.1128/MCB.01223-13
- SIR Lane et al., DNA Damage Induces a Kinetochore-Based ATM/ATR-independent SAC Arrest Unique to the First Meiotic Division in Mouse Oocytes. *Development* 2017 Oct 1;144(19):3475-3486. PMID: 28851706, DOI: 10.1242/dev.153965
- SD Limback, DF Albertini, Imaging Strategies for Studying Mammalian Oogenesis. In: Coticchio G., Albertini D., De Santis L. (eds), *Oogenesis*. London: Springer, London, 2013. First Online 12 October 2012. DOI: 10.1007/978-0-85729-826-3_1
- * W Lin et al., Ovarian Aging in Women With BRCA Germline Mutations. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017 Oct 1;102(10):3839-3847. PMID: 28938488, DOI: 10.1210/jc.2017-00765
- * L Macurek, DNA damage in the oocytes SACs. *Cell Cycle* 2016;15(4):491-492. PMID: 26709886, DOI: 10.1080/15384101.2015.1136522 [Editorial]
- S Malki et al., A Role for Retrotransposon LINE-1 in Fetal Oocyte Attrition in Mice. *Dev Cell.* 2014 Jun 9;29(5):521-533. PMID: 24882376, DOI: 10.1016/j.devcel.2014.04.027
- S Malki, ME Tharp, A Bortvin, A Whole-Mount Approach for Accurate Quantitative and Spatial Assessment of Fetal Oocyte Dynamics in Mice. *Biol Reprod.* 2015 Nov;93(5):113. PMID: 26423126, DOI: 10.1095/biolreprod.115.132118
- P Marangos, J Carroll, Oocytes progress beyond prophase in the presence of DNA damage. *Curr Biol.* 2012 Jun 5;22(11):989-994. PMID: 22578416, DOI: 10.1016/j.cub.2012.03.063
- P Marangos et al., DNA damage-induced metaphase I arrest is mediated by the spindle assembly checkpoint and maternal age. *Nat Commun.* 2015 Nov 2;6:8706. PMID: 26522734, DOI: 10.1038/ncomms9706

- * JH Martin, RJ Aitken, EG Bromfield, B Nixon, DNA Damage and Repair in the Female Germline: Contributions to ART. *Hum Reprod Update* 2019 Mar 1;25(2):180-201. PMID: 30541031, DOI: 10.1093/humupd/dmy040 [Review]
- A Mayer et al., DNA Damage Response During Mouse Oocyte Maturation. *Cell Cycle* 2016;15(4):546-558. PMID: 26745237, DOI: 10.1080/15384101.2015.1128592
- * BP Mihalas, KA Redgrove, EMcLaughlin, B Nixon, Molecular Mechanisms Responsible for Increased Vulnerability of the Ageing Oocyte to Oxidative Damage. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:4015874. PMID: 29312475, DOI: 10.1155/2017/4015874 [Review]
- *#28,29 D Monniaux et al., The Ovarian Reserve of Primordial Follicles and the Dynamic Reserve of Antral Growing Follicles: What Is the Link? *Biol Reprod.* 2014 Apr 25;90(4):85. PMID: 24599291, DOI: 10.1095/biolreprod.113.117077 [Review]
- D Monniaux, Driving Folliculogenesis by the Oocyte-Somatic Cell Dialog: Lessons From Genetic Models. *Theriogenology* 2016 Jul 1;86(1):41-53. PMID: 27155734, DOI: 10.1016/j.theriogenology.2016.04.017 [Review]
- SI Nagaoka, TJ Hassold, PA Hunt, Human Aneuploidy: Mechanisms and New Insights Into an Age-Old Problem. *Nat Rev Genet.* 2012 Jun 18;13(7):493-504. PMID: 22705668, DOI: 10.1038/nrg3245 [Review]
- *#29 SS Nussey, S Whitehead, *Endocrinology, An Integrated Approach*. Oxford: BIOS Scientific Publishers, 2001. ISBN-10: 1859962521, DOI: 10.1201/b15306
- GT O'Neill, MH Kaufman, Cytogenetic Analysis of Ethanol-Induced Parthenogenesis. *J Exp Zool.* 1989 Feb;249(2):182-192. PMID: 2723605, DOI: 10.1002/jez.1402490211
- LS Penrose, Parental Age and Mutation. *Lancet* 1955 Aug 13;269(6885):312-313. PMID: 13243724, DOI: 10.1016/s0140-6736(55)92305-9
- JS Perry, The Incidence of Embryonic Mortality as a Characteristic of the Individual Sow. *J Reprod Fertil.* 1960 Feb;1:71-83. PMID: 14432033, DOI: 10.1530/jrf.0.0010071
- S Quenby et al., Miscarriage matters: the epidemiological, physical, psychological, and economic costs of early pregnancy loss. *Lancet* 2021 May 1;397(10285):1658-1667. PMID: 33915094, DOI: 10.1016/S0140-6736(21)00682-6 [Review]
- A Rodríguez-Nuevo et al., Oocytes maintain ROS-free mitochondrial metabolism by suppressing complex I. *Nature* 2022 Jul;607(7920):756-761. PMID: 35859172, DOI: 10.1038/s41586-022-04979-5

- * R Rowsey et al., Examining Variation in Recombination Levels in the Human Female: A Test of the Production-Line Hypothesis. *Am J Hum Genet.* 2014 Jul 3;95(1):108-112. PMID: 24995869, DOI: 10.1016/j.ajhg.2014.06.008
- KS Ruth et al., Genetic insights into biological mechanisms governing human ovarian ageing. *Nature* 2021 Aug;596(7872):393-397. PMID: 34349265, DOI: 10.1038/s41586-021-03779-7
- *#34 Y Sakakibara et al., Bivalent Separation Into Univalents Precedes Age-Related Meiosis I Errors in Oocytes. *Nat Commun.* 2015 Jul 1;6:7550. PMID: 26130582, DOI: 10.1038/ncomms8550
- *#28,29 RM Schultz, P Stein, P Svoboda, The Oocyte-To-Embryo Transition in Mouse: Past, Present, and Future. *Biol Reprod.* 2018 Jul 1;99(1):160-174. PMID: 29462259, DOI: 10.1093/biolre/iy013
- AL Severance, U Midic, KE Latham, Genotypic divergence in mouse oocyte transcriptomes: possible pathways to hybrid vigor impacting fertility and embryogenesis. *Physiol Genomics* 2020 Feb 1;52(2):96-109. PMID: 31869285, DOI: 10.1152/physiolgenomics.00078.2019
- VB Seplyarskiy et al., TOPMed Population Genetics Working Group, Population sequencing data reveal a compendium of mutational processes in the human germ line. *Science* 2021 Aug 27;373(6558):1030-1035. PMID: 34385354, DOI: 10.1126/science.aba7408
- * P Smith, D Wilhelm, R Rodgers, Development of mammalian ovary. *J Endocrinol.* 2014 Jun;221(3):R145-161. PMID: 24741072, DOI: 10.1530/JOE-14-0062 [Review]
- H Tateno, K Mikamo, Effects of neonatal ovarian X-irradiation in the Chinese hamster. II. Absence of chromosomal and developmental damages in surviving oocytes irradiated at the pachytene and resting dictyate stages. *J Radiat Res.* 1989 Sep;30(3):209-217. PMID: 2681722, DOI: 10.1269/jrr.30.209
- C Tease, G Fisher, X-ray-induced Chromosome Aberrations in Immediately Preovulatory Oocytes. *Mutat Res.* 1986 Mar;173(3):211-215. PMID: 3951471, DOI: 10.1016/0165-7992(86)90038-2
- ME Tharp, S Malki, A Bortvin, Maximizing the Ovarian Reserve in Mice by Evading LINE-1 Genotoxicity. *Nat Commun.* 2020 Jan 16;11(1):330. PMID: 31949138, DOI: 10.1038/s41467-019-14055-8
- * S Titus et al., Impairment of BRCA1-related DNA Double-Strand Break Repair Leads to Ovarian Aging in Mice and Humans. *Sci Transl Med.* 2013 Feb 13;5(172):172ra21. PMID: 23408054, DOI: 10.1126/scitranslmed.3004925
- S Wang et al., Inefficient Crossover Maturation Underlies Elevated Aneuploidy in Human Female Meiosis. *Cell* 2017 Mar 9;168(6):977-989.e17. PMID: 28262352, DOI: 10.1016/j.cell.2017.02.002
- *#34 AI Webster, M Schuh, Mechanisms of Aneuploidy in Human Eggs. *Trends Cell Biol.* 2017 Jan;27(1):55-68. PMID: 27773484, DOI: 10.1016/j.tcb.2016.09.002 [Review]

*#28,29 AL Winship, JM Stringer, SH Liew, KJ Hutt, The importance of DNA repair for maintaining oocyte quality in response to anti-cancer treatments, environmental toxins and maternal ageing. *Hum Reprod Update* 2018 Mar 1;24(2):119-134. PMID: 29377997, DOI: 10.1093/humupd/dmy002

AP Zielinska, M Schuh, A Microscopy-Based Approach for Studying Meiosis in Live and Fixed Human Oocytes. *Methods Cell Biol.* 2018;145:315-333. PMID: 29957212, DOI: 10.1016/bs.mcb.2018.03.039

M Zuccotti, Meiotic and Developmental Competence of Mouse Antral Oocytes. *Biol Reprod.* 1998 Mar;58(3):700-704. PMID: 9510956, DOI: 10.1095/biolreprod58.3.700

Hoofdstuk 12, tabel 5 en 6

I Ahlmann Olesen et al., Clinical, Genetic, Biochemical, and Testicular Biopsy Findings Among 1,213 Men Evaluated for Infertility. *Fertil Steril.* 2017 Jan;107(1):74-82.e7. PMID: 27793385, DOI: 10.1016/j.fertnstert.2016.09.015

EA Ahmed et al., Genetic Probing of Homologous Recombination and Non-Homologous End Joining During Meiotic Prophase in Irradiated Mouse Spermatocytes. *Mutat Res.* 2010 Jun 1;688(1-2):12-18. PMID: 20167225, DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2010.02.004

*#35 RP Amann, Considerations in Evaluating Human Spermatogenesis on the Basis of Total Sperm Per Ejaculate. *J Androl.* Nov-Dec 2009;30(6):626-641. PMID: 19443909, DOI: 10.2164/jandrol.108.006817 [Review]

LB Alexandrov et al., Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* 2013 Aug 22;500(7463):415-421. PMID: 23945592, DOI: 10.1038/nature12477

MJ Anderson et al., Functional evidence for differences in sperm competition in humans and chimpanzees. *Am J Phys Anthropol.* 2007 Oct;134(2):274-280. PMID: 17632799, DOI: 10.1002/ajpa.20674 [Comparative Study]

F Åsenius, AF Danson, SJ Marzi, DNA methylation in human sperm: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2020 Nov 1;26(6):841-873. PMID: 32790874, DOI: 10.1093/humupd/dmaa025

*^6 E Van Assche et al., Cytogenetics of infertile men. *Hum Reprod.* 1996 Dec;11 Suppl 4:1-24; discussion 25-6. PMID: 9147109, DOI: 10.1093/humrep/11.suppl_4.1 [Review]

KI Aston et al., Aberrant Sperm DNA Methylation Predicts Male Fertility Status and Embryo Quality. *Fertil Steril.* 2015 Dec;104(6):1388-97.e1-5. PMID: 26361204, DOI: 10.1016/j.fertnstert.2015.08.019

D Bachtrog, The Y Chromosome as a Battleground for Intragenomic Conflict Trends *Genet.* 2020 Jul;36(7):510-522. PMID: 32448494, DOI: 10.1016/j.tig.2020.04.008 [Review]

- R Baskar, KA Lee, R Yeo, K-W Yeoh, Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *Int J Med Sci.* 2012;9(3):193-199. PMID: 22408567, DOI: 10.7150/ijms.3635 [Review]
- P Bearely, R Oates, Recent advances in managing and understanding Klinefelter syndrome. *F1000Res.* 2019 Jan 28;8:F1000 Faculty Rev-112. PMID: 30755791, DOI: 10.12688/f1000research.16747.1 [Review]
- RA Beatty et al, An Experiment With Heterospermic Insemination in Cattle. *J Reprod Fertil.* 1969 Aug;19(3):491-502. PMID: 5809467, DOI: 10.1530/jrf.0.0190491
- RA Beatty, MC Lim, VJ Coulter, A quantitative study of the second meiotic metaphase in male mice (*Mus musculus*). *Cytogenet Cell Genet.* 1975;15(4):256-275. PMID: 1240796, DOI: 10.1159/000130523
- K Bhutani et al., Widespread haploid-biased gene expression enables sperm-level natural selection. *Science* 2021 Mar 5;371(6533):eabb1723. PMID: 33446482, DOI: 10.1126/science.abb1723
- P de Boer, JH Nijhoff, Incomplete Sex Chromosome Pairing of Oligospermic Male Hybrids of *Mus Musculus* and *M. Musculus Molossinus* in Relation to the Source of the Y Chromosome and the Presence or Absence of a Reciprocal Translocation. *J Reprod Fertil.* 1981 May;62(1):235-243. PMID: 7230129, DOI: 10.1530/jrf.0.0620235
- P de Boer et al., Kinetics of Meiosis in Azoospermic Males: A Joint Histological and Cytological Approach. *Cytogenet Genome Res.* 2004;105(1):36-46. PMID: 15218256, DOI: 10.1159/000078007 [Clinical Trial]
- F Boitrelle et al., The Sixth Edition of the WHO Manual for Human Semen Analysis: A Critical Review and SWOT Analysis. *Life (Basel)* 2021 Dec 9;11(12):1368. PMID: 34947899, DOI: 10.3390/life11121368 [Review]
- * JS Brandt, MA Cruz Ithier, T Rosen, E Ashkinadze, Advanced Paternal Age, Infertility, and Reproductive Risks: A Review of the Literature. *Prenat Diagn.* 2019 Jan;39(2):81-87. PMID: 30520056, DOI: 10.1002/pd.5402
- JG Brewen, RJ Preston, N Gengozian, Analysis of X-Ray-Induced Chromosomal Translocations in Human and Marmoset Spermatogonial Stem Cells. *Nature* 1975 Feb 6;253(5491):468-470. PMID: 803303, DOI: 10.1038/253468a0
- JE Buizer-Voskamp et al., Paternal Age and Psychiatric Disorders: Findings From a Dutch Population Registry. *Schizophr Res.* 2011 Jul;129(2-3):128-132. PMID: 21489755, DOI: 10.1016/j.schres.2011.03.021
- BM Cattanaach, Spermatogonial Stem Cell Killing in the Mouse Following Single and Fractionated X-Ray Doses, as Assessed by Length of Sterile Period. *Mutat Res.* 1974 Oct;25(1):53-62. PMID: 4427607, DOI: 10.1016/0027-5107(74)90218-8

- F Chalmel, AD Rolland, Linking transcriptomics and proteomics in spermatogenesis. *Reproduction* 2015 Nov;150(5):R149-R157. PMID: 26416010, DOI: 10.1530/REP-15-0073 [Review]
- AC Chandley, Genetic Contribution to Male Infertility. *Hum Reprod.* 1998 Jun;13 Suppl 3:76-83; discussion 84-88. PMID: 9755416, DOI: 10.1093/humrep/13.suppl_3.76
- Z Chang et al., Triptonide is a reversible non-hormonal male contraceptive agent in mice and non-human primates. *Nat Commun.* 2021 Feb 23;12(1):1253. PMID: 33623031, DOI: 10.1038/s41467-021-21517-5
- * L Cheng et al., Testicular cancer. *Nat Rev Dis Primers* 2018 Oct 5;4(1):29. PMID: 30291251, DOI: 10.1038/s41572-018-0029-0 [Review]
- Y Clermont, Renewal of Spermatogonia in Man. *Am J Anat.* 1966 Mar;118(2):509-524. PMID: 5917196, DOI: 10.1002/aja.1001180211
- J Cocquet et al., A genetic basis for a postmeiotic X versus Y chromosome intragenomic conflict in the mouse. *PLoS Genet* 2012 Sep;8(9):e1002900. PMID: 23028340, DOI: 10.1371/journal.pgen.1002900
- * M Cocuzza, C Alvarenga, R Pagani, The epidemiology and etiology of azoospermia. *Clinics (Sao Paulo)*. 2013;68 Suppl 1(Suppl 1):15-26. PMID: 23503951, DOI: 10.6061/clinics/2013(sup01)03
- *⁶ S Colaco, D Modi, Genetics of the human Y chromosome and its association with male infertility. *Reprod Biol Endocrinol.* 2018 Feb 17;16(1):14. PMID: 29454353, DOI: 10.1186/s12958-018-0330-5 [Review]
- *³⁴ ⁵ TG Cooper et al., World Health Organization Reference Values for Human Semen Characteristics. *Hum Reprod Update* May-Jun 2010;16(3):231-245. PMID: 19934213, DOI: 10.1093/humupd/dmp048
- G Corona et al., Sperm recovery and ICSI outcomes in Klinefelter syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2017 May 1;23(3):265-275. PMID: 28379559, DOI: 10.1093/humupd/dmx008 [Review]
- * A Davis Bell et al., Insights into variation in meiosis from 31,228 human sperm genomes. *Nature* 2020 Jul;583(7815):259-264. PMID: 32494014, DOI: 10.1038/s41586-020-2347-0 [Review]
- * JR Drevet, RJ Aitken, Oxidative Damage to Sperm DNA: Attack and Defense. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1166:107-117. PMID: 31301049, DOI: 10.1007/978-3-030-21664-1_7
- S van den Driesche et al., Experimentally induced testicular dysgenesis syndrome originates in the masculinization programming window. *JCI Insight* 2017 Mar 23;2(6):e91204. PMID: 28352662, DOI: 10.1172/jci.insight.91204

- ML Eisenberg et al., The Relationship Between Male BMI and Waist Circumference on Semen Quality: Data From the LIFE Study. *Hum Reprod.* 2014 Feb;29(2):193-200. PMID: 24306102, DOI: 10.1093/humrep/det428
- * ML Eisenberg et al., Semen Quality, Infertility and Mortality in the USA. *Hum Reprod.* 2014 Jul;29(7):1567-1574. PMID: 24838701, DOI: 10.1093/humrep/deu106 [Multicenter Study]
- ML Eisenberg et al., Increased Risk of Cancer in Infertile Men: Analysis of U.S. Claims Data. *J Urol.* 2015 May;193(5):1596-1601. PMID: 25463997, DOI: 10.1016/j.juro.2014.11.080
- ML Eisenberg, S Li, MR Cullen, LC Baker, Increased Risk of Incident Chronic Medical Conditions in Infertile Men: Analysis of United States Claims Data. *Fertil Steril.* 2016 Mar;105(3):629-636. PMID: 26674559, DOI: 10.1016/j.fertnstert.2015.11.011
- T Endo et al., Retinoic Acid and Germ Cell Development in the Ovary and Testis. *Biomolecules* 2019 Nov 24;9(12):775. PMID: 31771306, DOI: 10.3390/biom9120775 [Review]
- A Enguita-Marruedo et al., Meiotic arrest occurs most frequently at metaphase and is often incomplete in azoospermic men. *Fertil Steril.* 2019 Dec;112(6):1059-1070.e3. PMID: 31767154, DOI: 10.1016/j.fertnstert.2019.08.004 [Observational Study]
- B Eskenazi et al., The association of age and semen quality in healthy men. *Hum Reprod.* 2003 Feb;18(2):447-454. PMID: 12571189, DOI: 10.1093/humrep/deg107
- I Faisal, L Kauppi, Reduced MAD2 levels dampen the apoptotic response to non-exchange sex chromosomes and lead to sperm aneuploidy. *Development* 2017 Jun 1;144(11):1988-1996. PMID: 28506992, DOI: 10.1242/dev.149492
- A Forand et al., Similarities and Differences in the in Vivo Response of Mouse Neonatal Gonocytes and Spermatogonia to Genotoxic Stress. *Biol Reprod.* 2009 May;80(5):860-873. PMID: 19144961, DOI: 10.1095/biolreprod.108.072884
- CE Ford, AG Searle, EP Evans, BJ West, Differential Transmission of Translocations Induced in Spermatogonia of Mice by Irradiation. *Cytogenetics* 1969;8(6):447-470. PMID: 5365250, DOI: 10.1159/000130056
- LR Fraser, I Maudlin, Analysis of aneuploidy in first-cleavage mouse embryos fertilized in vitro and in vivo. *Environ Health Perspect.* 1979 Aug;31:141-149. PMID: 387395, DOI: 10.1289/ehp.7931141
- Z Gao et al., Overlooked roles of DNA damage and maternal age in generating human germline mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019 May 7;116(19):9491-9500. PMID: 31019089, DOI: 10.1073/pnas.1901259116

P Gharagozloo et al., A Novel Antioxidant Formulation Designed to Treat Male Infertility Associated With Oxidative Stress: Promising Preclinical Evidence From Animal Models. *Hum Reprod.* 2016 Feb;31(2):252-262. PMID: 26732620, DOI: 10.1093/humrep/dev302

*#33 C González-Marín, J Gosálvez, R Roy, Types, causes, detection and repair of DNA fragmentation in animal and human sperm cells. *Int J Mol Sci.* 2012 Oct 31;13(11):14026-14052. PMID: 23203048, DOI: 10.3390/ijms131114026 [Review]

*#32 M-C Grégoire et al., The DNA double-strand “breakome” of mouse spermatids. *Cell Mol Life Sci.* 2018 Aug;75(15):2859-2872. PMID: 29417179, DOI: 10.1007/s00018-018-2769-0

J Guo et al., The adult human testis transcriptional cell atlas. *Cell Res.* 2018 Dec;28(12):1141-1157. PMID: 30315278, DOI: 10.1038/s41422-018-0099-2

G Hamer et al., DNA Double-Strand Breaks and gamma-H2AX Signaling in the Testis. *Biol Reprod.* 2003 Feb;68(2):628-634. PMID: 12533428, DOI: 10.1095/biolreprod.102.008672

G Hamer, DG de Rooij, Mutations Causing Specific Arrests in the Development of Mouse Primordial Germ Cells and Gonocytes. *Biol Reprod.* 2018 Jul 1;99(1):75-86. PMID: 29590307, DOI: 10.1093/biolre/i0y075 [Review]

K Harris, R Nielsen, The Genetic Cost of Neanderthal Introgression. *Genetics* 2016 Jun;203(2):881-891. PMID: 27038113, DOI: 10.1534/genetics.116.186890

GW van der Heijden et al., Chromosome-wide Nucleosome Replacement and H3.3 Incorporation During Mammalian Meiotic Sex Chromosome Inactivation. *Nat Genet.* 2007 Feb;39(2):251-258. PMID: 17237782, DOI: 10.1038/ng1949

CG Heller, Y Clermont, Spermatogenesis in man: an estimate of its duration. *Science* 1963 Apr 12;140(3563):184-186. PMID: 13953583, DOI: 10.1126/science.140.3563.184

S Hiltz, AJ Modzelewski, PE Cohen, A Grimson, The roles of microRNAs and siRNAs in mammalian spermatogenesis. *Development* 2016 Sep 1;143(17):3061-3073. PMID: 27578177, DOI: 10.1242/dev.136721 [Review]

*#33 JH Hoeijmakers, Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 2001 May 17;411(6835):366-374. PMID: 11357144, DOI: 10.1038/35077232 [Review]

G van der Horst, L Maree, Sperm form and function in the absence of sperm competition. *Mol Reprod Dev.* 2014 Mar;81(3):204-216. PMID: 24273026, DOI: 10.1002/mrd.22277 [Review]

<https://en.wikipedia.org/wiki/Percoll>

* <http://infertilegenome.org>

* <https://en.wikipedia.org/wiki/Percoll>

<https://www.proteinatlas.org/humanproteome/tissue/>

- SZ Jan et al., Distinct Prophase Arrest Mechanisms in Human Male Meiosis. *Development* 2018 Apr 16;145(16):dev160614. PMID: 29540502, DOI: 10.1242/dev.160614
- B Jégou et al., Meiotic Genes Are Enriched in Regions of Reduced Archaic Ancestry. *Mol Biol Evol.* 2017 Aug 1;34(8):1974-1980. PMID: 28444387, DOI: 10.1093/molbev/msx141
- TG Jenkins et al., Decreased fecundity and sperm DNA methylation patterns. *Fertil Steril.* 2016 Jan;105(1):51-7.e1-3. PMID: 26453269, DOI: 10.1016/j.fertnstert.2015.09.013
- E Johanson, A Study of Schizophrenia in the Male: A Psychiatric and Social Study Based on 138 Cases With Follow Up. *Acta Psychiatr Neurol Scand Suppl.* 1958;125:1-132. PMID: 13594594
- SG Johnsen, Testicular Biopsy Score Count--A Method for Registration of Spermatogenesis in Human Testes: Normal Values and Results in 335 Hypogonadal Males. *Hormones* 1970;1(1):2-25. PMID: 5527187, DOI: 10.1159/000178170
- L Johnson, DD Varner, Effect of Daily Spermatozoan Production but Not Age on Transit Time of Spermatozoa Through the Human Epididymis. *Biol Reprod.* 1988 Nov;39(4):812-817. PMID: 3207807, DOI: 10.1095/biolreprod39.4.812
- J Kaplanis et al., Genetic and chemotherapeutic influences on germline hypermutation. *Nature* 2022 May;605(7910):503-508. PMID: 35545669, DOI: 10.1038/s41586-022-04712-2
- *^6 L Kasak, M Laan, Monogenic causes of non-obstructive azoospermia: challenges, established knowledge, limitations and perspectives. *Hum Genet.* 2021 Jan;140(1):135-154. PMID: 31955275, DOI: 10.1007/s00439-020-02112-y [Review]
- * DL Keefe, Telomeres and Genomic Instability During Early Development. *Eur J Med Genet.* 2020 Feb;63(2):103638. PMID: 30862510, DOI: 10.1016/j.ejmg.2019.03.002 [Review]
- T Kido, Y-F C Lau, Roles of the Y chromosome genes in human cancers. *Asian J Androl.* May-Jun 2015;17(3):373-380. PMID: 25814157, DOI: 10.4103/1008-682X.150842 [Review]
- *#38 C Krausz, E Casamonti, Spermatogenic Failure and the Y Chromosome. *Hum Genet.* 2017 May;136(5):637-655. PMID: 28456834, DOI: 10.1007/s00439-017-1793-8 [Review]
- * C Krausz, A Riera-Escamilla, Genetics of Male Infertility. *Nat Rev Urol.* 2018 Jun;15(6):369-384. PMID: 29622783, DOI: 10.1038/s41585-018-0003-3 [Review]
- *^6 C Krausz et al., Genetic dissection of spermatogenic arrest through exome analysis: clinical implications for the management of azoospermic men. *Genet Med.* 2020 Dec;22(12):1956-1966. PMID: 32741963, DOI: 10.1038/s41436-020-0907-1
- CL Labrecque, B Fuglestad, Electrostatic Drivers of GPx4 Interactions with Membrane, Lipids, and DNA. *Biochemistry* 2021 Sep 21;60(37):2761-2772. PMID: 34492183, DOI: 10.1021/acs.biochem.1c00492

- D Langenstroth-Röwer et al., De novo methylation in male germ cells of the common marmoset monkey occurs during postnatal development and is maintained in vitro. *Epigenetics* 2017 Jul 3;12(7):527-539. PMID: 27786608, DOI: 10.1080/15592294.2016.1248007
- EL Larson et al., The Composite Regulatory Basis of the Large X-Effect in Mouse Speciation. *Mol Biol Evol.* 2017 Feb 1;34(2):282-295. PMID: 27999113, DOI: 10.1093/molbev/msw243
- T Latif et al., Semen Quality as a Predictor of Subsequent Morbidity: A Danish Cohort Study of 4,712 Men With Long-Term Follow-up. *Am J Epidemiol.* 2017 Oct 15;186(8):910-917. PMID: 28498890, DOI: 10.1093/aje/kwx067
- S Laurentino, J Borgmann, J Gromoll, On the Origin of Sperm Epigenetic Heterogeneity. *Reproduction* 2016 May;151(5):R71-R78. PMID: 26884419, DOI: 10.1530/REP-15-0436 [Review]
- HS Levin, Testicular Biopsy in the Study of Male Infertility: Its Current Usefulness, Histologic Techniques, and Prospects for the Future. *Hum Pathol.* 1979 Sep;10(5):569-584. PMID: 43278, DOI: 10.1016/s0046-8177(79)80100-8
- * H Levine et al., Temporal Trends in Sperm Count: A Systematic Review and Meta-Regression Analysis. *Hum Reprod Update* 2017 Nov 1;23(6):646-659. PMID: 28981654, DOI: 10.1093/humupd/dmx022 [Review]
- R Lilford et al., Case-control Study of Whether Subfertility in Men Is Familial. *BMJ.* 1994 Sep 3;309(6954):570-573. PMID: 8086942, DOI: 10.1136/bmj.309.6954.570
- EA Lucotte et al., Dynamic Copy Number Evolution of X- And Y-Linked Ampliconic Genes in Human Populations. *Genetics* 2018 Jul;209(3):907-920. PMID: 29769284, DOI: 10.1534/genetics.118.300826
- * J-A Mäkelä, JJ Koskenniemi, HE Virtanen, J Toppari, Testis Development. *Endocr Rev.* 2019 Aug 1;40(4):857-905. PMID: 30590466, DOI: 10.1210/er.2018-00140 [Review]
- M Marcet-Ortega et al., p53 and TAp63 participate in the recombination-dependent pachytene arrest in mouse spermatocytes. *PLoS Genet.* 2017 Jun 15;13(6):e1006845. PMID: 28617799, DOI: 10.1371/journal.pgen.1006845
- F Marchetti, J Bishop, J Gingerich, AJ Wyrobek, Meiotic interstrand DNA damage escapes paternal repair and causes chromosomal aberrations in the zygote by maternal misrepair. *Sci Rep.* 2015 Jan 8;5:7689. PMID: 25567288, DOI: 10.1038/srep07689
- I Masliukaite et al., Establishing Reference Values for Age-Related Spermatogonial Quantity in Prepubertal Human Testes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Fertil Steril.* 2016 Dec;106(7):1652-1657.e2. PMID: 27717555, DOI: 10.1016/j.fertnstert.2016.09.002 [Review]

- FL Mendez, The Divergence of Neandertal and Modern Human Y Chromosomes. *Am J Hum Genet.* 2016 Apr 7;98(4):728-734. PMID: 27058445, DOI: 10.1016/j.ajhg.2016.02.023
- V Monesi, R Geremia, A D'Agostino, C Boitani, Biochemistry of Male Germ Cell Differentiation in Mammals: RNA Synthesis in Meiotic and Postmeiotic Cells. *Curr Top Dev Biol.* 1978;12:11-36. PMID: 352625, DOI: 10.1016/s0070-2153(08)60592-x [Review]
- D Mortimer, The functional anatomy of the human spermatozoon: relating ultrastructure and function. *Mol Hum Reprod.* 2018 Dec 1;24(12):567-592. PMID: 30215807, DOI: 10.1093/molehr/gay040
- *#31 B Muciaccia et al., Novel Stage Classification of Human Spermatogenesis Based on Acrosome Development. *Biol Reprod.* 2013 Sep 19;89(3):60. PMID: 23946533, DOI: 10.1095/biolreprod.113.111682
- JL Mueller et al., The Mouse X Chromosome Is Enriched for Multicopy Testis Genes Showing Postmeiotic Expression. *Nat Genet.* 2008 Jun;40(6):794-799. PMID: 18454149, DOI: 10.1038/ng.126
- K Mulryan et al., Reduced Vas Deferens Contraction and Male Infertility in Mice Lacking P2X1 Receptors. *Nature* 2000 Jan 6;403(6765):86-89. PMID: 10638758, DOI: 10.1038/47495
- E Mulugeta Achame, WM Baarends, J Gribnau, JA Grootegoed, Evaluating the Relationship Between Spermatogenic Silencing of the X Chromosome and Evolution of the Y Chromosome in Chimpanzee and Human. *PLoS One* 2010 Dec 14;5(12):e15598. PMID: 21179482, DOI: 10.1371/journal.pone.0015598
- A Noblanc et al., Epididymis Response Partly Compensates for Spermatozoa Oxidative Defects in snGPx4 and GPx5 Double Mutant Mice. *PLoS One* 2012;7(6):e38565. PMID: 22719900, DOI: 10.1371/journal.pone.0038565
- A Noblanc et al., DNA oxidative damage in mammalian spermatozoa: where and why is the male nucleus affected? *Free Radic Biol Med.* 2013 Dec;65:719-723. PMID: 23954469, DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.044
- MT Oetjens et al., Y-Chromosome Structural Diversity in the Bonobo and Chimpanzee Lineages. *Genome Biol Evol.* 2016 Aug 3;8(7):2231-2240. PMID: 27358426, DOI: 10.1093/gbe/evw150
- A-K Olsen et al., How Do Male Germ Cells Handle DNA Damage? *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005 Sep 1;207(2 Suppl):521-531. PMID: 16051290, DOI: 10.1016/j.taap.2005.01.060 [Review]
- J Onofre, Y Baert, K Faes, E Goossens, Cryopreservation of testicular tissue or testicular cell suspensions: a pivotal step in fertility preservation. *Hum Reprod Update* 2016 Nov;22(6):744-761. PMID: 27566839, DOI: 10.1093/humupd/dmw029 [Review]

- *⁶ MS Oud et al., Validation and application of a novel integrated genetic screening method to a cohort of 1,112 men with idiopathic azoospermia or severe oligozoospermia. *Hum Mutat.* 2017 Nov;38(11):1592-1605. PMID: 28801929, DOI: 10.1002/humu.23312 [Meta-Analysis]
- *⁶ MS Oud et al., A Systematic Review and Standardized Clinical Validity Assessment of Male Infertility Genes. *Hum Reprod.* 2019 May 1;34(5):932-941. PMID: 30865283, DOI: 10.1093/humrep/dez022
- *⁶ MS Oud, *Genetic causes of male infertility*. Proefschrift Radboud Universiteit Nijmegen, 26 november 2020. ISBN 9789464160215
- * MS Oud et al., A de novo paradigm for male infertility. *Nat Commun.* 2022 Jan 10;13(1):154. PMID: 35013161, DOI: 10.1038/s41467-021-27132-8
- DM Ozata et al., PIWI-interacting RNAs: small RNAs with big functions. *Nat Rev Genet.* 2019 Feb;20(2):89-108. PMID: 30446728, DOI: 10.1038/s41576-018-0073-3 [Review]
- S Ozturk, Telomerase Activity and Telomere Length in Male Germ Cells. *Biol Reprod.* 2015 Feb;92(2):53. PMID: 25568305, DOI: 10.1095/biolreprod.114.124008 [Review]
- S Pacheco et al., The ATM signaling cascade promotes recombination-dependent pachytene arrest in mouse spermatocytes. *PLoS Genet.* 2015 Mar 13;11(3):e1005017. PMID: 25768017, DOI: 10.1371/journal.pgen.1005017
- * S Di Persio et al., Spermatogonial Kinetics in Humans. *Development* 2017 Oct 1;144(19):3430-3439. PMID: 28827392, DOI: 10.1242/dev.150284
- A Riera-Escamilla et al., Sequencing of a 'Mouse Azoospermia' Gene Panel in Azoospermic Men: Identification of RNF212 and STAG3 Mutations as Novel Genetic Causes of Meiotic Arrest. *Hum Reprod.* 2019 Jun 4;34(6):978-988. PMID: 31125047, DOI: 10.1093/humrep/dez042
- DG de Rooij, P de Boer, Specific arrests of spermatogenesis in genetically modified and mutant mice. *Cytogenet Genome Res.* 2003;103(3-4):267-276. PMID: 15051947, DOI: 10.1159/000076812 [Review]
- K Rothkamm, M Löbrich, Evidence for a Lack of DNA Double-Strand Break Repair in Human Cells Exposed to Very Low X-Ray Doses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Apr 29;100(9):5057-5062. PMID: 12679524, DOI: 10.1073/pnas.0830918100
- V Roukos, T Misteli, The Biogenesis of Chromosome Translocations. *Nat Cell Biol.* 2014 Apr;16(4):293-300. PMID: 24691255, DOI: 10.1038/ncb2941 [Review]
- H Royo et al., Evidence that meiotic sex chromosome inactivation is essential for male fertility. *Curr Biol.* 2010 Dec 7;20(23):2117-2123. PMID: 21093264, DOI: 10.1016/j.cub.2010.11.010

- CE Rube et al., Protecting the Heritable Genome: DNA Damage Response Mechanisms in Spermatogonial Stem Cells. *DNA Repair (Amst)* 2011 Feb 7;10(2):159-168. PMID: 21123119, DOI: 10.1016/j.dnarep.2010.10.007
- A Salas-Huetos et al., The role of miRNAs in male human reproduction: a systematic review. *Andrology* 2020 Jan;8(1):7-26. PMID: 31578810, DOI: 10.1111/andr.12714
- D Santi, S De Vincentis, E Magnani, G Spaggiari, Impairment of sperm DNA methylation in male infertility: a meta-analytic study. *Andrology* 2017 Jul;5(4):695-703. PMID: 28718528, DOI: 10.1111/andr.12379 [Review]
- *#37 RB Scirano et al., The role of asynapsis in human spermatocyte failure. *Int J Androl.* 2012 Aug;35(4):541-549. PMID: 21977946, DOI: 10.1111/j.1365-2605.2011.01221.x [Case Reports]
- AG Searle, CV Beechey, Sperm-count, Egg-Fertilization and Dominant Lethality After X-irradiation of Mice. *Mutat Res.* 1974 Jan;22(1):63-72. PMID: 4842084, DOI: 10.1016/0027-5107(74)90009-8
- PB Selby, X-ray-induced Specific-Locus Mutation Rate in Newborn Male Mice. *Mutat Res.* 1973 Apr;18(1):63-75. PMID: 4572528, DOI: 10.1016/0027-5107(73)90021-3
- VB Seplyarskiy et al., TOPMed Population Genetics Working Group. Population sequencing data reveal a compendium of mutational processes in the human germ line. *Science* 2021 Aug 27;373(6558):1030-1035. PMID: 34385354, DOI: 10.1126/science.aba7408
- * R Sharma et al., Effects of Increased Paternal Age on Sperm Quality, Reproductive Outcome and Associated Epigenetic Risks to Offspring. *Reprod Biol Endocrinol.* 2015 Apr 19;13:35. PMID: 25928123, DOI: 10.1186/s12958-015-0028-x [Review]
- S Sharma et al., Spermatogonial Stem Cells: Updates From Specification to Clinical Relevance. *Hum Reprod Update* 2019 May 1;25(3):275-297. PMID: 30810745, DOI: 10.1093/humupd/dmz006 [Review]
- M Simard, C Laprise, SL Girard, Impact of Paternal Age at Conception on Human Health. *Clin Chem.* 2019 Jan;65(1):146-152. PMID: 30602478, DOI: 10.1373/clinchem.2018.294421 [Review]
- L Simon et al., Paternal Influence of Sperm DNA Integrity on Early Embryonic Development. *Hum Reprod.* 2014 Nov;29(11):2402-2412. PMID: 25205757, DOI: 10.1093/humrep/deu228
- * L Simon et al., A Systematic Review and Meta-Analysis to Determine the Effect of Sperm DNA Damage on *in vitro* Fertilization and Intracytoplasmic Sperm Injection Outcome. *Asian J Androl.* Jan-Feb 2017;19(1):80-90. PMID: 2734500, DOI: 10.4103/1008-682X.182822 [Review]
- * NE Skakkebaek et al., Male Reproductive Disorders and Fertility Trends: Influences of Environment and Genetic Susceptibility. *Physiol Rev.* 2016 Jan;96(1):55-97. PMID: 26582516, DOI: 10.1152/physrev.00017.2015 [Review]

- * NE Skakkebaek et al., Environmental factors in declining human fertility. *Nat Rev Endocrinol.* 2022 Mar;18(3):139-157. PMID: 34912078, DOI: 10.1038/s41574-021-00598-8 [Review]
- DL Stewart et al., A Second Experiment With Heterospermic Insemination in Cattle. *J Reprod Fertil.* 1974 Jan;36(1):107-116. PMID: 4809693, DOI: 10.1530/jrf.0.0360107
- RA Tegelenbosch, DG de Rooij, A Quantitative Study of Spermatogonial Multiplication and Stem Cell Renewal in the C3H/101 F1 Hybrid Mouse. *Mutat Res.* 1993 Dec;290(2):193-200. PMID: 7694110, DOI: 10.1016/0027-5107(93)90159-d
- C Templado, L Uroz, A Estop, New Insights on the Origin and Relevance of Aneuploidy in Human Spermatozoa. *Mol Hum Reprod.* 2013 Oct;19(10):634-643. PMID: 23720770, DOI: 10.1093/molehr/gat039 [Review]
- L Tiepolo, O Zuffardi, Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet.* 1976 Oct 28;34(2):119-124. PMID: 1002136, DOI: 10.1007/BF00278879
- *^5 H Tournaye, C Krausz, RD Oates, Novel Concepts in the Aetiology of Male Reproductive Impairment. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2017 Jul;5(7):544-553. PMID: 27395771, DOI: 10.1016/S2213-8587(16)30040-7 [Review]
- B Trombetta, F Cruciani, chromosome palindromes and gene conversion. *Hum Genet.* 2017 May;136(5):605-619. PMID: 28303348, DOI: 10.1007/s00439-017-1777-8 [Review]
- *#34,36 ^5,6 F Tüttelmann, C Ruckert, A Röpke, Disorders of Spermatogenesis: Perspectives for Novel Genetic Diagnostics After 20 Years of Unchanged Routine. *Med Genet.* 2018;30(1):12-20. PMID: 29527098, DOI: 10.1007/s11825-018-0181-7 [Review]
- M Uhlén et al., Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* 2015 Jan 23;347(6220):1260419. PMID: 25613900, DOI: 10.1126/science.1260419
- R Vegesna, M Tomaszewicz, P Medvedev, KD Makova, Dosage regulation, and variation in gene expression and copy number of human Y chromosome ampliconic genes. *PLoS Genet.* 2019 Sep 16;15(9):e1008369. PMID: 31525193, DOI: 10.1371/journal.pgen.1008369
- ER te Velde, JP Bonde, Misconceptions About Falling Sperm Counts and Fertility in Europe. *Asian J Androl.* 2013 Mar;15(2):195-198. PMID: 23202698, DOI: 10.1038/aja.2012.122 [Review]
- M de Vries et al., Human Male Meiotic Sex Chromosome Inactivation. *PLoS One* 2012;7(2):e31485. PMID: 22355370, DOI: 10.1371/journal.pone.0031485 [Comparative Study]
- M De Vries, L Ramos, Z Housein, P De Boer, Chromatin Remodelling Initiation During Human Spermiogenesis. *Biol Open* 2012 May 15;1(5):446-457. PMID: 23213436, DOI: 10.1242/bio.2012844

- H Wang et al., The Microbiome, an Important Factor That Is Easily Overlooked in Male Infertility. *Front Microbiol.* 2022 Mar 2;13:831272. PMID: 35308385, DOI: 10.3389/fmicb.2022.831272 [Review]
- PJ Wang, JR McCarrey, F Yang, DC Page, An Abundance of X-linked Genes Expressed in Spermatogonia. *Nat Genet.* 2001 Apr;27(4):422-426. PMID: 11279525, DOI: 10.1038/86927
- *#32 WS Ward, Organization of sperm DNA by the nuclear matrix. *Am J Clin Exp Urol.* 2018 Apr 1;6(2):87-92. eCollection 2018. PMID: 29666836, PMCID: PMC5902726 [Review]
- MC Wessels-Kaalen, R Bakker, P de Boer, Transmission of X-ray-induced Reciprocal Translocations in Normal Male Mice and in Male Mice With a Reduced Sperm Count Due to Translocation Homozygosity. *Mutat Res.* 1986 Nov;163(2):181-191. PMID: 3762559, DOI: 10.1016/0027-5107(86)90047-3
- *^5 *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen.* 6th edition. World Health Organization, 2021. ISBN 9789240030787
- M Wohl, P Gorwood, Paternal Ages Below or Above 35 Years Old Are Associated With a Different Risk of Schizophrenia in the Offspring. *Eur Psychiatry* 2007 Jan;22(1):22-26. PMID: 17142012, DOI: 10.1016/j.eurpsy.2006.08.007 [Meta-Analysis]
- MS Wosnitzer, M Goldstein, Obstructive azoospermia. *Urol Clin North Am.* 2014 Feb;41(1):83-95. PMID: 24286769, DOI: 10.1016/j.ucl.2013.08.013 [Review]
- MJ Xavier et al., Paternal impacts on development: identification of genomic regions vulnerable to oxidative DNA damage in human spermatozoa. *Hum Reprod.* 2019 Oct 2;34(10):1876-1890. PMID: 31593593, DOI: 10.1093/humrep/dez153
- EV Zubkova, M Wade, B Robaire, Changes in Spermatozoal Chromatin Packaging and Susceptibility to Oxidative Challenge During Aging. *Fertil Steril.* 2005 Oct;84 Suppl 2:1191-1198. PMID: 16210011, DOI: 10.1016/j.fertnstert.2005.04.044 [Comparative Study]

Hoofdstuk 13

- A Ahmadi, SC Ng, Fertilizing Ability of DNA-damaged Spermatozoa. *J Exp Zool.* 1999 Nov 1;284(6):696-704. PMID: 10531556, DOI: 10.1002/(sici)1097-010x(19991101)284:6<696::aid-jez11>3.0.co;2-e
- * MA Ali et al., Odorant and Taste Receptors in Sperm Chemotaxis and Cryopreservation: Roles and Implications in Sperm Capacitation, Motility and Fertility. *Genes (Basel)* 2021 Mar 27;12(4):488. PMID: 33801624, DOI: 10.3390/genes12040488 [Review]

- MJ Ashwood-Smith, RG Edwards, DNA Repair by Oocytes. *Mol Hum Reprod.* 1996 Jan;2(1):46-51. PMID: 9238657, DOI: 10.1093/molehr/2.1.46 [Review]
- T Avidor-Reiss, M Mazur, EL Fishman, P Sindhwani, The Role of Sperm Centrioles in Human Reproduction - The Known and the Unknown. *Front Cell Dev Biol.* 2019 Oct 1;7:188. PMID: 31632960, DOI: 10.3389/fcell.2019.00188 [Review]
- H Bakker, JH Wallinga, RD Politiek, Reproduction and body weight of mice after long-term selection for large litter size. *Journal of Animal Science* 1978;46(6):1572-1580. DOI: 10.2527/jas1978.4661572x
- P de Boer, FA van der Hoeven, JA Chardon, The Production, Morphology, Karyotypes and Transport of Spermatozoa From Tertiary Trisomic Mice and the Consequences for Egg Fertilization. *J Reprod Fertil.* 1976 Nov;48(2):249-256. PMID: 994096, DOI: 10.1530/jrf.0.0480249
- ML Boerjan, P de Boer, First cell cycle of zygotes of the mouse derived from oocytes aged post-ovulation in vivo and fertilized in vivo. *Mol Reprod Dev.* 1990 Feb;25(2):155-163. PMID: 2178641, DOI: 10.1002/mrd.1080250208
- * H Bolton et al., Mouse Model of Chromosome Mosaicism Reveals Lineage-Specific Depletion of Aneuploid Cells and Normal Developmental Potential. *Nat Commun.* 2016 Mar 29;7:11165. PMID: 27021558, DOI: 10.1038/ncomms11165
- * S Bontekoe et al., Low Oxygen Concentrations for Embryo Culture in Assisted Reproductive Technologies. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012 Jul 11;(7):CD008950. PMID: 22786519, DOI: 10.1002/14651858.CD008950.pub2 [Review]
- E Casser et al., Totipotency Segregates Between the Sister Blastomeres of Two-Cell Stage Mouse Embryos. *Sci Rep.* 2017 Aug 15;7(1):8299. PMID: 28811525, DOI: 10.1038/s41598-017-08266-6
- * E Casser, S Israel, M Boiani, Multiplying Embryos: Experimental Monozygotic Polyembryony in Mammals and Its Uses. *Int J Dev Biol.* 2019;63(3-4-5):143-155. PMID: 31058293, DOI: 10.1387/ijdb.190016mb [Review]
- * AW Chan et al., Clonal Propagation of Primate Offspring by Embryo Splitting. *Science* 2000 Jan 14;287(5451):317-319. PMID: 10634789, DOI: 10.1126/science.287.5451.317
- J Cohen, DC McNaughton, Spermatozoa: The Probable Selection of a Small Population by the Genital Tract of the Female Rabbit. *J Reprod Fertil.* 1974 Aug;39(2):297-310. PMID: 4415860, DOI: 10.1530/jrf.0.0390297
- JF Crow, The Origins, Patterns and Implications of Human Spontaneous Mutation. *Nat Rev Genet.* 2000 Oct;1(1):40-47. PMID: 11262873, DOI: 10.1038/35049558 [Review]

- A Derijck et al., Motile Human Normozoospermic and Oligozoospermic Semen Samples Show a Difference in Double-Strand DNA Break Incidence. *Hum Reprod.* 2007 Sep;22(9):2368-2376. PMID: 17580297, DOI: 10.1093/humrep/dem166
- * A Derijck et al., DNA double-strand break repair in parental chromatin of mouse zygotes, the first cell cycle as an origin of de novo mutation. *Hum Mol Genet.* 2008 Jul 1;17(13):1922-1937. PMID: 18353795, DOI: 10.1093/hmg/ddn090
- A Destouni et al., Zygotes Segregate Entire Parental Genomes in Distinct Blastomere Lineages Causing Cleavage-Stage Chimerism and Mixoploidy. *Genome Res.* 2016 May;26(5):567-578. PMID: 27197242, DOI: 10.1101/gr.200527.115
- * AF Dixon, Copulatory and Postcopulatory Sexual Selection in Primates. *Folia Primatol (Basel)* 2018;89(3-4):258-286. PMID: 29804108, DOI: 10.1159/000488105 [Review]
- R Dumollard et al., Mitochondrial function and redox state in mammalian embryos. *Semin Cell Dev Biol.* 2009 May;20(3):346-353. PMID: 19530278, DOI: 10.1016/j.semcdb.2008.12.013 [Review]
- DB Dunson, DD Baird, AJ Wilcox, CR Weinberg, Day-specific Probabilities of Clinical Pregnancy Based on Two Studies With Imperfect Measures of Ovulation. *Hum Reprod.* 1999 Jul;14(7):1835-1839. PMID: 10402400, DOI: 10.1093/humrep/14.7.1835 [Comparative Study]
- *#41 DB Dunson, B Colombo, DD Baird, Changes With Age in the Level and Duration of Fertility in the Menstrual Cycle. *Hum Reprod.* 2002 May;17(5):1399-1403. PMID: 11980771, DOI: 10.1093/humrep/17.5.1399 [Comparative Study]
- RG Edwards, Maturation in Vitro of Mouse, Sheep, Cow, Pig, Rhesus Monkey and Human Ovarian Oocytes. *Nature* 1965 Oct 23;208(5008):349-351. PMID: 4957259, DOI: 10.1038/208349a0
- * M Van Eetvelde et al., The Importance of the Periconception Period: Immediate Effects in Cattle Breeding and in Assisted Reproduction Such as Artificial Insemination and Embryo Transfer. *Adv Exp Med Biol.* 2017;1014:41-68, PMID: 28864984, DOI: 10.1007/978-3-319-62414-3_3 [Review]
- MAMM Ferraz et al., An Oviduct-On-A-Chip Provides an Enhanced in Vitro Environment for Zygote Genome Reprogramming. *Nat Commun.* 2018 Nov 22;9(1):4934. PMID: 30467383, DOI: 10.1038/s41467-018-07119-8
- NL First, RE Short, JB Peters, FW Stratman, Transport of spermatozoa in estrual and luteal sows. *Journal of Animal Science* 1965;24:917 [Abstract]
- B Fischer, W Künzel, J Kleinstein, H Gips, Oxygen tension in follicular fluid falls with follicle maturation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1992 Jan 9;43(1):39-43. PMID: 1737607, DOI: 10.1016/0028-2243(92)90241-p

- *#39 EL Fishman et al., A novel atypical sperm centriole is functional during human fertilization. *Nat Commun.* 2018 Jun 7;9(1):2210. PMID: 29880810, DOI: 10.1038/s41467-018-04678-8
- * R De La Fuente, C Baumann, MM Viveiros, ATRX Contributes to Epigenetic Asymmetry and Silencing of Major Satellite Transcripts in the Maternal Genome of the Mouse Embryo. *Development* 2015 May 15;142(10):1806-1817. PMID: 25926359, DOI: 10.1242/dev.118927
- LV Gatica et al., Picomolar Gradients of Progesterone Select Functional Human Sperm Even in Subfertile Samples. *Mol Hum Reprod.* 2013 Sep;19(9):559-569. PMID: 23729411, DOI: 10.1093/molehr/gat037
- WM Generoso, KT Cain, M Krishna, SW Huff, Genetic Lesions Induced by Chemicals in Spermatozoa and Spermatids of Mice Are Repaired in the Egg. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979 Jan;76(1):435-437. PMID: 284360, DOI: 10.1073/pnas.76.1.435
- * JG Hall, Twinning. *Lancet* 2003 Aug 30;362(9385):735-743. PMID: 12957099, DOI: 10.1016/S0140-6736(03)14237-7 [Review]
- GW van der Heijden et al., Asymmetry in histone H3 variants and lysine methylation between paternal and maternal chromatin of the early mouse zygote. *Mech Dev.* 2005 Sep;122(9):1008-1022. PMID: 15922569, DOI: 10.1016/j.mod.2005.04.009
- GW van der Heijden et al., Parental Origin of Chromatin in Human Monopronuclear Zygotes Revealed by Asymmetric Histone Methylation Patterns, Differs Between IVF and ICSI. *Mol Reprod Dev.* 2009 Jan;76(1):101-108. PMID: 18481364, DOI: 10.1002/mrd.20933
- *#39 G Hernández-Silva, M Chirinos, Proteins From Male and Female Reproductive Tracts Involved in Sperm Function Regulation. *Zygote* 2019 Feb;27(1):5-16. PMID: 30621800, DOI: 10.1017/S096719941800062X [Review]
- RH Hunter, The Effects of Delayed Insemination on Fertilization and Early Cleavage in the Pig. *J Reprod Fertil.* 1967 Feb;13(1):133-147. PMID: 6066768, DOI: 10.1530/jrf.0.0130133
- P Hyttel, T Greve, H Callesen, Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. *J Reprod Fertil Suppl.* 1989;38:35-47. PMID: 2677348 [Review]
- * K Jacobs et al., Mitotic Spindle Disruption in Human Preimplantation Embryos Activates the Spindle Assembly Checkpoint but Not Apoptosis Until Day 5 of Development. *Mol Hum Reprod.* 2017 May 1;23(5):321-329. PMID: 28159965, DOI: 10.1093/molehr/gax007
- * DL Keefe, Telomeres and genomic instability during early development. *Eur J Med Genet.* 2020 Feb;63(2):103638. PMID: 30862510, DOI: 10.1016/j.ejmg.2019.03.002 [Review]

- KE Koehler et al., Sex-specific Differences in Meiotic Chromosome Segregation Revealed by Dicentric Bridge Resolution in Mice. *Genetics* 2002 Nov;162(3):1367-1379. PMID: 12454080, DOI: 10.1093/genetics/162.3.1367
- * S Kölle et al., Ciliary Transport, Gamete Interaction, and Effects of the Early Embryo in the Oviduct: Ex Vivo Analyses Using a New Digital Videomicroscopic System in the Cow. *Biol Reprod.* 2009 Aug;81(2):267-274. PMID: 19299315, DOI: 10.1095/biolreprod.108.073874
- * S Ladstätter, K Tachibana-Konwalski, A Surveillance Mechanism Ensures Repair of DNA Lesions During Zygotic Reprogramming. *Cell* 2016 Dec 15;167(7):1774-1787.e13. PMID: 27916276, DOI: 10.1016/j.cell.2016.11.009
- JD Lee, Y Kamiguchi, R Yanagimachi, Analysis of Chromosome Constitution of Human Spermatozoa With Normal and Aberrant Head Morphologies After Injection Into Mouse Oocytes. *Hum Reprod.* 1996 Sep;11(9):1942-1946. PMID: 8921068, DOI: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a019521
- * HJ Leese, Metabolism of the Preimplantation Embryo: 40 Years On. *Reproduction* 2012 Apr;143(4):417-427. PMID: 22408180, DOI: 10.1530/REP-11-0484 [Review]
- * T Lord, RJ Aitken, Fertilization Stimulates 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine Repair and Antioxidant Activity to Prevent Mutagenesis in the Embryo. *Dev Biol.* 2015 Oct 1;406(1):1-13. PMID: 26234752, DOI: 10.1016/j.ydbio.2015.07.024
- * X Lu, Z Gao, D Qin, L Li, A Maternal Functional Module in the Mammalian Oocyte-To-Embryo Transition. *Trends Mol Med.* 2017 Nov;23(11):1014-1023. PMID: 28993030, DOI: 10.1016/j.molmed.2017.09.004 [Review]
- K Ly et al, Telomere length in early childhood is associated with sex and ethnicity. *Sci Rep.* 2019 Jul 17;9(1):10359. PMID: 31316106, DOI: 10.1038/s41598-019-46338-x [Comparative Study]
- K Madan, Natural human chimeras: A review. *Eur J Med Genet.* 2020 Sep;63(9):103971. PMID: 32565253, DOI: 10.1016/j.ejmg.2020.103971 [Review]
- * V Maillo et al., Oviductal Response to Gametes and Early Embryos in Mammals. *Reproduction* 2016 Oct;152(4):R127-R141. PMID: 27512123, DOI: 10.1530/REP-16-0120 [Review]
- * LA McGraw, SS Suarez, MF Wolfner, On a matter of seminal importance. *Bioessays* 2015 Feb;37(2):142-147. PMID: 25379987, DOI: 10.1002/bies.201400117
- *#43 MA Molè, A Weberling, M Zernicka-Goetz, Comparative analysis of human and mouse development: From zygote to pre-gastrulation. *Curr Top Dev Biol.* 2020;136:113-138. PMID: 31959285, DOI: 10.1016/bs.ctdb.2019.10.002 [Review]
- Y Muro, M Okabe, Mechanisms of fertilization--a view from the study of gene-manipulated mice. *J Androl.* May-Jun 2011;32(3):218-225. PMID: 20966425, DOI: 10.2164/jandrol.110.010900 [Review]

- * KYB Ng et al., In vivo oxygen, temperature and pH dynamics in the female reproductive tract and their importance in human conception: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2018 Jan 1;24(1):15-34. PMID: 29077897, DOI: 10.1093/humupd/dmx028 [Review]
- M Okabe, Sperm-egg interaction and fertilization: past, present, and future. *Biol Reprod.* 2018 Jul 1;99(1):134-146. PMID: 29462236, DOI: 10.1093/biolre/iory028 [Review]
- SB Olsen, RE Magenis, Preferential paternal origin of de novo structural chromosome rearrangements. In: *The cytogenetics of mammalian autosomal rearrangements* 583-599. Alan Liss Inc, 1988
- JP Ozil, D Huneau, Activation of Rabbit Oocytes: The Impact of the Ca²⁺ Signal Regime on Development. *Development* 2001 Mar;128(6):917-928. PMID: 11222146, DOI: 10.1242/dev.128.6.917
- * J-P Ozil, T Sainte-Beuve, B Banrezes, [Mg²⁺]/[Ca²⁺] Determines Ca²⁺ Response at Fertilization: Tuning of Adult Phenotype? *Reproduction* 2017 Nov;154(5):675-693. PMID: 28851827, DOI: 10.1530/REP-16-0057
- GD Palermo, LT Colombero, Z Rosenwaks, The human sperm centrosome is responsible for normal syngamy and early embryonic development. *Rev Reprod.* 1997 Jan;2(1):19-27. PMID: 9414462, DOI: 10.1530/ror.0.0020019 [Review]
- *#42 L Papale, A Fiorentino, M Montag, G Tomas, The zygote. *Hum Reprod.* 2012 Aug;27 Suppl 1:i22-49. PMID: 22811310, DOI: 10.1093/humrep/des205
- * HV Ramírez-Gómez, I Tuval, A Guerrero, A Darszon, Analysis of sperm chemotaxis. *Methods Cell Biol.* 2019;151:473-486. PMID: 30948027, DOI: 10.1016/bs.mcb.2018.12.002 [Review]
- JP Rigby, The persistence of spermatozoa at the uterotubal junction (varken). *J Reprod Fert.* 1966;11:153
- JB Roelofs, FJCM van Eerdenburg, NM Soede, B Kemp, Various behavioral signs of estrous and their relationship with time of ovulation in dairy cattle. *Theriogenology* 2005 Mar 15;63(5):1366-1377. PMID: 15725444, DOI: 10.1016/j.theriogenology.2004.07.009
- K Rothkamm, M Löbrich, Evidence for a Lack of DNA Double-Strand Break Repair in Human Cells Exposed to Very Low X-Ray Doses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Apr 29;100(9):5057-5062. PMID: 12679524, DOI: 10.1073/pnas.0830918100
- M Santa Rocca, C Foresta, A Ferlin, Telomere length: lights and shadows on their role in human reproduction. *Biol Reprod.* 2019 Feb 1;100(2):305-317. PMID: 30277496, DOI: 10.1093/biolre/iory208
- *#39 AH Sathananthan et al., The sperm centriole: its inheritance, replication and perpetuation in early human embryos. *Hum Reprod.* 1996 Feb;11(2):345-356. PMID: 8671223, DOI: 10.1093/humrep/11.2.345

- AG Searle et al., The Induction of Translocations in Mouse Spermatozoa. I. Kinetics of Dose Response With Acute X-Irradiation. *Mutat Res.* 1974 Feb;22(2):157-174. PMID: 4842823, DOI: 10.1016/0027-5107(74)90096-7 [Comparative Study]
- Q-Q Sha et al., Dynamics and clinical relevance of maternal mRNA clearance during the oocyte-to-embryo transition in humans. *Nat Commun.* 2020 Oct 1;11(1):4917. PMID: 33004802, DOI: 10.1038/s41467-020-18680-6
- SS Suarez, AA Pacey, Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum Reprod Update* Jan-Feb 2006;12(1):23-37. PMID: 16272225, DOI: 10.1093/humupd/dmi047 [Review]
- * SS Suarez, Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. *Int J Dev Biol.* 2008;52(5-6):455-462. PMID: 18649258, DOI: 10.1387/ijdb.072527ss [Review]
- * SS Suarez, Mammalian sperm interactions with the female reproductive tract. *Cell Tissue Res.* 2016 Jan;363(1):185-194. PMID: 26183721, DOI: 10.1007/s00441-015-2244-2 [Review]
- ZB Tong et al., Mater, a Maternal Effect Gene Required for Early Embryonic Development in Mice. *Nat Genet.* 2000 Nov;26(3):267-268. PMID: 11062459, DOI: 10.1038/81547
- T Trapphoff et al., Postovulatory Aging Affects Dynamics of mRNA, Expression and Localization of Maternal Effect Proteins, Spindle Integrity and Pericentromeric Proteins in Mouse Oocytes. *Hum Reprod.* 2016 Jan;31(1):133-149. PMID: 26577303, DOI: 10.1093/humrep/dev279
- H Van de Velde et al., The Four Blastomeres of a 4-cell Stage Human Embryo Are Able to Develop Individually Into Blastocysts With Inner Cell Mass and Trophectoderm. *Hum Reprod.* 2008 Aug;23(8):1742-1747. PMID: 18503052, DOI: 10.1093/humrep/den190
- *#40 AJ Wilcox, D Dunson, DD Baird, The timing of the "fertile window" in the menstrual cycle: day specific estimates from a prospective study. *BMJ.* 2000 Nov 18;321(7271):1259-1262. PMID: 11082086, DOI: 10.1136/bmj.321.7271.1259
- *#43 CC Wong et al, Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nat Biotechnol.* 2010 Oct;28(10):1115-1121. PMID: 20890283, DOI: 10.1038/nbt.1686
- WE Wright et al., Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet.* 1996;18(2):173-179. PMID: 8934879, DOI: 10.1002/(SICI)1520-6408(1996)18:2<173::AID-DVG10>3.0.CO;2-3
- YQ Yuan et al., Influence of Oxygen Tension on Apoptosis and Hatching in Bovine Embryos Cultured in Vitro. *Theriogenology* 2003 Apr 1;59(7):1585-1596. PMID: 12559463, DOI: 10.1016/s0093-691x(02)01204-9

MV Zaragoza et al., Parental origin and phenotype of triploidy in spontaneous abortions: predominance of diandry and association with the partial hydatidiform mole. *Am J Hum Genet.* 2000 Jun;66(6):1807-1820. PMID: 10801385, DOI: 10.1086/302951

*#39 MT Zenzes, R Bielecki, RF Casper, SP Leibo, Effects of chilling to 0 degrees C on the morphology of meiotic spindles in human metaphase II oocytes. *Fertil Steril.* 2001 Apr;75(4):769-777. PMID: 11287033, DOI: 10.1016/s0015-0282(00)01800-8 [Comparative Study]

K Zhang, GW Smith, Maternal Control of Early Embryogenesis in Mammals. *Reprod Fertil Dev.* 2015 Jul;27(6):880-896. PMID: 25695370, DOI: 10.1071/RD14441 [Review]

Hoofdstuk 14

R Allio, S Donega, N Galtier, B Nabholz, Large Variation in the Ratio of Mitochondrial to Nuclear Mutation Rate across Animals: Implications for Genetic Diversity and the Use of Mitochondrial DNA as a Molecular Marker. *Mol Biol Evol.* 2017 Nov 1;34(11):2762-2772. PMID: 28981721, DOI: 10.1093/molbev/msx197

* LM Cree et al., A Reduction of Mitochondrial DNA Molecules During Embryogenesis Explains the Rapid Segregation of Genotypes. *Nat Genet.* 2008 Feb;40(2):249-254. PMID: 18223651, DOI: <https://doi.org/10.1038/ng.2007.63>

* VI Floros et al., Segregation of Mitochondrial DNA Heteroplasmy Through a Developmental Genetic Bottleneck in Human Embryos. *Nat Cell Biol.* 2018 Feb;20(2):144-151. PMID: 29335530, DOI: 10.1038/s41556-017-0017-8

C Freyer et al., Variation in Germline mtDNA Heteroplasmy Is Determined Prenatally but Modified During Subsequent Transmission. *Nat Genet.* 2012 Nov;44(11):1282-1285. PMID: 23042113, DOI: 10.1038/ng.2427

MW Gray, Lynn Margulis and the endosymbiont hypothesis: 50 years later. *Mol Biol Cell.* 2017 May 15;28(10):1285-1287. PMID: 28495966, DOI: 10.1091/mbc.E16-07-0509 [Review]

M Li et al., Transmission of human mtDNA heteroplasmy in the Genome of the Netherlands families: support for a variable-size bottleneck. *Genome Res.* 2016 Apr;26(4):417-426. PMID: 26916109, DOI: 10.1101/gr.203216.115

J van der Reest, G Nardini Cecchino, MC Haigis, P Kordowitzki, Mitochondria: Their relevance during oocyte ageing. *Ageing Res Rev.* 2021 Sep;70:101378. PMID: 34091076, DOI: 10.1016/j.arr.2021.101378 [Review]

- * W-H Song, J William, O Ballard, Y-J Yi, P Sutovsky, Regulation of Mitochondrial Genome Inheritance by Autophagy and Ubiquitin-Proteasome System: Implications for Health, Fitness, and Fertility. *Biomed Res Int.* 2014;2014:981867. PMID: 25028670, DOI: 10.1155/2014/981867 [Review]
- * JB Stewart, PF Chinnery, The Dynamics of Mitochondrial DNA Heteroplasmy: Implications for Human Health and Disease. *Nat Rev Genet.* 2015 Sep;16(9):530-542. PMID: 26281784, DOI: 10.1038/nrg3966 [Review]
- * H Zhang, SP Burr, PF Chinnery, The Mitochondrial DNA Genetic Bottleneck: Inheritance and Beyond. *Essays Biochem.* 2018 Jul 20;62(3):225-234. PMID: 29880721, DOI: 10.1042/EBC20170096 [Review]

Hoofdstuk 15

- MD Anway, AS Cupp, M Uzumcu, MK Skinner, Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science* 2005 Jun 3;308(5727):1466-1469. PMID: 15933200, DOI: 10.1126/science.1108190
- DJ Barker, Fetal Origins of Coronary Heart Disease. *BMJ.* 1995 Jul 15;311(6998):171-174. PMID: 7613432, DOI: 10.1136/bmj.311.6998.171 [Review]
- JT Bell, T Spector, DNA methylation studies using twins: what are they telling us? *D.Genome Biol.* 2012 Oct 18;13(10):172. PMID: 23078798, DOI: 10.1186/gb-2012-13-10-172
- ME Blewitt et al., Dynamic reprogramming of DNA methylation at an epigenetically sensitive allele in mice. *PLoS Genet.* 2006 Apr;2(4):e49. PMID: 16604157, DOI: 10.1371/journal.pgen.0020049
- M Bosse et al. (red), *Cahier epigenetica*. Den Haag: Biowetenschappen en Maatschappij, 2022/2023
- B Chen et al., Maternal inheritance of glucose intolerance via oocyte TET3 insufficiency. *Nature* 2022 May;605(7911):761-766. PMID: 35585240, DOI: 10.1038/s41586-022-04756-4
- * Q Chen, W Yan, E Duan, Epigenetic Inheritance of Acquired Traits Through Sperm RNAs and Sperm RNA Modifications. *Nat Rev Genet.* 2016 Dec;17(12):733-743. PMID: 27694809, DOI: 10.1038/nrg.2016.106 [Review]
 - * HJ Clarke, K-F Vieux, Epigenetic Inheritance Through the Female Germ-Line: The Known, the Unknown, and the Possible. *Semin Cell Dev Biol.* 2015 Jul;43:106-116. PMID: 26183189, DOI: 10.1016/j.semcdb.2015.07.003 [Review]
- L Daxinger, E Whitelaw, Understanding Transgenerational Epigenetic Inheritance via the Gametes in Mammals. *Nat Rev Genet.* 2012 Jan 31;13(3):153-162. PMID: 22290458, DOI: 10.1038/nrg3188 [Review]

- BG Dias, KJ Ressler, Parental Olfactory Experience Influences Behavior and Neural Structure in Subsequent Generations. *Nat Neurosci.* 2014 Jan;17(1):89-96. PMID: 24292232, DOI: 10.1038/nn.3594
- J van Dongen et al., Epigenome-Wide Association Study of Aggressive Behavior. *Twin Res Hum Genet.* 2015 Dec;18(6):686-698. PMID: 26508088, DOI: 10.1017/thg.2015.74
- YE Dubrova et al., Transgenerational Mutation by Radiation. *Nature* 2000 May 4;405(6782):37. PMID: 10811208, DOI: 10.1038/35011135
- S Erkek et al., Molecular determinants of nucleosome retention at CpG-rich sequences in mouse spermatozoa. *Nat Struct Mol Biol.* 2013 Jul;20(7):868-875. PMID: 23770822, DOI: 10.1038/nsmb.2599
- K Gapp et al., Implication of Sperm RNAs in Transgenerational Inheritance of the Effects of Early Trauma in Mice. *Nat Neurosci.* 2014 May;17(5):667-669. PMID: 24728267, DOI: 10.1038/nn.3695
- PA Ginno et al., A genome-scale map of DNA methylation turnover identifies site-specific dependencies of DNMT and TET activity. *Nat Commun.* 2020 May 29;11(1):2680. PMID: 32471981, DOI: 10.1038/s41467-020-16354-x
- R Goyal, R Reinhardt, A Jeltsch, Accuracy of DNA methylation pattern preservation by the Dnmt1 methyltransferase. *Nucleic Acids Res.* 2006 Feb 25;34(4):1182-1188. PMID: 16500889, DOI: 10.1093/nar/gkl002
- E Heard, RA Martienssen, Transgenerational epigenetic inheritance: myths and mechanisms. *Cell* 2014 Mar 27;157(1):95-109. PMID: 24679529, DOI: 10.1016/j.cell.2014.02.045 [Review]
- BT Heijmans et al., Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Nov 4;105(44):17046-17049. PMID: 18955703, DOI: 10.1073/pnas.0806560105
- I Hernando-Herraez, R Garcia-Perez, AJ Sharp, T Marques-Bonet, DNA Methylation: Insights Into Human Evolution. *PLoS Genet.* 2015 Dec 10;11(12):e1005661. PMID: 26658498, DOI: 10.1371/journal.pgen.1005661 [Review]
- * https://nl.wikipedia.org/wiki/Jean-Baptiste_de_Lamarck
- * https://en.wikipedia.org/wiki/Jean-Baptiste_Lamarck
- [https://en.wikipedia.org/wiki/Modern_synthesis_\(20th_century\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Modern_synthesis_(20th_century))
- * https://en.wikipedia.org/wiki/Trofim_Lysenko
- RF Hillary et al., Genome and epigenome wide studies of neurological protein biomarkers in the Lothian Birth Cohort 1936. *Nat Commun.* 2019 Jul 18;10(1):3160. PMID: 31320639, DOI: 10.1038/s41467-019-11177-x

- ML Holland et al., Early-life Nutrition Modulates the Epigenetic State of Specific rDNA Genetic Variants in Mice. *Science* 2016 Jul 29;353(6298):495-498. PMID: 27386920, DOI: 10.1126/science.aaf7040
- M Hua et al., Identification of small non-coding RNAs as sperm quality biomarkers for in vitro fertilization. *Cell Discov.* 2019 Apr 9;5:20. PMID: 30992999, DOI: 10.1038/s41421-019-0087-9
- * E Jablonka, The Evolutionary Implications of Epigenetic Inheritance Interface *Focus* 2017 Oct 6;7(5):20160135. PMID: 28839916, DOI: 10.1098/rsfs.2016.0135 [Review]
- *#45 RL Jirtle, MK Skinner, Environmental Epigenomics and Disease Susceptibility. *Nat Rev Genet.* 2007 Apr;8(4):253-262. PMID: 17363974, DOI: 10.1038/nrg2045 [Review]
- N Katzmarski et al., Transmission of trained immunity and heterologous resistance to infections across generations. *Nat Immunol.* 2021;22:1382-1390. PMID: 34663978, DOI: 10.1038/s41590-021-01052-7
- A Kazachenka et al., Identification, Characterization, and Heritability of Murine Metastable Epialleles: Implications for Non-genetic Inheritance. *Cell* 2018 Nov 15;175(5):1259-1271.e13. PMID: 30454646, DOI: 10.1016/j.cell.2018.09.043
- NJ Kessler, RA Waterland, AM Prentice, MJ Silver, Establishment of environmentally sensitive DNA methylation states in the very early human embryo. *Sci Adv.* 2018 Jul 11;4(7):eaat2624. PMID: 30009262, DOI: 10.1126/sciadv.aat2624
- SE King, MK Skinner, Epigenetic Transgenerational Inheritance of Obesity Susceptibility. *Trends Endocrinol Metab.* 2020 Jul;31(7):478-494. PMID: 32521235, DOI: 10.1016/j.tem.2020.02.009 [Review]
- D Kubsad et al., Assessment of Glyphosate Induced Epigenetic Transgenerational Inheritance of Pathologies and Sperm Epimutations: Generational Toxicology. *Sci Rep.* 2019 Apr 23;9(1):6372. PMID: 31011160, DOI: 10.1038/s41598-019-42860-0
- K Kvaløy, CM Page, T L Holmen, Epigenome-wide methylation differences in a group of lean and obese women - A HUNT Study. *Sci Rep.* 2018 Nov 5;8(1):16330. PMID: 30397228, DOI: 10.1038/s41598-018-34003-8
- * L Ly, D Chan, JM Trasler, Developmental Windows of Susceptibility for Epigenetic Inheritance Through the Male Germline. *Semin Cell Dev Biol.* 2015 Jul;43:96-105. PMID:26265561, DOI: 10.1016/j.semcdb.2015.07.006 [Review]
- KB Michels et al., Recommendations for the design and analysis of epigenome-wide association studies. *Nat Methods* 2013 Oct;10(10):949-955. PMID: 24076989, DOI: 10.1038/nmeth.2632 [Review]

- * EA Miska, AC Ferguson-Smith, Transgenerational Inheritance: Models and Mechanisms of non-DNA Sequence-Based Inheritance. *Science* 2016 Oct 7;354(6308):59-63. PMID: 27846492, DOI: 10.1126/science.aaf4945 [Review]
- * D Nätt et al., Human sperm displays rapid responses to diet. *PLoS Biol.* 2019 Dec 26;17(12):e3000559. PMID: 31877125, DOI: 10.1371/journal.pbio.3000559
- RC Painter et al., Transgenerational effects of prenatal exposure to the Dutch famine on neonatal adiposity and health in later life. *BJOG* 2008 Sep;115(10):1243-1249. PMID: 18715409, DOI: 10.1111/j.1471-0528.2008.01822.x
- ME Pembrey et al., Sex-specific, Male-Line Transgenerational Responses in Humans. *Eur J Hum Genet.* 2006 Feb;14(2):159-166. PMID: 16391557, DOI: 10.1038/sj.ejhg.5201538 [Comparative Study]
- * M Pembrey et al., Human Transgenerational Responses to Early-Life Experience: Potential Impact on Development, Health and Biomedical Research. *J Med Genet.* 2014 Sep;51(9):563-572. PMID: 25062846, DOI: 10.1136/jmedgenet-2014-102577 [Review]
- OJ Rando, KJ Verstrepen, Timescales of Genetic and Epigenetic Inheritance. *Cell* 2007 Feb 23;128(4):655-668. PMID: 17320504, DOI: 10.1016/j.cell.2007.01.023 [Review]
- M Rassoulzadegan et al., RNA-mediated Non-Mendelian Inheritance of an Epigenetic Change in the Mouse. *Nature* 2006 May 25;441(7092):469-474. PMID: 16724059, DOI: 10.1038/nature04674
- *#44 VM Sales, AC Ferguson-Smith, M-E Patti, Epigenetic Mechanisms of Transmission of Metabolic Disease across Generations. *Cell Metab.* 2017 Mar 7;25(3):559-571. PMID: 28273478, DOI: 10.1016/j.cmet.2017.02.016 [Review]
- A Salas-Huetos et al., The role of miRNAs in male human reproduction: a systematic review. *Andrology* 2020 Jan;8(1):7-26. PMID: 31578810, DOI: 10.1111/andr.12714
- * D Schübeler, Function and Information Content of DNA Methylation. *Nature* 2015 Jan 15;517(7534):321-326. PMID: 25592537, DOI: 10.1038/nature14192 [Review]
- U Sharma et al., Biogenesis and Function of tRNA Fragments During Sperm Maturation and Fertilization in Mammals. *Science* 2016 Jan 22;351(6271):391-396. PMID: 26721685, DOI: 10.1126/science.aad6780
- K Siklenka et al., Disruption of Histone Methylation in Developing Sperm Impairs Offspring Health Transgenerationally. *Science* 2015 Nov 6;350(6261):aab2006. PMID: 26449473, DOI: 10.1126/science.aab2006

- * AL Teh et al, The Effect of Genotype and in Utero Environment on Interindividual Variation in Neonate DNA Methylation. *Genome Res.* 2014 Jul;24(7):1064-1074. PMID: 24709820, DOI: 10.1101/gr.171439.113
- * EW Tobi et al., DNA Methylation Signatures Link Prenatal Famine Exposure to Growth and Metabolism. *Nat Commun.* 2014 Nov 26;5:5592. PMID: 25424739, DOI: 10.1038/ncomms6592
- S Tyebji, AJ Hannan, CJ Tonkin, Pathogenic Infection in Male Mice Changes Sperm Small RNA Profiles and Transgenerationally Alters Offspring Behavior. *Cell Rep.* 2020 Apr 28;31(4):107573. PMID: 32348768, DOI: 10.1016/j.celrep.2020.107573
- D Vågerö, PR Pinger, V Aronsson, GJ van den Berg, Paternal grandfather's access to food predicts all-cause and cancer mortality in grandsons. *Nat Commun.* 2018 Dec 11;9(1):5124. PMID: 30538239, DOI: 10.1038/s41467-018-07617-9
- MVE Veenendaal et al., Transgenerational effects of prenatal exposure to the 1944-45 Dutch famine. *BJOG* 2013 Apr;120(5):548-553. PMID: 23346894, DOI: 10.1111/1471-0528.12136
- Y Wang et al., Sperm microRNAs confer depression susceptibility to offspring. *Sci Adv.* 2021 Feb 10;7(7):eabd7605. PMID: 33568480, DOI: 10.1126/sciadv.abd7605
- E Whitelaw, DI Martin, Retrotransposons as Epigenetic Mediators of Phenotypic Variation in Mammals. *Nat Genet.* 2001 Apr;27(4):361-365. PMID: 11279513, DOI: 10.1038/86850
- Z Xiong et al., EWAS Data Hub: a resource of DNA methylation array data and metadata. *Nucleic Acids Res.* 2020 Jan 8;48(D1):D890-D895. PMID: 31584095, DOI: 10.1093/nar/gkz840
- Y Zhang et al., Dnmt2 mediates intergenerational transmission of paternally acquired metabolic disorders through sperm small non-coding RNAs. *Nat Cell Biol.* 2018 May;20(5):535-540. PMID: 29695786, DOI: 10.1038/s41556-018-0087-2
- * Y Zhang et al., Sperm RNA Code Programmes the Metabolic Health of Offspring. *Nat Rev Endocrinol.* 2019 Aug;15(8):489-498. PMID: 31235802, DOI: 10.1038/s41574-019-0226-2 [Review]

Hoofdstuk 16

- KI Aston et al., Aberrant Sperm DNA Methylation Predicts Male Fertility Status and Embryo Quality. *Fertil Steril.* 2015 Dec;104(6):1388-97.e1-5. PMID: 26361204, DOI: 10.1016/j.fertnstert.2015.08.019
- EB Baart et al., Preimplantation Genetic Screening Reveals a High Incidence of Aneuploidy and Mosaicism in Embryos From Young Women Undergoing IVF. *Hum Reprod.* 2006 Jan;21(1):223-233. PMID: 16155075, DOI: 10.1093/humrep/dei291

- H Bakker, JH Wallinga, RD Politiek, Reproduction and body weight of mice after long term selection for large litter size. *Journal of Animal Science* 1978; 46(6):1572-1580. DOI: <https://doi.org/10.2527/jas1978.4661572x>
- J Barberet et al., Can Novel Early Non-Invasive Biomarkers of Embryo Quality Be Identified With Time-Lapse Imaging to Predict Live Birth? *Hum Reprod.* 2019 Aug 1;34(8):1439-1449. PMID: 31287145, DOI: 10.1093/humrep/dez085
- MA Bellis, K Hughes, S Hughes, JR Ashton, Measuring paternal discrepancy and its public health consequences. *J Epidemiol Community Health* 2005 Sep;59(9):749-754. PMID: 16100312, DOI: 10.1136/jech.2005.036517 [Review]
- P de Boer, M de Vries, Are There Benefits From Having Two Genetic Fathers? *Biol Reprod.* 2011 Mar;84(3):409-411. PMID: 21178174, DOI: 10.1095/biolreprod.110.090472 [Comment]
- * H Bolton et al., Mouse Model of Chromosome Mosaicism Reveals Lineage-Specific Depletion of Aneuploid Cells and Normal Developmental Potential. *Nat Commun.* 2016 Mar 29;7:11165. PMID: 27021558, DOI: 10.1038/ncomms11165
- * M Bonduelle et al., Prenatal testing in ICSI pregnancies: incidence of chromosomal anomalies in 1586 karyotypes and relation to sperm parameters. *Hum Reprod.* 2002 Oct;17(10):2600-2614. PMID: 12351536, DOI: 10.1093/humrep/17.10.2600
- S Bontekoe et al., Low Oxygen Concentrations for Embryo Culture in Assisted Reproductive Technologies. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012 Jul 11;(7):CD008950. PMID: 22786519, DOI: 10.1002/14651858.CD008950.pub2 [Review]
- PS Burgoyne, A Y-chromosomal effect on blastocyst cell number in mice. *Development* 1993 Jan;117(1):341-345. PMID: 8223257, DOI: 10.1242/dev.117.1.341
- A Capalbo et al., On the reproductive capabilities of aneuploid human preimplantation embryos. *Am J Hum Genet.* 2022 Sep 1;109(9):1572-1581. PMID: 36055209, DOI: 10.1016/j.ajhg.2022.07.009 [Review]
- SR Catford, RI McLachlan, MK O'Bryan, JL Halliday, Long-term follow-up of intra-cytoplasmic sperm injection-conceived offspring compared with in vitro fertilization-conceived offspring: a systematic review of health outcomes beyond the neonatal period. *Andrology* 2017 Jul;5(4):610-621. PMID: 28632930, DOI: 10.1111/andr.12369 [Review]
- SR Catford, RI McLachlan, MK O'Bryan, JL Halliday, Long-term follow-up of ICSI-conceived offspring compared with spontaneously conceived offspring: a systematic review of health outcomes beyond the neonatal period. *Andrology* 2018 Sep;6(5):635-653. PMID: 30296010, DOI: 10.1111/andr.12526

- M Ceelen et al., Cardiometabolic Differences in Children Born After in Vitro Fertilization: Follow-Up Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 May;93(5):1682-1688. PMID: 18285409, DOI: 10.1210/jc.2007-2432
- M Ceelen et al., Growth During Infancy and Early Childhood in Relation to Blood Pressure and Body Fat Measures at Age 8-18 Years of IVF Children and Spontaneously Conceived Controls Born to Subfertile Parents. *Hum Reprod.* 2009 Nov;24(11):2788-2795. PMID: 19648588, DOI: 10.1093/humrep/dep273
- * S Choufani et al., Impact of Assisted Reproduction, Infertility, Sex and Paternal Factors on the Placental DNA Methylation. *Hum Mol Genet.* 2019 Feb 1;28(3):372-385. PMID: 30239726, DOI: 10.1093/hmg/ddy321
- * S Cornelisse, Preimplantation genetic testing for aneuploidies (abnormal number of chromosomes) in in vitro fertilisation. *Cochrane Database Syst Rev.* 2020 Sep 8;9:CD005291. PMID: 32898291, DOI: 10.1002/14651858.CD005291.pub3 [Meta-Analysis]
- G Corona et al., Sperm recovery and ICSI outcomes in men with non-obstructive azoospermia: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2019 Nov 5;25(6):733-757. PMID: 31665451, DOI: 10.1093/humupd/dmz028 [Meta-Analysis]
- G Coticchio et al., Focused time-lapse analysis reveals novel aspects of human fertilization and suggests new parameters of embryo viability. *Hum Reprod.* 2018 Jan 1;33(1):23-31. PMID: 29149327, DOI: 10.1093/humrep/dex344
- DR Cox, SA Smith, LB Epstein, CJ Epstein, Mouse Trisomy 16 as an Animal Model of Human Trisomy 21 (Down Syndrome): Production of Viable Trisomy 16 Diploid Mouse Chimeras. *Dev Biol.* 1984 Feb;101(2):416-424. PMID: 6229437, DOI: 10.1016/0012-1606(84)90156-8
- J Deng et al., The impact of culture conditions on blastocyst formation and aneuploidy rates: a comparison between single-step and sequential media in a large academic practice. *J Assist Reprod Genet.* 2020 Jan;37(1):161-169. PMID: 31950455, DOI: 10.1007/s10815-019-01621-8 [Comparative Study]
- J Donckers, JLH Evers, JA Land, The long-term outcome of 946 consecutive couples visiting a fertility clinic in 2001-2003. *Fertil Steril.* 2011 Jul;96(1):160-164. PMID: 21550038, DOI: 10.1016/j.fertnstert.2011.04.019 [Comparative Study]
- AJCM van Dongen et al., Reasons for dropping out from a waiting list for in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2010 Oct;94(5):1713-1716. PMID: 19896662, DOI: 10.1016/j.fertnstert.2009.08.066

* J van Echten-Arends et al., Chromosomal Mosaicism in Human Preimplantation Embryos: A Systematic Review. *Hum Reprod Update* Sep-Oct 2011;17(5):620-627. PMID: 21531753, DOI: 10.1093/humupd/dmr014 [Review]

RG Edwards, BD Bavister, PC Steptoe, Early Stages of Fertilization in Vitro of Human Oocytes Matured in Vitro. *Nature* 1969 Feb 15;221(5181):632-635. PMID: 4886881, DOI: 10.1038/221632a0

RG Edwards, PC Steptoe, J M Purdy, Fertilization and Cleavage in Vitro of Preovulator Human Oocytes. *Nature* 1970 Sep 26;227(5265):1307-1309. PMID: 4916973, DOI: 10.1038/2271307a0

CJ Epstein et al., Production of Viable Adult Trisomy 17 Reversible Diploid Mouse Chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982 Jul;79(14):4376-4380. PMID: 6956868, DOI: 10.1073/pnas.79.14.4376

F Federici et al., Round Spermatid Injection Rescues Female Lethality of a Paternally Inherited Xist Deletion in Mouse. *PLoS Genet*. 2016 Oct 7;12(10):e1006358. PMID: 27716834, DOI: 10.1371/journal.pgen.1006358

* JM Franasiak et al., The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15,169 consecutive trophoctoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening. *Fertil Steril*. 2014 Mar;101(3):656-663.e1. PMID: 24355045, DOI: 10.1016/j.fertnstert.2013.11.004 [Review]

D Glujovsky, D Blake, C Farquhar, A Bardach, Cleavage Stage Versus Blastocyst Stage Embryo Transfer in Assisted Reproductive Technology. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012 Jul 11;(7):CD002118. PMID: 22786480, DOI: 10.1002/14651858.CD002118.pub4 [Review]

* D Glujovsky et al., Cleavage Stage Versus Blastocyst Stage Embryo Transfer in Assisted Reproductive Technology. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016 Jun 30;(6):CD002118. PMID: 27357126, DOI: 10.1002/14651858.CD002118.pub5 [Review]

* K Hayashi, In Vitro Reconstitution of Germ Cell development. *Biol Reprod*. 2019 Sep 1;101(3):567-578. PMID: 31295346, DOI: 10.1093/biolre/iox111

AT Hertig, J Rock, EC Adams, A Description of 34 Human Ova Within the First 17 Days of Development. *Am J Anat*. 1956 May;98(3):435-493. PMID: 13362122, DOI: 10.1002/aja.1000980306

* O Hikabe et al., Reconstitution in Vitro of the Entire Cycle of the Mouse Female Germ Line. *Nature* 2016 Nov 10;539(7628):299-303. PMID: 27750280, DOI: 10.1038/nature20104

<https://www.degynaecoloog.nl/nuttige-informatie/ivf-resultaten/>

<https://www.lumc.nl/over-het-lumc/nieuws/2019/Februari/1857025/?setlanguage=English&setcountry=en> Dr Susana Chuva de Sousa Lopes and Prof. Haico van Attikum have each received 1.5 million euros from the Netherlands Organisation for Scientific Research (NWO) for their work on sex change in cells and DNA replication.

<https://www.proteinatlas.org/humanproteome/tissue/>

<https://psycnet.apa.org/record/2014-10209-013>

https://strathprints.strath.ac.uk/72556/1/Jones_etal_TCS_2018_Ovulation_sex_hormones_and_womens_mating_psychology.pdf

<https://zorgevaluatienederland.nl/evaluations/selectimo>

Y Ishikura et al., In vitro reconstitution of the whole male germ-cell development from mouse pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2021 Sep 1;S1934-5909(21)00342-8. PMID: 34496297, DOI: 10.1016/j.stem.2021.08.005

* K Jacobs et al., Mitotic Spindle Disruption in Human Preimplantation Embryos Activates the Spindle Assembly Checkpoint but Not Apoptosis Until Day 5 of Development. *Mol Hum Reprod.* 2017 May 1;23(5):321-329. PMID: 28159965, DOI: 10.1093/molehr/gax007

TG Jenkins et al., Age-associated Sperm DNA Methylation Alterations: Possible Implications in Offspring Disease Susceptibility. *PLoS Genet.* 2014 Jul 10;10(7):e1004458. PMID: 25010591, DOI: 10.1371/journal.pgen.1004458

* DL Keefe, Telomeres and Genomic Instability During Early Development. *Eur J Med Genet.* 2020 Feb;63(2):103638. PMID: 30862510, DOI: 10.1016/j.ejmg.2019.03.002 [Review]

* SHM Kleijkers et al., Influence of Embryo Culture Medium (G5 and HTF) on Pregnancy and Perinatal Outcome After IVF: A Multicenter RCT. *Hum Reprod.* 2016 Oct;31(10):2219-2230. PMID: 27554441, DOI: 10.1093/humrep/dew156 [Randomized Controlled Trial]

* CB Lambalk, M Van Wely, K Kirkegaard, C De Geyter, Ethics Beyond Ethics. *Hum Reprod.* 2020 Jan 1;35(1):1-2. PMID: 31886856, DOI: 10.1093/humrep/dez250

T Lappalainen, JM Greally, Associating Cellular Epigenetic Models With Human Phenotypes. *Nat Rev Genet.* 2017 Jul;18(7):441-451. PMID: 28555657, DOI: 10.1038/nrg.2017.32 [Review]

S Laurentino, J Borgmann, J Gromoll, On the Origin of Sperm Epigenetic Heterogeneity. *Reproduction* 2016 May;151(5):R71-8. PMID: 26884419, DOI: 10.1530/REP-15-0436 [Review]

M Lek et al., Analysis of Protein-Coding Genetic Variation in 60,706 Humans. *Nature* 2016 Aug 18;536(7616):285-291. PMID: 27535533, DOI: 10.1038/nature19057

* R van Lunsen, E Laan, *Seks!* Amsterdam: Prometheus, 2017. ISBN 9789044631043

APA van Montfoort et al., Assisted Reproduction Treatment and Epigenetic Inheritance. *Hum Reprod Update* Mar-Apr 2012;18(2):171-197. PMID: 22267841, DOI: 10.1093/humupd/dmr047 [Review]

* APA Van Montfoort et al., Reduced oxygen concentration during human IVF culture improves embryo utilization and cumulative pregnancy rates per cycle. *Hum Reprod Open* 2020 Jan 22;2020(1):hoz036. PMID: 31989044, DOI: 10.1093/hropen/hoz036

- HD Morgan et al., The Culture of Zygotes to the Blastocyst Stage Changes the Postnatal Expression of an Epigenetically Labile Allele, Agouti Viable Yellow, in Mice. *Biol Reprod.* 2008 Oct;79(4):618-623. PMID: 18562706, DOI: 10.1095/biolreprod.108.068213
- CL Mulder et al., Comparison of DNA Methylation Patterns of Parentally Imprinted Genes in Placenta Derived From IVF Conceptions in Two Different Culture Media. *Hum Reprod.* 2020 Mar 27;35(3):516-528. PMID: 32222762, DOI: 10.1093/humrep/deaa004
- S Munné et al., Detailed Investigation Into the Cytogenetic Constitution and Pregnancy Outcome of Replacing Mosaic Blastocysts Detected With the Use of High-Resolution Next-Generation Sequencing. *Fertil Steril.* 2017 Jul;108(1):62-71.e8. PMID: 28579407, DOI: 10.1016/j.fertnstert.2017.05.002
- * S Munné et al., Clinical outcomes after the transfer of blastocysts characterized as mosaic by high resolution Next Generation Sequencing- further insights. *Eur J Med Genet.* 2020 Feb;63(2):103741. PMID: 31445143, DOI: 10.1016/j.ejmg.2019.103741
- * S Munné et al., First PGT-A Using Human in Vivo Blastocysts Recovered by Uterine Lavage: Comparison With Matched IVF Embryo controls. *Hum Reprod.* 2020 Jan 1;35(1):70-80. PMID: 31886877, DOI: 10.1093/humrep/dez242
- * KK Niakan et al., Human Pre-Implantation Embryo Development. *Development* 2012 Mar;139(5):829-841. PMID: 22318624, DOI: 10.1242/dev.060426 [Review]
- A Noblanc et al., Epididymis Response Partly Compensates for Spermatozoa Oxidative Defects in snGPx4 and GPx5 Double Mutant Mice. *PLoS One* 2012;7(6):e38565. PMID: 22719900, DOI: 10.1371/journal.pone.0038565
- * B Novakovic et al., Assisted Reproductive Technologies Are Associated With Limited Epigenetic Variation at Birth That Largely Resolves by Adulthood. *Nat Commun.* 2019 Sep 2;10(1):3922. PMID: 31477727, DOI: 10.1038/s41467-019-11929-9
- SB Olsen, RE Magenis, Preferential paternal origin of de novo structural chromosome arrangements. In: *The Cytogenetics of Mammalian Autosomal Rearrangements* 583-599. Alan Liss Inc, 1988
- G Palermo, H Joris, P Devroey, AC Van Steirteghem, Pregnancies After Intracytoplasmic Injection of Single Spermatozoon Into an Oocyte. *Lancet* 1992 Jul 4;340(8810):17-18. PMID: 1351601, DOI: 10.1016/0140-6736(92)92425-f
- M Popovic et al., Chromosomal Mosaicism in Human Blastocysts: The Ultimate Challenge of Preimplantation Genetic Testing? *Hum Reprod.* 2018 Jul 1;33(7):1342-1354. PMID: 29796631, DOI: 10.1093/humrep/dey106

- W Pryll, Kohabitionstermin und kindergeschlecht. Muenchener Medizinische Wochenschrift 1916;45:1579-1582.
- J Rock, AT Hertig, The Human Conceptus During the First Two Weeks of Gestation. Am J Obstet Gynecol. 1948 Jan;55(1):6-17. PMID: 18918949, DOI: 10.1016/0002-9378(48)90152-5
- * M Saitou, K Hayashi, Mammalian in vitro gametogenesis. Science 2021 Oct;374(6563):eaaz6830. PMID: 34591639, DOI: 10.1126/science.aaz6830 [Review]
- C van Schaik, K Michel, *De waarheid over Eva*. Uitgeverij Balans, 2021. ISBN: 9789463821377 (ebook) 9789463821100 (paperback)
- K Servick, "Unsettled Questions Trail IVF's Success." Science 2014;345(6198):744-746. <https://www.jstor.org/stable/24917156>
- * L Simon et al., A systematic review and meta-analysis to determine the effect of sperm DNA damage on in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection outcome. Asian J Androl. 2017 Jan-Feb;19(1):80-90. PMID: 27345006, DOI: 10.4103/1008-682X.182822
- * Q-Q Sha et al., Dynamics and clinical relevance of maternal mRNA clearance during the oocyte-to-embryo transition in humans. Nat Commun. 2020 Oct 1;11(1):4917. PMID: 33004802, DOI: 10.1038/s41467-020-18680-6
- RM Smits et al., De novo mutations in children born after medical assisted reproduction. Hum Reprod 2022 May 30;37(6):1360-1369. PMID: 35413117, DOI: 10.1093/humrep/deac068 [Observational Study]
- A Van Steirteghem, M Bonduelle, P Devroey, I Liebaers, Follow-up of Children Born After ICSI. Hum Reprod Update Mar-Apr 2002;8(2):111-116. PMID: 12099626, DOI: 10.1093/humupd/8.2.111 [Review]
- TAE Stout, Clinical Application of in Vitro Embryo Production in the Horse. J Equine Vet Sci. 2020 Jun;89:103011. PMID: 32563449, DOI: 10.1016/j.jevs.2020.103011
- MC Summers, JD Biggers, Chemically Defined Media and the Culture of Mammalian Preimplantation Embryos: Historical Perspective and Current Issues. Hum Reprod Update Nov-Dec 2003;9(6):557-582. PMID: 14714592, DOI: 10.1093/humupd/dmg039 [Review]
- PR Supramaniam et al., Secondary sex ratio in assisted reproduction: an analysis of 1 376 454 treatment cycles performed in the UK. Hum Reprod Open 2019 Oct 5;2019(4):hoz020. PMID: 31598568, DOI: 10.1093/hropen/hoz020
- A Tanaka et al., Fourteen babies born after round spermatid injection into human oocytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Nov 24;112(47):14629-14634. PMID: 26575628, DOI: 10.1073/pnas.1517466112

- A Tanaka et al., Ninety babies born after round spermatid injection into oocytes: survey of their development from fertilization to 2 years of age. *Fertil Steril.* 2018 Aug;110(3):443-451. PMID: 30098696, DOI: 10.1016/j.fertnstert.2018.04.033 [Clinical Trial]
- *#46 A Taylor, ABC of subfertility: extent of the problem. *BMJ.* 2003 Aug 23;327(7412):434-436. PMID: 12933733, DOI: 10.1136/bmj.327.7412.434 [Review]
- O Tšuiiko et al., Genome Stability of Bovine in Vivo-Conceived Cleavage-Stage Embryos Is Higher Compared to in Vitro-Produced Embryos. *Hum Reprod.* 2017 Nov 1;32(11):2348-2357. PMID: 29040498, DOI: 10.1093/humrep/dex286
- * E Vanneste et al., Chromosome Instability Is Common in Human Cleavage-Stage Embryos. *Nat Med.* 2009 May;15(5):577-583. PMID: 19396175, DOI: 10.1038/nm.1924
- G Verheyen, E Crabbé, H Joris, A Van Steirteghem, Simple and Reliable Identification of the Human Round Spermatid by Inverted Phase-Contrast Microscopy. *Hum Reprod.* 1998 Jun;13(6):1570-1577. PMID: 9688394, DOI: 10.1093/humrep/13.6.1570
- V Vloeberghs et al., How successful is TESE-ICSI in couples with non-obstructive azoospermia? *Hum Reprod.* 2015 Aug;30(8):1790-1796. PMID: 26082482, DOI: 10.1093/humrep/dev139
- LLM Welling, DA Puts, Female adaptations to ovulation. In: VA Weekes-Shackelford, TK Shackelford (Eds), *Evolutionary psychology. Evolutionary perspectives on human sexual psychology and behavior.* Springer, 2014: 243-260. DOI: 10.1007/978-1-4939-0314-6_13
- * AJ Wilcox et al., On the Frequency of Intercourse Around Ovulation: Evidence for Biological Influences. *Hum Reprod.* 2004 Jul;19(7):1539-1543. PMID: 15190016, DOI: 10.1093/humrep/deh305
- J Yan et al., Live Birth with or without Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidy. *N Engl J Med.* 2021 Nov 25;385(22):2047-2058. PMID: 34818479, DOI: 10.1056/NEJMoa2103613 [Randomized Controlled Trial]
- M Yang et al., Depletion of aneuploid cells in human embryos and gastruloids. *Nat Cell Biol.* 2021 Apr;23(4):314-321. PMID: 33837289, DOI: 10.1038/s41556-021-00660-7
- * M Zamani Esteki et al., In Vitro Fertilization Does Not Increase the Incidence of De Novo Copy Number Alterations in Fetal and Placental Lineages. *Nat Med.* 2019 Nov;25(11):1699-1705. PMID: 31686035, DOI: 10.1038/s41591-019-0620-2
- * J Zhao, Y Yan, X Huang, Y Li, Do the Children Born After Assisted Reproductive Technology Have an Increased Risk of Birth Defects? A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2020 Jan;33(2):322-333. PMID: 30189770, DOI: 10.1080/14767058.2018.1488168 [Meta-Analysis]

Hoofdstuk 17

- AB Adewoye, SJ Lindsay, YE Dubrova, ME Hurles, The genome-wide effects of ionizing radiation on mutation induction in the mammalian germline. *Nat Commun.* 2015 Mar 26;6:6684. PMID: 25809527, DOI: 10.1038/ncomms7684
- F Åsenius, AF Danson, SJ Marzi, DNA methylation in human sperm: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2020 Nov 1;26(6):841-873. PMID: 32790874, DOI: 10.1093/humupd/dmaa025
- SA Banihani, Effect of Ibuprofen on Semen Quality. *Andrologia* 2019 May;51(4):e13228. PMID: 30623461, DOI: 10.1111/and.13228
- * MA Beal, CL Yauk, F Marchetti, From sperm to offspring: Assessing the heritable genetic consequences of paternal smoking and potential public health impacts. *Mutat Res.* 2017 Jul;773:26-50. PMID: 28927533, DOI: 10.1016/j.mrrev.2017.04.001
- * LA Beeder, MK Samplaski, Effect of Antidepressant Medications on Semen Parameters and Male Fertility. *Int J Urol.* 2020 Jan;27(1):39-46. PMID: 31542895, DOI: 10.1111/iju.14111 [Review]
- L Björndahl, U Kvist, Human Sperm Chromatin Stabilization: A Proposed Model Including Zinc Bridges. *Mol Hum Reprod.* 2010 Jan;16(1):23-29. PMID: 19933313, DOI: 10.1093/molehr/gap099 [Review]
- * L Björndahl, U Kvist, A Model for the Importance of Zinc in the Dynamics of Human Sperm Chromatin Stabilization After Ejaculation in Relation to Sperm DNA Vulnerability. *Syst Biol Reprod Med.* 2011 Feb;57(1-2):86-92. PMID: 21204594, DOI: 10.3109/19396368.2010.516306 [Review]
- * R Buiters, "Blijf van mijn gifspuit af", *Vogels* 2020;2:37-39
- BM Cattanaach, AJ Crocker, Modified Genetic Response to X-irradiation of Mouse Spermatogonial Stem Cells Surviving Treatment With TEM. *Mutat Res.* 1980 Apr;70(2):211-220. PMID: 7374659, DOI: 10.1016/0027-5107(80)90161-x
- * JR Drevet, RJ Aitken, Oxidative Damage to Sperm DNA: Attack and Defense. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1166:107-117. PMID: 31301049, DOI: 10.1007/978-3-030-21664-1_7
- S van den Driesche et al., Experimentally induced testicular dysgenesis syndrome originates in the masculinization programming window. *JCI Insight* 2017 Mar 23;2(6):e91204. PMID: 28352662, DOI: 10.1172/jci.insight.91204
- M van Duursen, interview. NRC 4 maart 2019
- * M Van Eetvelde et al., The Importance of the Periconception Period: Immediate Effects in Cattle Breeding and in Assisted Reproduction Such as Artificial Insemination and Embryo Transfer. *Adv Exp Med Biol.* 2017;1014:41-68. PMID: 28864984, DOI: 10.1007/978-3-319-62414-3_3 [Review]

* Fertility and Sterility, Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, Smoking and Infertility: A Committee Opinion. *Fertil Steril.* 2018 Sep;110(4):611-618. PMID: 30196946, DOI: 10.1016/j.fertnstert.2018.06.016 [Review]

* P Gharagozloo et al., A Novel Antioxidant Formulation Designed to Treat Male Infertility Associated With Oxidative Stress: Promising Preclinical Evidence From Animal Models. *Hum Reprod.* 2016 Feb;31(2):252-262. PMID: 26732620, DOI: 10.1093/humrep/dev302

R Hauser et al., Male reproductive disorders, diseases, and costs of exposure to endocrine-disrupting chemicals in the European Union. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015 Apr;100(4):1267-1277. PMID: 25742517, DOI: 10.1210/jc.2014-4325

M Holtgrewe et al., Multisite de novo mutations in human offspring after paternal exposure to ionizing radiation. *Sci Rep.* 2018 Oct 2;8(1):14611. PMID: 30279461, DOI: 10.1038/s41598-018-33066-x

<https://www.farmacotherapeutischkompas.nl>

<https://www.lareb.nl>

<https://samennatuurijkzwangerworden.nl/frank-comhaire/>

* <https://www.fertilix.com/men>

J Jurewicz, E Dziewirska, M Radwan, W Hanke, Air Pollution From Natural and Anthropogenic Sources and Male Fertility. *Reprod Biol Endocrinol.* 2018 Dec 23;16(1):109. PMID: 30579357, DOI: 10.1186/s12958-018-0430-2 [Review]

K Jurkowska, EM Kratz, E Sawicka, A Piwowar, The Impact of Metalloestrogens on the Physiology of Male Reproductive Health as a Current Problem of the XXI Century. *J Physiol Pharmacol.* 2019 Jun;70(3):337-355. PMID: 31539881, DOI: 10.26402/jpp.2019.3.02 [Review]

KK Kesari, A Agarwal, R Henkel, Radiations and Male Fertility. *Reprod Biol Endocrinol.* 2018 Dec 9;16(1):118. PMID: 30445985, DOI: 10.1186/s12958-018-0431-1 [Review]

* MD Kessler et al., De novo mutations across 1,465 diverse genomes reveal mutational insights and reductions in the Amish founder population. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020 Feb 4;117(5):2560-2569. PMID: 31964835, DOI: 10.1073/pnas.1902766117

MP Little, DT Goodhead, BA Bridges, SD Bouffler, Evidence relevant to untargeted and transgenerational effects in the offspring of irradiated parents. *Mutat Res.* Jul-Sep 2013;753(1):50-67. PMID: 23648355, DOI: 10.1016/j.mrrev.2013.04.001 [Review]

* SE Martenies, MJ Perry, Environmental and occupational pesticide exposure and human sperm parameters: a systematic review. *Toxicology* 2013 May 10;307:66-73. PMID: 23438386, DOI: 10.1016/j.tox.2013.02.005 [Review]

- V Otasevic et al., Reactive Oxygen, Nitrogen, and Sulfur Species in Human Male Fertility. A Crossroad of Cellular Signaling and Pathology. *Biofactors* 2020 Mar;46(2):206-219. PMID: 31185138, DOI: 10.1002/biof.1535 [Review]
- * KS Payne, DJ Mazur, JM Hotaling, AW Pastuszak, Cannabis and Male Fertility: A Systematic Review. *J Urol.* 2019 Oct;202(4):674-681. PMID: 30916627, DOI: 10.1097/JU.0000000000000248 [Review]
- * V Pergialiotis et al., Diabetes Mellitus and Functional Sperm Characteristics: A Meta-Analysis of Observational Studies. *J Diabetes Complications* 2016 Aug;30(6):1167-1176. PMID: 27107613, DOI: 10.1016/j.jdiacomp.2016.04.002 [Review]
- CH Ramlau-Hansen et al., Is prenatal exposure to tobacco smoking a cause of poor semen quality? A follow-up study. *Am J Epidemiol.* 2007 Jun 15;165(12):1372-1379. PMID: 17369608, DOI: 10.1093/aje/kwm032
- * E Ricci et al., Semen Quality and Alcohol Intake: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Reprod Biomed Online* 2017 Jan;34(1):38-47. PMID: 28029592, DOI: 10.1016/j.rbmo.2016.09.012 [Review]
- A Salas-Huetos et al., The Effect of Nutrients and Dietary Supplements on Sperm Quality Parameters: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials. *Adv Nutr.* 2018 Nov 1;9(6):833-848. PMID: 30462179, DOI: 10.1093/advances/nmy057 [Meta-Analysis]
- N Sermondade et al., BMI in relation to sperm count: an updated systematic review and collaborative meta-analysis. *Hum Reprod Update.* May-Jun 2013;19(3):221-231. PMID: 23242914, DOI: 10.1093/humupd/dms050 [Review]
- U Sharma et al., Biogenesis and function of tRNA fragments during sperm maturation and fertilization in mammals. *Science* 2016 Jan 22;351(6271):391-396. PMID: 26721685, DOI: 10.1126/science.aad6780
- * NE Skakkebaek et al., Environmental factors in declining human fertility. *Nat Rev Endocrinol.* 2022;18:139-157. PMID: 34912078, DOI: 10.1038/s41574-021-00598-8 [Review]
- M Yeager et al., Lack of transgenerational effects of ionizing radiation exposure from the Chernobyl accident. *Science* 2021 Apr 22;eabg2365. PMID: 33888597, DOI: 10.1126/science.abg2365
- D Zamkowska, A Karwacka, J Jurewicz, M Radwan, Environmental exposure to non-persistent endocrine disrupting chemicals and semen quality: An overview of the current epidemiological evidence. *Int J Occup Med Environ Health* 2018 Jul 4;31(4):377-414. PMID: 30160090, DOI: 10.13075/ijomeh.1896.01195 [Review]
- * Y Zhang et al., Sperm RNA Code Programmes the Metabolic Health of Offspring. *Nat Rev Endocrinol.* 2019 Aug;15(8):489-498. PMID: 31235802, DOI: 10.1038/s41574-019-0226-2 [Review]

Hoofdstuk 18

- R Acuna-Hidalgo, JA Veltman, A Hoischen, New insights into the generation and role of de novo mutations in health and disease. *Genome Biol.* 2016 Nov 28;17(1):241. PMID: 27894357, DOI: 10.1186/s13059-016-1110-1 [Review]
- SE Antonarakis, Carrier screening for recessive disorders. *Nat Rev Genet.* 2019 Sep;20(9):549-561. PMID: 31142809, DOI: 10.1038/s41576-019-0134-2 [Review]
- * F Belva et al., Semen Quality of Young Adult ICSI Offspring: The First Results. *Hum Reprod.* 2016 Dec;31(12):2811-2820. PMID: 27707840, DOI: 10.1093/humrep/dew245
- JR Belyeu et al., De novo structural mutation rates and gamete-of-origin biases revealed through genome sequencing of 2,396 families. *Am J Hum Genet.* 2021 Apr 1;108(4):597-607. PMID: 33675682, DOI: 10.1016/j.ajhg.2021.02.012
- HG Brunner, Preconceptual screening for the entire population? Utrecht: De Snoo symposium, 2019
- * M Claussnitzer et al., A brief history of human disease genetics. *Nature* 2020 Jan;577(7789):179-189. PMID: 31915397, DOI: 10.1038/s41586-019-1879-7 [Review]
- Deciphering Developmental Disorders Study, Prevalence and architecture of de novo mutations in developmental disorders. *Nature* 2017 Feb 23;542(7642):433-438. PMID: 28135719, DOI: 10.1038/nature21062 [Meta-Analysis]
- H Fridman et al., The landscape of autosomal-recessive pathogenic variants in European populations reveals phenotype-specific effects. *Am J Hum Genet.* 2021 Apr 1;108(4):608-619. PMID: 33740458, DOI: 10.1016/j.ajhg.2021.03.004
- C Gilissen et al., Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability. *Nature* 2014 Jul 17;511(7509):344-347. PMID: 24896178, DOI: 10.1038/nature13394
- M de Groot-van der Mooren et al., Does non-invasive prenatal testing affect the livebirth prevalence of Down syndrome in the Netherlands? A population-based register study. *Prenat Diagn.* 2021 Sep;41(10):1351-1359. PMID: 34176145, DOI: 10.1002/pd.6003
- Heritable human genome editing, a consensus study report. International Commission on the Clinical Use of Human Germline Genome Editing, National Academy of Medicine, National Academy of Sciences, the Royal Society (UK), sept 2020
- RF Hoekstra, *Darwin voorbij?* Rede bij het afscheid als hoogleraar genetica aan Wageningen University, 18 februari 2010. ISBN 9789085855774

* <https://www.23andme.com/en-int/>

<https://www.economist.com/science-and-technology/2019/11/07/modern-genetics-will-improve-health-and-usher-in-designer-children>

<https://nl.wikipedia.org/wiki/Transhumanisme>

<https://www.lifeview.com/>

<https://www.umcg.nl/NL/UMCG/Afdelingen/Genetica/patienten/erfelijkheid/dragerschapstest/Paginas/default.aspx>

* <https://www.nap.edu/catalog/25665/heritable-human-genome-editing>, over de veiligheid van overerfbare humane genom editing

J Kaplanis et al., Evidence for 28 genetic disorders discovered by combining healthcare and research data. *Nature* 2020 Oct;586(7831):757-762. PMID: 33057194, DOI: 10.1038/s41586-020-2832-5

* E Karavani et al., Screening Human Embryos for Polygenic Traits Has Limited Utility. *Cell* 2019 Nov 27;179(6):1424-1435.e8. PMID: 31761530, DOI: 10.1016/j.cell.2019.10.033

* H Ledford, CRISPR gene editing in human embryos wreaks chromosomal mayhem. Three studies showing large DNA deletions and reshuffling heighten safety concerns about heritable genome editing. *Nature* 2020;583:17-18. DOI: 10.1038/d41586-020-01906-4 [news]

*³ M Lek et al., Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* 2016 Aug 18;536(7616):285-291. PMID: 27535533, DOI: 10.1038/nature19057

F Leturcq, S Tuffery-Giraud, Genetics and molecular aspects of dystrophinopathies [Article in French]. *Arch Pediatr*. 2015 Dec;22(12 Suppl 1):12S3-11. PMID: 26773583, DOI: 10.1016/S0929-693X(16)30002-1 [Review]

* M Lynch, Mutation and Human Exceptionalism: Our Future Genetic Load. *Genetics* 2016 Mar;202(3):869-875. PMID: 26953265, DOI: 10.1534/genetics.115.180471

HC Martin et al., Quantifying the contribution of recessive coding variation to developmental disorders. *Science* 2018 Dec 7;362(6419):1161-1164. PMID: 30409806, DOI: 10.1126/science.aar6731 [Deciphering Developmental Disorders Study]

* KRM van der Meij et al., TRIDENT-2: National Implementation of Genome-wide Non-invasive Prenatal Testing as a First-Tier Screening Test in the Netherlands. *Am J Hum Genet*. 2019 Dec 5;105(6):1091-1101. PMID: 31708118, DOI: 10.1016/j.ajhg.2019.10.005

E Mullaart, D Wells, Embryo biopsies for genomic selection. In: *Animal Biotechnology 2*, H Niemann, C Wrenzycki (Eds). Springer, 2018:81-93. DOI: 10.1007/978-3-319-92348-2_5

* D van Opstal et al., Origin and Clinical Relevance of Chromosomal Aberrations Other Than the Common Trisomies Detected by Genome-Wide NIPS: Results of the TRIDENT Study. *Genet Med*. 2018 Apr;20(5):480-485. PMID: 29121006, DOI: 10.1038/gim.2017.132

DB Paul, HG Spencer, The hidden science of eugenics. *Nature* 1995 Mar 23;374(6520):302-304. PMID: 7885463, DOI: 10.1038/374302a0

* PGD Jaarverslag 2020 – Rijksoverheid. <https://www.rijksoverheid.nl> › 2021/10/06 › jaarv...

FA Reed, CF Aquadro, Mutation, Selection and the Future of Human Evolution. *Trends Genet.* 2006 Sep;22(9):479-484. PMID: 16857288, DOI: 10.1016/j.tig.2006.07.005 [Review]

SCEH Sallevelt et al., Diagnostic exome-based preconception carrier testing in consanguineous couples: results from the first 100 couples in clinical practice. *Genet Med.* 2021 Jun;23(6):1125-1136. PMID: 33742171, DOI: 10.1038/s41436-021-01116-x

* E Sheridan et al., Risk Factors for Congenital Anomaly in a Multiethnic Birth Cohort: An Analysis of the Born in Bradford Study. *Lancet* 2013 Oct 19;382(9901):1350-1359. PMID: 23830354, DOI: 10.1016/S0140-6736(13)61132-0

D Smedley et al., 100,000 Genomes Project Pilot Investigators; 100,000 Genomes Pilot on Rare-Disease Diagnosis in Health Care - Preliminary Report. *N Engl J Med.* 2021 Nov 11;385(20):1868-1880. PMID: 34758253, DOI: 10.1056/NEJMoa2035790

SC Stearns, R Hoekstra, *Evolution: An Introduction*. Oxford University Press, 2000. ISBN 9780198549680

P Turley et al., Problems with Using Polygenic Scores to Select Embryos. *N Engl J Med.* 2021 Jul 1;385(1):78-86. PMID: 34192436, DOI: 10.1056/NEJMSr2105065

Hoofdstuk 19

* N Anaparthi et al., Single-Cell Applications of Next-Generation Sequencing. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2019 Oct 1;9(10):a026898. PMID: 30617056, DOI: 10.1101/cshperspect.a026898 [Review]

* C Arantes, Prijskoe. *OneWorld* no 8 oktober 2019:50-57

* KH Campbell, J McWhir, WA Ritchie, I Wilmut, Sheep Cloned by Nuclear Transfer From a Cultured Cell Line. *Nature* 1996 Mar 7;380(6569):64-66. PMID: 8598906, DOI: 10.1038/380064a0

https://en.wikipedia.org/wiki/Christopher_Polge

https://ec.europa.eu/food/animals/welfare/other_aspects/cloning/citizens_en

* <https://evolutiegids.nl/commons/>

<https://wetenschappelijkbureaugroenlinks.nl/artikel/de-commons-inspiratie-en-instituties-voor-duurzaamheid>

* <https://en.wikipedia.org/wiki/Commons>

- Y-H Jeong et al., Stochastic Anomaly of Methylome but Persistent SRY Hypermethylation in Disorder of Sex Development in Canine Somatic Cell Nuclear Transfer. *Sci Rep.* 2016 Aug 9;6:31088. PMID: 27501986, DOI: 10.1038/srep31088
- * D Linssen, W van Noort, Hoe blijven we menselijk. NRC 15 oktober 2019: DM Rushkoff, *Team Human*. W. W. Norton & Company, 2019. ISBN 9780393651690
- * CC Mann, *The wizard and the prophet*. Picador New York, 2019. ISBN 9781509884186
- * CC Mann, *De tovenaer en de profeet*. Nieuw Amsterdam, 2018. ISBN 9789046823859
- S Matoba et al., Loss of H3K27me3 Imprinting in Somatic Cell Nuclear Transfer Embryos Disrupts Post-Implantation Development. *Cell Stem Cell* 2018 Sep 6;23(3):343-354.e5. PMID: 30033120, DOI: 10.1016/j.stem.2018.06.008
- * S Sharma et al., Spermatogonial Stem Cells: Updates From Specification to Clinical Relevance. *Hum Reprod Update* 2019 May 1;25(3):275-297. PMID: 30810745, DOI: 10.1093/humupd/dmz006 [Review]
- D Yu et al., Silencing of Retrotransposon-Derived Imprinted Gene RTL1 Is the Main Cause for Postimplantational Failures in Mammalian Cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018 Nov 20;115(47):E11071-E11080. PMID: 30381455, DOI: 10.1073/pnas.1814514115

Index

Termen die ook in de verklarende begrippenlijst voorkomen zijn gemerkt met een *

A

Acrosoom* 189-191, 200, 203, 204, 223, 228, 235, 313
Aitken John 249, 322
Alberda Bert 291
Alcohol 151, 184, 318, 345
Allelfrequentie* 64, 101, 102, 104, 105, 325, 328, 331, 334
Allis David 39
Amann Rupert 208, 211
Ampulla 235, 236
Ancestry 102
Androgenen* 165
Androgenont* 151-153, 158, 252
Aneuploidie 73, 178-180, 299, 300
Angell Ruth 181
Animal research council (ARC) 151, 152, 237, 255, 340
Anticonceptie 187
Apoptose* 20, 24, 28, 30, 144, 168, 171, 175, 176, 198, 201, 204, 205-207, 215, 257, 261

Ashley Terry 93, 96
Austin CR 259
Autisme 66, 231
Autoradiografie* 197
Azoosperm(ie)* 199, 203, 213, 221-226, 228, 229, 293, 304, 313

B

Baarends Willy 229, 313
Baart Esther 298
Barker hypothese 281
Barker JPM 281
Barr body 38
Barr Murray 38
"Base excision repair" (BER) 146, 206, 246, 249, 264, 308
Beechey Colin 152, 153, 205
Bernardi Giorgio 56, 71
Bijbal 187-189, 196, 201, 208, 210, 211, 213, 215, 218, 221, 222, 234, 235, 249, 293, 309
Bird Adrian 56

Bisphenol A (BPA) 184, 271, 275, 317
Blackburn Elizabeth 53
Bloed-testis barrière 317
Boerjan Marleen 257
Boiani Michele 256
Bortvin Alex 168
Braun Bob 77
BRCA1,2 175, 176, 298
Brendoord Annelien 312, 338
Brinster Ralph 256
Buiter Rob 317
Burgoyne Paul 142, 312

C

C(aenorhabditis) elegans 57, 119, 269, 271, 278
Capacitatie* 235, 240, 241, 243
Capecchi Mario 128
Carrell Douglas 216
Caspersson Torbjorn 70
Cattanach Bruce 152, 203, 318
Centromeer* 27, 29, 31, 35, 39, 43, 51, 52, 67, 72, 78, 89, 97, 98, 174, 180-183, 224, 227, 251
Charpentier Emmanuelle 133
Checkpoint 28, 30, 31, 95, 176, 182, 183, 198, 199, 206, 221, 229, 256
Chemische mutagentia 39
Chemotherapeuticum 205, 247
Chiasma* 86, 87, 89, 96, 97, 181, 182, 195
Chimaera* 119, 120, 130
Chip array technologie* 284, 298
Church George M 331

Clinton Bill 77
Cohen Paula 95
Cohesine complex* 34, 35, 37, 38, 87, 97, 181-184
Colchicine 66, 69, 249
Collins Francis 77
Comhaire Frank 208, 322
Congenitale afwijking* 293, 307, 309
Consanguiniteit 327, 332
Copy number variation (CNV)* 62, 63, 66, 308, 309, 329
Corpus luteum 171
CG eiland 56, 57, 286
Cre technologie 131-133
Crick Francis 49
CRISPR-Cas 76, 127, 133, 134, 136, 248, 334, 335, 342
Cross(ing) over* 84, 85, 87, 89, 91, 92, 95-99, 101, 102, 105, 107, 113, 129, 143, 150, 160, 168, 182, 194-196, 205
Crow James 246
Cryopreservatie* 39
Cryptorchidie 219
Cumuluscellen 169, 171-173, 183, 234, 235, 240, 241, 243, 259, 263, 303
Cytogenetica* 65, 66, 68, 69, 71, 139, 175, 194, 247, 307, 308, 320
Cytoskelet 22, 23, 56, 151, 251

D

Darwin Charles 99, 267, 270
Davis Benjamin 136, 137
Devroey Paul 256

Dixon Alan 236

DNA*

- dubbelstrengs breuk 43, 53, 63, 65, 76, 87, 89, 90, 92, 95, 127, 134-137, 141, 175-178, 183, 194, 196, 198, 200, 203-207, 218, 246-251, 308, 321, 335
- fingerprinting* 50, 53
- herstel/repair 28, 30, 43, 80, 92, 134, 136, 141, 146, 174, 176, 201, 204, 207, 208, 246, 247, 264, 308, 320, 321, 341
- polymerase 30, 32, 33, 50, 53, 128
- recombinatie 43, 59, 75, 76, 85, 87, 92, 97-101, 128, 129, 131-133, 194, 206, 226, 247, 255
- replicatie 30, 33, 43, 50, 61, 63, 128, 146, 193, 206, 208, 243, 247, 253, 262, 264, 266, 283-285, 308, 341

Dosis compensatie* 160, 223

Doudna Jennifer 133, 134

Down syndroom 68, 69, 72, 73, 168, 179, 182, 230, 336

Dubrova Yuri 51, 283, 284

Duchenne spierdystrofie 165, 333

Dumoulin John 295

Duursen Majorie van 317

E

Edwards Robert 177, 179, 181, 183, 248, 258, 259, 291

Effectieve populatiegrootte (N_e)* 112, 330, 337

Eileider 234-238, 240, 241, 243, 255, 259, 290-292, 295

Ejaculatie 189, 208, 210, 234, 235, 322

Ellendorff Franz 258

Embryonale stamcel* 75, 92, 120, 123, 125, 128, 315

“Endocrine disruptor”* 184, 219, 271, 319

Endoplasmatisch reticulum 20-22

Epiblast* 120, 121, 123-126, 128, 145, 160, 255, 256, 299, 300, 314

Epididymis 189, 202, 210, 211, 307

Eppig John 186

Erfelijkheidgraad (h^2)* 108-111, 113, 114, 176, 286, 304, 343-345

Evans Martin 123, 128

Evans Ted 70, 125

Exon* 45, 46, 48-50, 157, 197, 231

F

Fisher Robert 108

Fitness* 99, 101, 326, 327

Fluorescentie in situ hybridisatie (FISH)* 189, 195

Fluorochroom (fluorescentie microscoop)* 70, 90, 94, 214, 298

Fokwaarde 110, 111, 337

Folliculogenese, follikelgroei 173, 186

Follikel

- Graafse 169-171, 173, 237, 258

- primaire 169-171, 173

- primordiale 142, 143, 167, 168, 169-173, 175, 183, 186, 269

- secundaire 169-171, 173

- tertiaire 169-174, 176, 240

- atresie 172, 173, 176

Follikel stimulerend hormoon (FSH) 172, 173, 177
Ford Charles 66, 69, 70, 125
Fowler Ruth 177
Friedrich Miescher Instituut (FMI) 278, 279

G

gammaH2AX 90, 246, 249
Gardner Richard 124
Genconversie* 50, 96
“gene editing” 248, 334
Genenkaart* 98, 99
Generatie interval* 112, 269, 281, 283, 337
Generoso Waldo 247
Genetica Radboudumc 177, 228, 229, 328
“Genetic architecture”* 113, 337, 343
“Genetic imprinting”* 13
“Genetic redundancy”* 76, 77, 80, 81
Genetische dissectie* 75, 77, 129
“Genome wide association study” (GWAS)* 81, 110, 113, 176, 285, 286
Genomische imprinting* 146, 151, 153, 155, 156, 158, 160, 161, 216, 251, 341
Geslachtschromosomen* 70, 74, 162, 195, 196, 199, 217, 223, 335
Giemsa Gustav 70
Gilissen Christian 328
Globospermie 223, 228, 313
Glyfosaat 271
Goldmann Jacob 177, 178
Golgi apparaat 20, 22
“Gonadal ridge” 122, 140, 141
Gonade 122, 139-143, 145, 148, 167, 269

Gonadotrope hormonen* 171, 173, 177
Gonocyt 126, 140, 142, 144, 216
Gordon conferentie 77, 95, 340
Granulosacel 140, 142, 168, 169, 171, 174, 184, 240, 263, 314
Greider Carol 53
Gribnau Joost 161
Gromoll Jörg 216
Grootegoed Anton 197, 217
Gropp Alfred 196
Gynaecologie, gynaecoloog 175, 178, 186, 289, 291, 292, 295, 304
Gynogenont* 151-153, 156, 158, 252

H

h^2 * zie Erfelijkheidsgraad
Haldane JBS 164, 196
Hamerton John 66, 69
Haplo-insufficiëntie* 73, 75, 80, 229, 329
Haploïd* 27, 50, 63, 67, 83, 84, 92, 107, 114, 184, 187, 192, 207, 252
Haplotype* 99-102, 105
Harwell zie MRC radiobiology unit Harwell
Hayashi Katsuhiko 314, 315
He Jiankui 136, 334
Heijmans Bastiaan 282
Hertig Arthur 289, 290
Heteroplasmie 265, 266
Heyting Christa 91
Histon* 35-37, 39-43, 51, 88, 89, 137, 149, 163, 197, 202, 273, 278, 279, 285, 341
Hoekstra Rolf 326

Holstein Friesians 112, 115, 265, 301, 330, 337

Homo neanderthal 104, 105, 196, 197

Homo sapiens 64, 88, 104, 105, 161, 196, 315, 319

Homologe chromosoomparing 72, 90, 95, 198

Homologe recombinatie (HR)* 75, 76, 92, 128, 129-131, 247

Homoplasmie 265

Human Genome Project* 77

Humane genetica Yale University 93-95

Hunt Patricia 182, 184

Hunter Ronald 237

Hutchinson-Gilford progeria syndroom 79

Hybriden*, hybride sterilititeit 196, 199, 249

“Hydatidiform mole” 152

Hypofyse 171, 172

Hypospadias 219

I

Illumina 64, 286

Immunofluorescentie* 167, 168, 181, 214

Implantatie 70, 72, 76, 121, 123, 124, 130, 137, 145-147, 152, 160, 161, 177, 179, 185, 253-255, 264, 271, 296, 298, 300, 312, 332

Imprinting zie “genomische imprinting”*

Induced pluripotent stamcel (iPS(C)) 125, 314

Inteeltlijn muis 79, 124, 125, 128, 129, 131, 143, 247, 270, 272, 287, 288

Intron* 46, 48-50

Ioniserende straling* 39, 72, 90, 175, 176, 187, 203, 247, 283, 317, 318, 320-322

Isthmus 233-236, 240, 241

J

Jablonka Eva 269

Jackson laboratorium Bar Harbor Maine 76, 78, 79, 124, 125, 186, 294

Jeffreys Alec 50, 51, 283

Jenuwein Thomas 39

Joris Hubert 292

K

Karyogram* 67, 70-72, 74

Karyotype* 73, 74, 199, 223, 225

Kaufman Matthew 123, 124, 184

Keeney Scott 91

Kelsey Gavin 155

Kiembladen* 119, 120, 255

Klinefelter syndroom 69, 73, 74, 139, 164, 199, 223

Knockin* 129, 131, 270

Knockout* 76, 77, 88, 90, 93, 94, 129-131, 187, 198, 210, 228, 270, 339

Kramer Mebius 194

L

Lamarck Jean-Baptiste de 270

Leese Henry 257, 258

Leydigcel 142, 190

Liebaers Inge 256

“Long interspersed nuclear element” (LINE) 52-56, 62, 63, 65, 66, 71, 148, 168

“Long read sequenzen” 62, 63, 65, 78, 308

Lush Jay L 108

Luteïniserend hormoon (LH) 173, 177, 237-239

Lynch Michael 108, 110, 326, 338, 342

Lyon Mary 38, 162, 175, 176

Lysenko Trofim 270

M

Marchetti Francesco 205

Margulis Lynn 261

Martin Gail R 123

“Maternal to Zygote” overgang* 174, 185, 250, 302, 304, 310

McKusick Victor 78

McLaren Ann 142

Metabolisme* 20, 23, 61, 156, 169, 256, 257, 279

Methyloom* 57, 216, 217, 281, 282, 284-288, 311, 312, 318, 319, 321, 339, 341

Mendel, wetten van 85, 88, 97, 98, 107-109, 193, 267

“Metastable epiallele” 273

“Mismatch repair” (MMR)* 33, 87, 92-96, 198, 206

“Missing heritability” 113, 114

Mitochondriën 20, 22, 169, 234, 242, 243, 257, 261-266, 278

Monk Marilyn 146

Monniaux Danielle 183

Mono allele expressie 153

Monogen 75, 78, 110, 164, 327, 328, 331, 333-335

Monosomie* 179

Morgan Thomas Hunt 98

Mozaïek* 136, 137, 162, 216, 252, 273, 298-301, 336

MRC clinical and population cytogenetics unit
Edinburgh 74, 112, 181

MRC mammalian development unit Londen
146

MRC radiobiology unit Harwell 38, 39, 76,
143, 152, 153, 155, 156, 162, 163, 175, 177,
198, 203, 247, 318

Mus musculus 88

Mus musculus molossinus 196

Mus poschiavinus 143

Mutagene stof 94, 124, 247

Mutatiefrequentie* 62-64, 99, 205, 283, 284,
309, 315, 333

Mutatiespectrum* 207, 335

“Mutational load” 229, 325

N

National Institute of Environmental Health
Science Durham 305

“Nature versus Nurture”* 285

Ne* zie Effectieve populatiegrootte

Nederlands Kanker Instituut (NKI) 94, 95, 135

“Next generation sequencing” (NGS)* 50, 59,
62, 63, 101, 146, 177, 197, 207, 284, 300,
308, 311, 320, 335, 339, 348

Non disjunctie* 30, 177-179, 181-184, 194,
195

“Non homologous end joining” (NHEJ) 128,
206, 247

Nucleolus* 22-24, 36, 37, 47, 171

Nucleosoom* 35-37, 39

O

Oak Ridge National Laboratory in Tennessee
190, 201, 204, 247

Oakberg Eugene 190

Oestrogenen* 184, 238, 239, 306

Ohno Susumu 38, 77

Oligospermie* 214, 221, 222, 224-226

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)
79, 90, 251, 325, 327, 329, 332, 337

Oocyt 84, 85, 89, 95, 155, 162, 167, 168, 171,
174-176, 180, 182, 183, 199, 263

Oogonien 140, 142, 143, 167, 170

Oost John van der 133

Ophoff Roel 231

Oviduct 233, 235-238, 240, 241, 243, 258

Ovulatie 168, 170-173, 176, 177, 179, 183,
233, 235, 237-241, 243, 244, 246, 248, 280,
295, 296, 300-302, 306, 310, 311, 334, 337

Ozil Jean Pierre 245, 257

P

Paabo Svante 104

Page David 224

Palermo Gianpiero 239

Parthenogenont* 151, 184, 245

Penrose Lionel 179, 230, 231

Peters Antoine 93, 279

Peters Jo 155, 156

“Phasing” 101

Plug Annemieke 93, 96

Pluripotentie* 123-126, 144, 145, 148

Polge Chris 340

Polygeen* 108, 113, 328

“Polygenic risk score” (PRS)* 110, 111, 114,
343, 345, 348

Polyplöidie* 73

Post translationele modificatie (PTM)* 39, 41-
43, 90, 137, 149, 278, 285, 329, 341

Progesteron 238, 239, 306

Pronucleus 127, 141, 151, 249, 252, 277, 278

Protamine 200-203, 215, 218, 243, 246, 313,
322

Primordiale kiemcellen* 13, 119-122, 141,
145, 147, 148, 150, 156, 167, 255, 265, 269,
271

Q

Quinacrine 70, 71

R

Rassoulzadegan Minoo 276

Reciproke translocatie 65, 67, 68, 71, 72, 124,
152, 153, 155, 204, 217, 222, 223, 247, 248,
276, 308, 320, 336

Reich David 103, 104

Repping Sjoerd 224

Retrotransposon* 52-57, 60, 137, 148-150,
168, 175, 198, 272-275, 286

Reverse transcriptase* 53-55

Riele Hein te 94

RNA*

- lncRNA 47, 161
- mRNA* 21, 44-46, 48, 49, 148, 174, 197,
198, 200, 250, 276
- miRNA 197, 198, 276, 277
- ncRNA 157

- piRNA 197, 198, 276, 277
- sncRNA 198, 276-278, 281
- tRNA 47-49, 262, 277, 278
- Robertsonische translocatie 67, 68, 72, 222, 225, 333
- Rock John 289, 290
- Roelen Bernhard 186
- Rooij Dick de 94, 191, 192, 194

- S**
- Saitou Mitinori 120, 315
- Schizofrenie 66, 114, 231, 282
- Schuh Melina 183
- Searle Tony 152, 153, 163, 164, 177, 203, 205, 247
- Selby Paul 201, 203
- Sertoliceel, pre-Sertoliceel 140, 142, 143, 188, 189, 190, 194, 198, 205, 221, 224, 226, 263, 314
- Sertoli Enrico 224
- Sex 99, 164
- Sex chromosomen* 68, 69, 73, 142, 196, 197, 199, 217, 222, 225, 308
- “Sex body”* 89, 195-199, 217, 224-226
- “Sex cords” 140
- Sex ratio 195, 312
- “short intersperced element” (SINE) 52, 53, 55, 62, 63, 65
- “Short read sequencen” 62, 65, 308
- “Single nucleotide polymorphism” (SNP)* 63-65, 100-105, 107, 110, 113, 114, 178, 179, 193, 288, 308, 325, 337, 339
- “Single nucleotide polymorphism” (SNP)* array 301
- Skakkebaek Niels 219, 320
- Smidt Diedrich 258
- Smithies Oliver 128
- Solter Davor 151
- Soom Ann van 257, 323
- “Specific locus test” 201
- Spermatocyt 70, 84, 85, 89, 95, 96, 133, 155, 187, 205, 217
- Spermatogonia 70, 133, 144, 187, 189, 190-193, 201, 204, 205, 216, 223, 230, 231, 283, 284, 313, 321
- Spermiation* 187, 189, 190
- Spermioogram* 209, 211, 212, 214, 216, 250, 294, 304
- Spermiogenese* 187, 193, 198, 200, 202, 203, 207, 246, 313
- Steirteghem André van 256, 293
- Steptoe Patrick 258
- Sternberg Samuel 133, 134
- Steroïd hormonen 124, 169, 190
- Stevens Leroy 125
- Stout Tom 302
- Stress 23, 215, 259, 269, 270, 271, 272, 277, 281, 282, 284, 291, 295
- Stress, oxidatieve*, -schade 183, 207, 211, 215, 218, 249, 295, 321, 322
- Sturtevant Alfred 98
- Surani Azim 120, 121, 150-152
- Sutovsky Peter 263
- Sybenga Jaap 69
- Synaptonemaal complex* 87, 91, 96
- Szostak Jack 53

T

Telomeer* 51-53, 78, 85, 87, 182, 224, 231, 232, 253, 255
Telomerase* 53, 231, 253
Testicular Dysgenesis Syndrome (TDS) 219, 320
Testis 69, 72, 94, 125, 126, 139, 140-144, 187-192, 194, 197, 198, 200, 201, 208, 211, 212, 215, 216, 219, 220, 221, 223, 227, 228, 293, 304, 307, 313, 314, 317, 321, 341
Testosteron 142, 190
Thecacele 169
Tobi Elmar 282, 348
Tournaye Herman 256,
Transcriptiefactor* 28, 31, 41, 47, 121, 126, 141, 143, 148
Transgen 127, 130, 276, 278, 279
Transgeneratieel 268-272, 276-281, 283, 284
Translocatie 65, 67, 68, 71, 72, 124, 152, 153, 155, 204, 217, 222, 223, 225, 247, 248, 308, 320, 333, 336
"Transmission rate distortion" 193
"Trio sequencing" 61, 178, 222, 223, 205, 229, 309, 320, 323, 328
Triploidie* 73, 244, 245, 252
Triptonide 187
Trisomie* 68, 73, 179, 335, 336
Trofoblast 123, 179, 255, 299, 300, 301, 333
Turner syndroom 69, 73, 74, 162

U

Univalent* 180, 182, 196, 199
Urologie 292

V

"Variable number of tandem repeats" (VNTR) 53
Vas deferens 188, 189, 208, 211
Veen Jaap van der 101
Venter Graig 77, 80
Vermeesch Joris 298
Vinclozoline 271
Vlaams Nederlandse vereniging voor fertiliteitsstudie 208
Vogt Peter 224

W

Watson James 49
Wetten van Mendel 97, 107, 267
WGS* ("whole genome sequencing") 59, 60, 61, 65, 78, 107, 113, 114, 177, 308, 329, 345
Whitelaw Emma 272
"Whole exome sequencing" (WES)* 59-61, 78, 177, 223
Wieringa Bé 19, 24
Wilmut Ian 340
Wright Sewall 108
X
X chromosoom inactivatie 73, 150, 160, 163, 223, 252, 327
X gekoppelde mentale retardatie 165

Z

Zaadleider 188, 189, 208, 210, 211, 234, 293

Zeilmaker Gerard 291

Zona pellucida* 169, 171, 235, 240, 245, 255,
292

Zygote* 76, 81, 84-86, 90, 94, 105, 122, 123,
127-129, 134, 136, 137, 139, 141, 145, 147,
148, 151, 153, 155, 167, 174, 176, 177, 185,
205, 208, 218, 233, 243, 245-257, 263,
276-280, 285, 292, 294, 297, 302, 304,
308, 310, 328, 331, 334, 335

Voortplanting en genetica zijn de centrale thema's van de biologie. Ook hebben ze te maken met levensvragen als: waar komen we vandaan, wat zijn we en waar gaan we naartoe. In de gecombineerde wetenschap, voorplantingsgenetica, worden de generaties met elkaar verbonden en speelt vruchtbaarheid een grote rol.

De cellijn die daar verantwoordelijk voor is, staat bekend als de kiembaan, met de gameten als de functionele producten. Het boek volgt de kiembaan en poogt door een vrijer en meer verhalend gebruik van de taal de kloof tussen een academisch tekstboek en de maatschappij te overbruggen. Persoonlijke ervaringen worden niet gemedan, maar domineren niet.

Het boek is bedoeld voor mensen die professioneel met deze materie te maken hebben of krijgen, ook in het onderwijs en de journalistiek, maar is door de prachtige kleurenillustraties en een actuele verklarende woordenlijst ook geschikt voor geïnteresseerden zonder professionele achtergrond.

Peter de Boer studeerde af met een mastergraad in de zoötechniek aan de Landbouwhogeschool (1971). Hij werkte als medewerker bij de afdeling erfelijkheidsleer van wat nu Wageningen University heet (PhD 1975) en daarna als senior onderzoeker bij de afdeling Verloskunde en Gynaecologie van het Radboudumc in Nijmegen (tot 2012).

Marc Maas studeerde af met een mastergraad (Biologie) aan Wageningen University (2000). Daarna promoveerde hij in 2005 bij dezelfde instelling in de genetica. Na een postdoctorale periode ontwikkelde hij zich tot wetenschapsillustrator. In die rol werkt hij voor verschillende wetenschappelijke instellingen.

ISBN 978-90-8317-898-1



9 789083 178981 >

Radboud University



www.ru.nl/radbouduniversitypress