

Samenvatting

De inductie van de rijping van de eicel hangt af van de voltooiing en integratie van een aantal essentiële factoren. Ten eerste moet de eicel zijn groeicyclus hebben voltooid en alle moleculen hebben verworven voor de inductie van de rijping aanvangt. Een tweede sleutelvoorwaarde is het genereren van essentiële endocriene en paracriene signalen op het juiste tijdstip en in voldoende mate om alle noodzakelijke intracellulaire veranderingen te induceren die samenhangen met zowel de kern- als de cytoplasmatische rijping en daarmee met de ontwikkelingscompetentie van de eicel. Het concept van de ontwikkelingscompetentie is echter niet eenduidig bepaald omdat er geen specifiek mechanisme mee is geassocieerd. Algemeen wordt aangenomen dat het verwerven van ontwikkelingscompetentie verband houdt met verschillende veranderingen zoals de synthese en opstapeling van specifieke RNA moleculen en eiwitten, en de herschikking van cytoplasmatische organellen bijvoorbeeld van corticale granula, vetten en mitochondriën. De gevolgen van feilen in één van de processen resulteert in een falen van de ontwikkeling.

Dit proefschrift omvat onderzoek naar de expressie van genen in eicellen van het rund tijdens de hervatting van de meiose op 6 uur na de LH piek samenvallend met de afbraak van het kernmembraan de zogenaamde “germinal vesicle breakdown”. Het werd verondersteld dat deze opzet een beeld zou geven van de belangrijkste veranderingen in de regulatie van de celcyclus, de herschikking van het cytoskelet en het uitlijnen van de chromosomen. De eerste studie, (**Hoofdstuk 2**), verklaart de methodiek die is toegepast voor het verzamelen van het materiaal dat werd gebruikt in dit proefschrift en de criteria voor de selectie van functionele pre-ovulatoire follikels, waarmee de veronderstelde competente en niet-competente eicellen konden worden onderscheiden op de verscheidene stadia van rijping. In de tweede studie, (**Hoofdstuk 3**), werden de verzamelde eicellen gebruikt om een DNA microarray samen te stellen en te hybridiseren met als doel op te helderen welke transcripten in potentie betrokken zouden kunnen zijn bij de hervatting van de meiose en eventueel de ontwikkelingscompetentie. De hieruit afgeleide identificatie van verscheidene transcripten samenhangende met de opbouw van de spindel en de scheiding van de chromosomen leidde tot de volgende studie, (**Hoofdstuk 4**), waarin de mate van

transcriptie met betrekking tot deze genen werd onderzocht in eicellen die in vivo waren betrokken bij het rijpingsproces in functionele en afwijkende pre-ovulatoire follikels zoals bepaald in de eerste studie. Ter vergelijking werden eicellen gebruikt die afkomstig waren uit kleine niet-preovulatoire follikels tijdens rijping in een kweekmedium (: in vitro).

Omdat de werking van de producten van de diverse transcripten zoals geïdentificeerd in de Hoofdstukken 3 en 4 afhankelijk is van ATP, en omdat het vaststaat dat de ontwikkelingscompetentie van een eikel is gecorreleerd met het gehalte aan ATP in de eikel, is de voorziening van energie een vereiste voor het bewerkstelligen van competentie. Om deze reden werd in de vierde studie, (**Hoofdstuk 5**), de betrokkenheid bij de rijping onderzocht van verscheidene routes voor transport van lipiden, β -oxidatie en *de novo* synthese van vetzuren. De mate van expressie van genen waarvan bij somatische cellen bekend is dat zij een sleutelrol spelen in het lipid-metabolisme, werd evenals in de voorgaande hoofdstukken bestudeerd in eicellen tijdens het rijpingsproces in vivo in vergelijking tot in vitro.

Deze samenvattende discussie bespreekt de belangrijkste bevindingen en voorziet in suggesties voor toepassingen in de praktijk en voor toekomstig onderzoek.

Het effect van de grootte van de follikel op de concentratie van steroid-hormonen in pre-ovulatoire follikels van het rund na stimulatie met FSH

Moderne voortplantingstechnieken gebruiken routinematig stimulatie met gonadotrope hormonen voor het werven van eicellen en de inductie van ovulatie. Aldus kan een groter aantal eicellen worden verkregen waarbij echter wel het risico aanwezig is dat niet alle gameten over een zelfde ontwikkelingscompetentie beschikken [1, 2]. Deze heterogeniteit is waarschijnlijk toe te schrijven aan intrinsieke verschillen tussen de eicellen. Het is algemeen bekend dat het hormonale milieu in follikels in bepaalde mate is gewijzigd in runderen die zijn behandeld met exogeen gonadotropine deels afhankelijk van het toegepaste hormoon en de behandelwijze [3-7]. Tot op heden is er echter weinig bekend over de relatie tussen de grootte en de gezondheid van de follikels. In **Hoofdstuk 2** hebben wij aangetoond dat de concentraties van steroiden in de follikel worden beïnvloed door de grootte van de pre-ovulatoire follikel na stimulatie met oFSH. Één van de voornaamste bevindingen is dat de concentratie van progesteron toeneemt met de grootte in follikels tijdens de rijping na de endogene LH piek. Tot dusver blijft het echter onbekend in hoeverre het intra-folliculaire milieu samenhangt met de ontwikkelingscompetentie van de eikel die zich daar bevindt. Toch zijn er aanwijzingen dat de fysiologische staat van

follikels in schaap [8] en mens [9] de daarop volgende rijping en competentie van de eicel in vivo beïnvloedt. Asynchrone rijping van follikel en eicel treedt op na superovulatie en kan de ontwikkelingscompetentie van de eicel beperken [1, 2].

Anders gezegd hebben wij in het hier beschreven onderzoek niet beschikt over bewezen criteria om duidelijk onderscheid te maken tussen follikels met competente en niet-competente eicellen. Echter, in een eerder onderzoek in ons laboratorium werd aangetoond dat er in eicellen verkregen na stimulatie van runderen met recombinant humaan FSH een verstoring van de rangschikking optreedt van de corticale granula ten tijde van de voltooiing van de rijping terwijl aan het begin van de rijping de functionaliteit van de follikels was verminderd afgemeten aan een sterk verlaagde concentratie van oestradiol in de follikels [10]. Normale rangschikking van deze granula langs de periferie van de rijpe eicel is een algemeen bekend teken van ontwikkelingscompetentie. Op grond hiervan werd aangenomen dat competente eicellen hoofdzakelijk voorkomen in functionele follikels van pre-ovulatoire grootte die dezelfde veranderingen in concentraties van steroïden vertonen als beschreven voor onbehandelde, normaal cyclische runderen. Steroid-hormonen zijn betrokken bij een scala van fysiologische processen, o.a. de regulatie van glucose [11] en lipiden. Zo is bijvoorbeeld exogeen oestradiol noodzakelijk in muizen die deficiënt zijn aan aromatase (ArKO muizen) om de expressie van genen en de activiteit van daarbij behorende enzymen te handhaven die een rol spelen in het lipide metabolisme van de lever. Steroid-hormonen reguleren de voortgang van de celcyclus [12, 13], remmen het proces van apoptose [14], en moduleren de afgifte van calcium [15, 16]. In het ovarium van zoogdieren is de follikel de belangrijkste plaats voor synthese en secretie van steroid-hormonen tijdens pre-ovulatoire ontwikkeling en rijping van de eicel. De regulatie van de productie van steroïden door de ovariële, folliculaire cellen varieert opvallend met het stadium van ontwikkeling. Tijdens de pre-ovulatoire periode wordt de geselecteerde dominante follikel gekarakteriseerd door veranderingen in de concentraties van deze hormonen [17]. Voorafgaand aan de pre-ovulatoire LH piek synthetiseren de granulosa cellen oestrogenen en scheiden dit af, terwijl na LH de granulosa cellen luteïniseren en meer progesteron afscheiden in samenhang met afname van mRNA voor 17 α -hydroxylase en P450 aromatase [18]. De specificiteit van de acties van de steroïden is toe te schrijven aan de aanwezigheid van intracellulaire receptor eiwitten. Ondanks de overvloed aan informatie aangaande steroid receptoren in verschillende soorten weefsel en hun belang in de voortplanting is tot dusverre alleen de receptor voor oestradiol en ER β mRNA aangetoond in de eicel van het rund [19]. Het mRNA voor de receptor van progesteron wordt kortstondig geïnduceerd in granulosa cellen van pre-ovulatoire follikels van het rund tussen 5 à 7 uur na de LH piek [20-22]. Er is echter niets bekend aangaande de expressie van kern

of membraan receptoren voor progesteron in de eicel van enige zoogdiersoort. In primaten is de activiteit van mRNA voor androgeen receptoren (AR) essentieel voor follikelontwikkeling in een vroeg stadium en voor eicel kwaliteit [23], en in ratten is de volledige afbraak van AR activiteit geassocieerd met intensieve apoptose van de granulosa cellen in pre-ovulatoire follikels en met een povere kwaliteit van de cumulus eicel complexen (COCs) [24]. Verder is beschreven dat androgeen receptoren worden verplaatst van het cytoplasma naar de kernvelop en vervolgens naar de nucleolus wat een rol doet veronderstellen als een door ligande geactiveerde transcriptiefactor [25]. In het licht van deze waarnemingen zullen de identificatie en karakterisering van de patronen van veranderingen in mRNA, en functionele analyse van steroidreceptoren die tot expressie worden gebracht in de eicel kunnen leiden tot een fundamenteel begrip van het belang van de rol van steroiden tijdens eicelrijping in vivo. In de klinische praktijk bestaat duidelijk behoefte om het stimulatie protocol van ovaria te optimaliseren. Een geschikt ontwerp van superovulatie behandeling zou de concentratie van LH en zijn halfwaardetijd in het FSH preparaat in overweging moeten nemen, en daarnaast de concentratie van steroiden en de expressie van enzymen betrokken bij de synthese van steroiden in de pre-ovulatoire follikels.

De expressie van boodschapper RNA in de eicel van het rund tijdens hervatting van de meiose

Hoewel de groeiende eicel van zoogdieren morfologisch gezien eenvoudig is, ondergaat deze een serie van afzonderlijke stappen van differentiatie. Een relatief groot aantal genen is benodigd om zijn gehele ontwikkeling te programmeren. Een klein deel van deze genen zijn specifiek voor de eicel [26] terwijl het overgrote merendeel zowel in de eicel als in somatische cellen tot expressie komt. Transcriptie en repressie van genen is een dynamisch proces waarvan kan worden verwacht dat het in de eicel in vitro varieert met de kweekomstandigheden. Om vast te stellen welke genen door specifieke stimuli kunnen worden gereguleerd is het noodzakelijk te beschikken over de mogelijkheid genen te onderzoeken in een scala van omstandigheden waaraan de eicel wordt blootgesteld. De triggers voor verandering in genexpressie in de eicel zijn van groot belang voor het doorzien van het moleculaire mechanisme van eicelrijping. Feitelijk is de huidige kennis met betrekking tot moleculaire mechanismen grotendeels verworven in onderzoek van eicelrijping in vitro. Mogelijk van nog groter belang is het feit dat de meeste in vitro studies voor de koe zijn uitgevoerd met eicellen uit kleine of middelgrote follikels (3 tot 6 mm in diameter) die geen prematuratie hebben ondergaan [27, 28]. Prematuratie vangt aan vanaf het bereiken van een grootte van 8,5 mm dat wil zeggen vanaf het begin van verschil in

groei tussen de twee grootste follikels [29], en dit proces hangt samen met een differentiatie in de concentratie van oestradiol [30].

Omdat de eicelrijping in vivo berust op een subtiel evenwicht in de follikel tussen de verschillende bij de regulatie betrokken stoffen en waarschijnlijk ook tussen verschillende receptoren van de eicel, worden de normale processen zoals die zich in vivo afspelen niet noodzakelijkerwijs weerspiegeld door moleculaire en biochemische veranderingen veroorzaakt door kunstmatige liganden in vitro. De complexiteit van de regelmechanismen van de hervatting van de meiose is duidelijk aangetoond in eicellen van het rund [31]. De pre-ovulatoire follikel van het rund blijkt een aantrekkelijk experimenteel model op te leveren voor onderzoek naar de regulatie van eicelrijping en de competentie van de eicel tot verdere ontwikkeling na bevruchting. De pre-ovulatoire follikel bevat voldoende vloeistof om steroïden, eiwitten en diverse bij de regulatie betrokken stoffen te analyseren. De follikel bevat eveneens voldoende hoeveelheden granulosa en cumulus cellen wat een uitmuntende mogelijkheid biedt om de functionele interactie tussen de diverse bij de regulatie betrokken stoffen te onderzoeken.

Differentiële expressie van genen tussen eicellen al dan niet blootgesteld in vivo aan LH kan ons inzicht vergroten in de moleculaire grondslag van de hervatting van de meiose in vivo. De identificatie en karakterisering van genen die uitsluitend of bij voorkeur tot expressie komen in de eicel die 6 uur in vivo aan het rijpingsproces is onderworpen zullen hopelijk de mechanismen van het rijpingsproces verhelderen en bruikbare informatie verschaffen ten behoeve van de ontwikkeling van efficiënte kweekmedia voor eicelrijping. De suppressie subtractieve hybridisatie (SSH) methode maakt het mogelijk om genen te identificeren die in overexpressie zijn (zg. “forward” +SSH) maar ook die in onderexpressie zijn (zg. “reverse” –SSH) door de zogenaamde “driver” en “tester” populaties te verwisselen tijdens de procedure (Clontech, Palo Alto, VS) [32-37]. De SSH methode is een wijdverbreide techniek doordat daarmee de verzameling mogelijk is van zowel overvloedig aanwezig mRNA als van mRNA waarvan slechts een beperkt aantal kopieën present zijn. De methode benodigd echter een behoorlijk grote hoeveelheid initiërend RNA wat toepassing bij in vivo gerijpte eicellen bemoeilijkt. Door daarbij gebruik te maken van de SMART amplificatie methode (“Switch Mechanism At the 5’ end of the Reverse Transcript”) kan deze beperking worden voorkomen.

De ontwikkeling van microarray technieken maakt het mogelijk om duizenden genen te screenen in één enkel experiment waarmee differentiële genexpressie kan worden vastgesteld in behandelde versus controle populaties van cellen. Zo zou het gebruik van

DNA microarray aanzienlijk kunnen bijdragen in beperken van de inspanning die nodig is om de vele variabelen te screenen die een rol spelen bij het effectief onderzoeken van genexpressie patronen. Er zijn microarrays ontwikkeld om geëxprimeerde mRNA transcripten af te spiegelen (cDNA arrays), of om een herkenbaar deel van een mRNA transcript weer te geven (oligonucleotide arrays). De aantrekkelijkheid van deze technieken wordt weerspiegeld in de exponentiële toename aan publicaties sinds de introductie van de techniek in 1995. Het gebruik van microarrays is wijdverbreid in onderzoek op het gebied van de pathologie, farmacologie, oncologie, celbiologie en recentelijk eicellen [26, 38, 39].

Verscheidene technieken zijn gebruikt voor de ontdekking van genen waarbij microarrays zijn ontworpen voor specifiek cDNA van de eicel ten behoeve van mogelijke toepassing om het succes van voortplantingstechnieken te taxeren. Twee van deze technieken maken gebruik van een methode om selectief cDNA klonen te scheiden of fragmenten die in de ene maar niet de andere populatie van cellen of weefsel aanwezig zijn. Op het ogenblik is te voorzien dat de gehele database aan genen voor het rund beschikbaar wordt. Om deze reden zou genoom informatie moeten worden gebruikt om een microarray te construeren voor het screenen van transcripten in de eicel van het rund. De ideale aanpak om genexpressie te profileren bestaat uit het gebruik van microarrays die het volledige genoom betreffen. Hiermee kunnen genen worden geïdentificeerd die zijn up of down gereguleerd in response op een bepaalde behandeling. Omdat het echter niet aannemelijk is dat microarrays een routine test worden in de nabije toekomst, zal onderzoek op het gebied van de voortplantingsbiotechnologie waarschijnlijk de identificatie verlangen van een kleine subset aan genen waarvan de expressie kan worden toegepast in de ontwikkeling van een kwaliteitstest die op genen is gebaseerd. Daarom gebruikten wij in **Hoofdstuk 3** de SSH en microarray techniek in combinatie met eicellen die in vivo aan het rijpingsproces waren onderworpen om genen te identificeren die betrokken zijn bij de regulatie van de rijping van de eicel van het rund in de veronderstelling dat LH en rijping in vivo bevorderlijk zijn voor de regulatie van meerdere aspecten van de eicel functie.

Gebruik makend van de SSH techniek waarbij een verschilfactor van 1,3 als drempelwaarde werd gedefinieerd konden 115 genen worden geïdentificeerd uitgaande van 945 DNA klonen in het begin. Dit relatief kleine verschil in genexpressie patroon ten gevolge van de LH piek wijst mogelijk op het feit dat slechts een kleine subset aan genen nodig is om de hervatting van de meiose en de ontwikkelingscompetentie te reguleren. De microarray analyse zoals hier toegepast heeft nieuwe mRNAs aan het licht gebracht die in potentie een rol spelen in de juiste functie van de eicel, de rijping en/of de meiotische competentie. Wij hebben belangrijke veranderingen onderkend in genen die betrokken zijn

bij regulatie van de celcyclus, signaal transductie, transcriptie en mRNA verwerking, het cytoskelet, celadhesie, en metabolisme. In vervolg op het identificeren van deze genen op mRNA niveau is het de uitdaging om deze informatie efficiënt toe te passen om een beter begrip te verwerven van het mechanisme van de hervatting van de meiose. De benadering via de zogenaamde proteomics zal informatie kunnen opleveren die niet kan worden verkregen op het RNA niveau wat toe te schrijven valt aan ofwel een betrekkelijke correlatie tussen mRNA en eiwit concentraties of aan modificaties van eiwitten die optreden na de translatie wat kan leiden tot verscheidene iso-vormen gegenereerd vanuit één mRNA. Voor veel van de geïdentificeerde genen blijven de vermeende liganden die de afgeleide eiwitten zouden activeren en ook hun doelwit voor actie onbekend. Dit vormt een uitdaging voor toekomstig onderzoek om zo het mechanisme van eicelrijping te onthullen en daarmee een efficiënt in vitro maturatie (IVM) systeem te ontwikkelen.

De expressie van boodschapper RNA van genen betrokken bij het transport van organellen en de scheiding van chromosomen

Hoewel de morfologie van de spindel en chromosomen tijdens de meiose al meer dan een eeuw bekend is zijn de basale moleculaire mechanismen merendeels onbekend die de scheiding van chromosomen in de eicel van zoogdieren reguleren. Meiose in de eicel moet nauwgezet worden gereguleerd om een juiste deling van het genetische materiaal zeker te stellen. Falen van de scheiding van chromosomen leidt tot aneuploidie en kan leiden tot verlies van levensvatbaarheid. Naar schatting hebben 10 tot 30% van bevruchte eicellen bij de mens een verkeerd aantal chromosomen waarbij trisomie en monosomie het meeste voorkomen. Dit fenomeen heeft vergaande klinische gevolgen: bij benadering treedt aneuploidie op bij eenderde van de miskramen waardoor dit de omvangrijkste bekende oorzaak voor verlies van zwangerschap uitmaakt. Bij bevruchtingen die overleven tot de geboorte betreft aneuploidie de belangrijkste genetische oorzaak van onvermogen tot ontwikkeling en zwakbegaafdheid [40].

De analyse zoals hier uitgevoerd met “real-time” kwantitatieve PCR van zes van de genen die een significante rol spelen bij de vorming van de spindel, bij het onderhouden van een accurate scheiding van de chromosomen en bij de opbouw van het cytoskelet toonde de aanwezigheid aan van ontregelde en afwijkende niveaus van mRNA in eicellen afkomstig uit als afwijkend gedefinieerde follikels in vergelijking tot eicellen uit normaal functionele follikels. Deze bevinding zou een verklaring kunnen verschaffen voor abnormale chromosomen samenstelling zoals die frequent wordt waargenomen in de eicel en vroege pre-implantatie embryo's na kweek in vitro. Dit fenomeen wordt doorgaans in

verband gebracht met beschadiging bij klieving, slechte embryo kwaliteit en een toename van fragmentatie; al deze verschijnsels kunnen de potentie tot implantatie van het embryo in gevaar brengen [41-43].

In het embryo van zoogdieren is polariteit een welbekend verschijnsel. In de eicel echter is het bestaan van polariteit nog controversieel [44-46] en er is weinig bekend betreffende de genen die polariteit en de daarmee samenhangende activiteit reguleren. In **Hoofdstuk 3 en 4** hebben we verscheidene transcripten geïdentificeerd in de eicel waarvan bekend is dat zij een rol spelen in de vorming van de polariteitsas zoals par-3, formine, KIF3, β -catenine en CDC42 (niet gepubliceerde resultaten). Organellen en corticaal actine worden asymmetrisch verdeeld in de eicel van vele soorten wanneer de dorsale/ventrale as wordt gevormd [46]. Onze identificatie van genen in de eicel die de polariteit reguleren en de recente bevinding dat Par-3 eiwit is geassocieerd met de meiotische spindel [47] kunnen wijzen op een belangrijke functie tijdens de hervatting van de meiose en een mogelijke rol in de polariteit van de eicel.

Hoewel de meeste genen die in de studie van hoofdstuk 4 in de eicel zijn geïdentificeerd ook algemeen zijn tijdens mitose in somatische cellen is er bovendien een fundamenteel verschil. Tijdens de promotafase van meiose II worden de chromatiden alleen via de centromeren bijeen gehouden in tegenstelling tot de promotafase van de mitose waar zij tenminste initieel zijn verenigd over de gehele lengte. Dit roept de interessante mogelijkheid op dat disjunctie van de chromosomen tijdens mitose ook twee verschillende sets aan machinerie nodig heeft: namelijk één die normaal aanwezig is gedurende meiose I wat de armen van de chromatiden scheidt, en een andere die normaal wordt gevonden bij meiose II (of tijdens de voorafgaande interfase) wat leidt tot scheiding in het gebied van de centromeren. In de toekomst zal het belangrijk zijn de verschillen vast te stellen tussen de twee mechanismen die operationeel zijn tijdens meiose om de chromosomen te scheiden. De scheiding van zusterchromosomen is een complex proces en er zijn zeker andere factoren betrokken bij de regulatie van de aanhechting en scheiding van de zusterchromatiden.

Regulatie van het lipide metabolisme tijdens finale eicelrijping en vroeg-embryonale ontwikkeling

Een volledig inzicht in het fysiologische effect van rijping in vivo op de expressie van genen vereist de identificatie van transcripten die invloed hebben op metabole routes, de opheldering van hun werkingsmechanisme, en de gevolgen voor groei, differentiatie en overleven. Vanuit praktisch oogpunt is het identificeren van genen van groot belang bij het

samenstellen van succesvolle media voor maturatie om de ontwikkeling te ondersteunen van eicellen na bevruchting.

Veranderingen in de ultrastructuur van groeiende eicellen die verband houden met de opstapeling van voedingsstoffen zoals lipiden zijn een noodzakelijke voorwaarde voor de energievoorziening ten behoeve van de hervatting van de meiose en daaropvolgende embryonale ontwikkeling. De oorsprong van lipiden die in de eicel terecht komen wordt niet volledig begrepen. Van lipiden die zijn opgeslagen in de eicel is aangetoond dat ze zijn opgestapeld in de eicel gedurende de ontwikkeling van follikels [48] en dat de voorraad ervan afneemt tijdens het rijpingsproces [49]. Kim et al. [50] toonden aan dat de voorraad aan lipiden in de eicel van het rund de lipiden voorraad in het maturatie medium weerspiegelen wat erop wijst dat de lipiden die worden opgestapeld in de eicel van oorsprong afkomstig zijn uit het medium. Het is niet bekend of deze lipiden passeren via de verbindingen tussen de eicel en de omringende cumuluscellen of dat ze direct worden opgenomen vanuit de follikelvloeistof. Aangezien vele genen zijn geconserveerd over de zoogdiersoorten heen inclusief de mens kan de functie van bepaalde genen worden geëxtrapoleerd. Op grond hiervan werden in **Hoofdstuk 5** de mRNAs onderzocht in normale eicellen in vivo die de voornaamste metabole routes vertegenwoordigen in het lipide metabolisme. Uit de resultaten kan een model worden voorgesteld betreffende het transport van lange keten vetzuren (LCFA) tot in de eicel. De vetzuren worden verplaatst vanuit de extracellulaire omgeving naar het cytoplasma door vetzuur-translocase (FAT/CD36) om vervolgens na solubilisatie te worden getransporteerd door vetzuur bindende eiwitten (FABPs) naar de plaats waar ze worden gemetaboliseerd [51, 52]. Eenmaal na transport over het membraan worden de LCFA bestemd voor specifieke metabole doelen. Deze bevindingen samen met het hogere niveau aan CPT-1 mRNA wijzen erop dat vetzuren direct nodig zijn voor de hervatting van de meiose en dat β -oxidatie de voornaamste route is die bijdraagt aan de behoefte aan energie tijdens eicelrijping, en aan de toename in de mate van lipogenese tijdens het blastocyst stadium die nodig zou kunnen zijn om vroeg-embryonale ontwikkeling te ondersteunen. Vervolgens werd het niveau van mRNAs betrokken bij het lipide metabolisme in de normale eicellen vergeleken met het niveau in afwijkende eicellen verzameld uit de gestimuleerde runderen en met die van eicellen die in vitro waren gerijpt om nauwkeuriger te kunnen vaststellen op welke specifieke routes van het lipide metabolisme ontsparingen optreden. De afwijkende niveaus van verscheidene mRNAs wijzen er mogelijk op dat de intracellulaire vetzuursamenstelling niet juist is, o.m. afgenomen β -oxidatie, en verschaffen mogelijk een verklaring voor een beperktere voortgang van de meiose, lagere niveaus van ATP en een afgenomen ontwikkelingscompetentie voor deze eicellen. De significant lagere mRNA niveaus voor

acetyl CoA carboxylase α (ACC α) wat het belangrijkste enzym is dat de vetzuursynthese *de novo* controleert, kunnen deels een verklaring zijn voor de lagere ontwikkelingscompetentie van in vitro geproduceerde blastocysten. Dit wijst op een verandering in de hoeveelheid gesynthetiseerd lipide wat op zijn beurt leidt tot een tekort aan bepaalde LCFA die nodig zijn voor membraanintegriteit en structuur.

Hoewel ons onderzoek mRNAs heeft bepaald van de hoofdroute van het lipide metabolisme, zijn er een aantal beperkingen met betrekking tot de interpretatie van de data in relatie tot vetzuurmetabolisme. Als bijvoorbeeld in de beschouwing wordt betrokken dat er meer dan 30 reactiestappen nodig zijn om acetyl-CoA in triglyceriden om te zetten, dan zouden er vele stappen of genen kunnen zijn die de opbrengst aan eindproduct controleren. Bovendien is glucose naast de vetzuren een ander belangrijk te oxideren metabool substraat waarvan echter de rol als energiebron tijdens de eicelrijping wordt betwist [53-55]. Interactie tussen deze substraten worden verondersteld de mate te controleren waarin zij ieder worden geoxideerd, d.w.z. controle van de reciproque relatie tussen glucose en vetzuur oxidatie. Welke van de twee substraten de primaire regulator van energie in de eicel betreft is niet helder en vraagt om verder onderzoek.

CONCLUSIES EN VOORUITZICHTEN

Dit proefschrift heeft veel nieuwe basale eigenschappen onthuld van de eicel van het rund, en een aannemelijk model mogelijk gemaakt voor de regulatie van de hervatting van de meiose en juist functioneren van de eicel. Zo weten wij nu uit het onderzoek beschreven in **Hoofdstuk 3** dat de mechanismen van meiotisch arrest en hervatting in de eicel van het rund verschillende fosfodiesterases (PDE7) vereisen, en verder de betrokkenheid van G-eiwitten, de regulatoren van G-eiwit signaalvoorziening (RGS) in meiotische hervatting, de moleculaire componenten betrokken bij de scheiding van chromatiden, de regulatie van Ca²⁺ oscillatie activiteit en van de celcyclus. Het merendeel van deze genen werd voor het eerst in de zoogdiereicel geïdentificeerd. De uitdaging is echter om nu de potentiële liganden te onderkennen die deze genen activeren waarmee een antwoord kan worden verkregen op de vraag hoe het meiotisch arrest wordt opgeheven. Toekomstig onderzoek zal zeker helderheid verschaffen met betrekking tot deze openstaande kwesties. Bovendien werden in **Hoofdstuk 4** variaties beschreven in het niveau van verschillende mRNAs die van doorslaggevend belang zijn voor een juiste verplaatsing van organellen en scheiding van de chromosomen, waaruit de verstoorde functie van afscheiding van het poollichaampje en defecten in de cytoplasmatische rijping kunnen worden verklaard die

doorgaans worden waargenomen in de afwijkende eicellen van gestimuleerde dieren en in eicellen na in vitro rijping. Tenslotte, hebben wij zoals beschreven in **Hoofdstuk 5** nieuwe kennis verworven betreffende het transport van lange keten vetzuren naar binnen de eicel en betreffende de regulatie van de behoefte aan energie tijdens rijping en het blastocyst stadium op basis van lipide als substraat. Verder doet een afwijkende expressie van mRNAs betrokken bij het lipide metabolisme veronderstellen dat er een defect is in het vetzuurmetabolisme bij eicellen die in vitro worden gerijpt en eveneens in afwijkende eicellen uit gestimuleerde dieren en in blastocysten die in vitro zijn geproduceerd.

Hoewel de kennis op het gebied van eicelrijping snel is toegenomen gedurende de laatste paar jaren, dienen de moleculaire details nog te worden gecompliceerd zoals het bepalen van de sleutelmoleculen. Bovendien moeten fysiologische functies en regelmechanismen worden toegekend en opgehelderd, en moeten de raakvlakken met andere cellulaire systemen worden geëxploreerd. Vele nu ontbrekende onderdelen zullen worden gevonden met beschikbare biochemische methoden en met moleculaire en klassieke genetica samen met het vaststellen van de volgorde van het hele genoom. Functionele analyse zal niet alleen van groot belang zijn om de betreffende mechanismen te begrijpen maar zal ook de volledige opheldering versnellen van het regelsysteem van de eicel. Tenslotte voegt de ontdekking dat microRNA genen behoren tot de meer overvloedig voorkomende regelgenen in dieren [56] toe aan de complexiteit van ons inzicht in de regulatie van eicelrijping. De uitdaging is nu hoe de voordelen te plukken van de talrijke technieken en de biologische kennis in het veld van de voortplantingsbiotechnologie.

Referenties

[1-56] zie de Engelse tekst van de samenvattende discussie.

