

**HERKOMST EN DIFFERENTIATIE VAN SEX-
CELLENBIJ GEWERVELDE DIEREN, SPECIAAL
BIJ VISSSEN**

door prof. dr. L.P.M. Timmermans



**College bij het afscheid als hoogleraar in de algemene
dierkunde aan de Landbouwniversiteit te
Wageningen op donderdag 11 januari 1996.**

HERKOMST EN DIFFERENTIATIE VAN SEX-CELLEN BIJ GEWERVELDE DIEREN, SPECIAAL BIJ VISSSEN

Mijnheer de rector, dames en heren,

1. Predeterminatie versus epigenese

1.1 Inleiding

Geslachtscellen vormen de continuïteit van het leven tussen de opeenvolgende generaties en het is dan ook niet verwonderlijk dat veel onderzoek is gedaan naar de herkomst en de differentiatie van deze cellen.

Gedurende lange tijd gold algemeen de opvatting dat geslachtscellen zijn gepredetermineerd, d.w.z. dat reeds tijdens de allereerste celdelingen of klievingen van de bevruchte eicel de stamcellen van de latere geslachtscellen worden afgezonderd van de somatische of lichaamscellen om later de voortplantingscellen te leveren. Het concept van een ononderbroken geslachtscellijn door het hele dierenrijk, was het eerst geformuleerd door Weismann (1885, 1892; zie Nieuwkoop en Sutasurya 1979) en naderhand in sterke mate ondersteund door andere onderzoekers (Bounoure 1939; zie Nieuwkoop en Sutasurya 1979). Inderdaad werd bij vertegenwoordigers van diverse diergroepen, voornamelijk ongewervelden, zoals insecten, een specifiek kiemplasma aangetroffen aan de vegetatieve pool van eicellen. De cellen waarin dit kiemplasma terecht kwam bleken naderhand terecht te komen in de geslachtsplooiën die later ontwikkelen tot testis of ovarium. Bij de gewervelde dieren bleek een dergelijk kiemplasma echter slechts bij één groep voor te komen, nl. bij kikkers en padden (amfibiën).

Momenteel bestaat er grote belangstelling voor herkomst en differentiatie van geslachtscellen, daar onderzoekers transgene dieren willen produceren, met name voor wetenschappelijk onderzoek naar de regulatie van genexpressie tijdens de embryonale ontwikkeling, maar ook voor praktische toepassingen (stier Herman).

Geslachtscellen zijn aantrekkelijke kandidaten voor genmanipulatie, daar de genetische veranderingen dan worden doorgegeven aan volgende generaties. Om die reden willen onderzoekers weten op welk ontwikkelingsstadium de stamcellen van de geslachtscellen of primordiale geslachtscellen (PGCs) worden gevormd en op welk ontwikkelingsstadium ze zijn gedetermineerd, d.w.z. waarop ze nog uitsluitend geslachtscellen kunnen leveren. Ook wil men weten wat de specifieke factoren zijn die deze cellen zodanig beïnvloeden dat ze PGCs worden, én of geslachtscellen bij de verschillende klassen gewervelde dieren op overeenkomstige wijze worden gevormd.

In dit college zal de herkomst en differentiatie van PGCs kort worden behandeld voor amfibieën, vogels en zoogdieren, daar het onderzoek voornamelijk is uitgevoerd bij vertegenwoordigers van deze diergroepen. Die gegevens zullen dienen als een kader waarmee de gegevens, verkregen bij vissen, zullen worden vergeleken. Voor een enkel experiment zal worden gerefereerd aan het werk bij insecten. De literatuur over het onderzoek naar PGCs bij gewervelde dieren is gereviewd door Nieuwkoop en Sutasurya (1979). Voor recente literatuur wordt verwezen naar Lawson en Hage (1994, muis) en Ginsberg (1994, kip).

1.2 Stamcellen van geslachtscellen

Gedurende lange tijd was het niet bekend of kiemplasma-bevattende cellen de directe voorlopercellen van de geslachtscellen zijn of dat ze slechts de ontwikkeling van de geslachtsorganen of gonaden zouden stimuleren en daarin een de novo vorming van geslachtscellen uit het (somatische) gonadeweefsel. De gonaden van gewervelde dieren ontstaan als

geslachtsplooiën aan de dorsale wand van de lichaamsholte aan weerszijden van het dorsale mesenterium. Bij kikkers en padden komen de kiemplasma-bevattende cellen of PGCs terecht in het entoderm (het latere darmepitheel) en vervolgens migreren ze naar de geslachtsplooiën (Bounoure 1934, 1939; zie Nieuwkoop en Sutasurya 1979). Blackler (1962, zie Blackler 1966) deed experimenten bij *Xenopus* (klauwpad) op het zgn. "neurula"-stadium. Hij transplanteerde op dat stadium het PGC-bevattende deel van het entoderm van een mutant embryo, dat één kernlichaampje per kern bevatte, naar een overeenkomstige plaats bij een normaal embryo, waarbij per kern twee kernlichaampjes aanwezig zijn, nadat een vergelijkbaar deel van het entoderm bij de gastheerembryonen was verwijderd (Fig. 1). Het donorembryo ontwikkelde tot een steriel dier met kleine gonaden zonder geslachtscellen, maar het gastheerdier kreeg fertiele gonaden. Het bleek dat de geslachtscellen in de gastheer-dieren voornamelijk van het donortype waren (één nucleolus). Daarmee was overtuigend aangetoond dat geslachtscellen in de gonaden rechtstreeks afkomstig zijn van kiemplasma-bevattende cellen. De gonaden vormen derhalve de omgeving waarin de PGCs zullen differentiëren tot mannelijke of vrouwelijke geslachtscellen.

Bij het bananenvliegje (*Drosophila*) werd met een zeer vernuftig experiment aangetoond dat geslachtscellen in de gonaden rechtstreeks afkomstig zijn van afstammelingen van de eerste klievingscellen (de zgn. poolcellen), die gevormd worden aan de, kiemplasma bevattende, vegetatieve pool van de eicel (Illmensee en Mahowald 1974; Fig. 2).

Op basis van deze en andere experimenten wordt nu

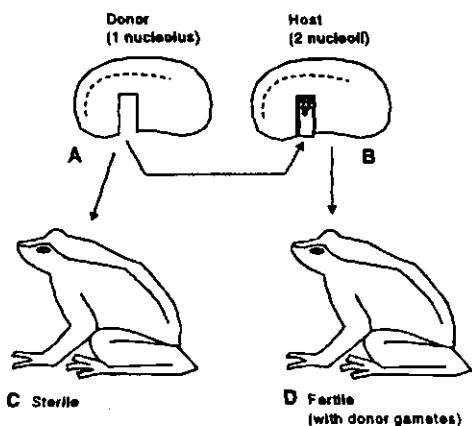


Fig. 1. Transplantatie op het neurulastadium bij Xenopus (klawwpad). Het gebied met PGCs van een mutant dier met één nucleolus per kern (A) werd getransplanteerd naar een gastheerneurula met twee nucleoli per kern (B). Uit de donorneurula ontstond een volwassen dier met steriele gonaden (C), terwijl in de gonaden van het gastheerdier donorgeslachtscellen ontwikkelden in de gonaden. (Naar Blackler 1962)

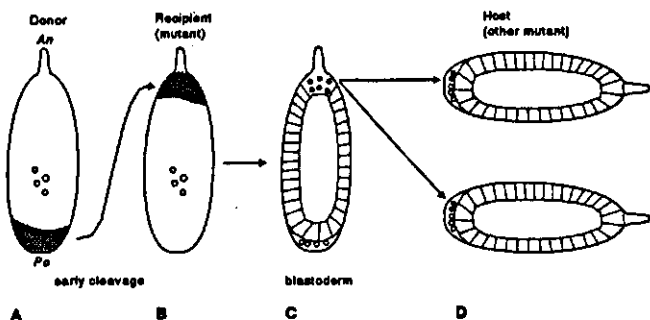


Fig. 2. Transplantatie van poolplasma bij Drosophila (bananenvliegje). Zie verder volgende pagina.

algemeen geaccepteerd dat geslachtscellen in de functionerende gonaden van volwassen dieren rechtstreeks afkomstig zijn van embryonale stamcellen, die buiten de geslachtsplooiën worden gevormd. Deze primordiale geslachtscellen (PGCs) zijn ronde of langwerpige cellen met een grote lichtgekleurde kern. Ze zijn altijd groter dan somatische cellen.

1.3 Herkomst van PGCs bij salamanders

De algemene opvatting dat geslachtscellen zijn gepredetermineerd bleek niet te kloppen voor een andere groep van de amfibieën: de salamanders. Nieuwkoop (1947) kreeg op basis van zijn transplantatie-experimenten bij een salamandersoort (*Triturus*) evidentie dat PGCs in die diergroep epigenetisch ontstaan in het ventro-laterale mesoderm, via inductie door het entoderm (Fig. 3D). Hoewel het epigenese-concept al eerder was voorgesteld voor geslachtscellen van enkele groepen ongewervelde dieren (Cambar 1956, zie Nieuwkoop en Sutasurya 1979), was dit nieuw voor gewervelde dieren. De resultaten van Nieuwkoop werden bevestigd bij andere salamandersoorten (zie

Toelichting Fig. 2. Vegetatief poolplasma (Po, bevat poolgranula) van donor-eicellen (A) werd geïnjecteerd aan de voorzijde van eicellen van een mutant (B). De eicellen ontwikkelden tot blastodermstadia (= blastulastadia). Enkele cellen aan de vóorzijde bleken poolgranula te bevatten (C). Deze cellen werden getransplanteerd naar de achterzijde van gastheerblastodermen (D) (cellen aan de voorzijde kunnen de gonaden niet bereiken). Nakomelingen van de hieruit ontwikkelde vliegen bleken genetische kenmerken van donordieren te bezitten (naar Illmensee en Mahowald 1974).

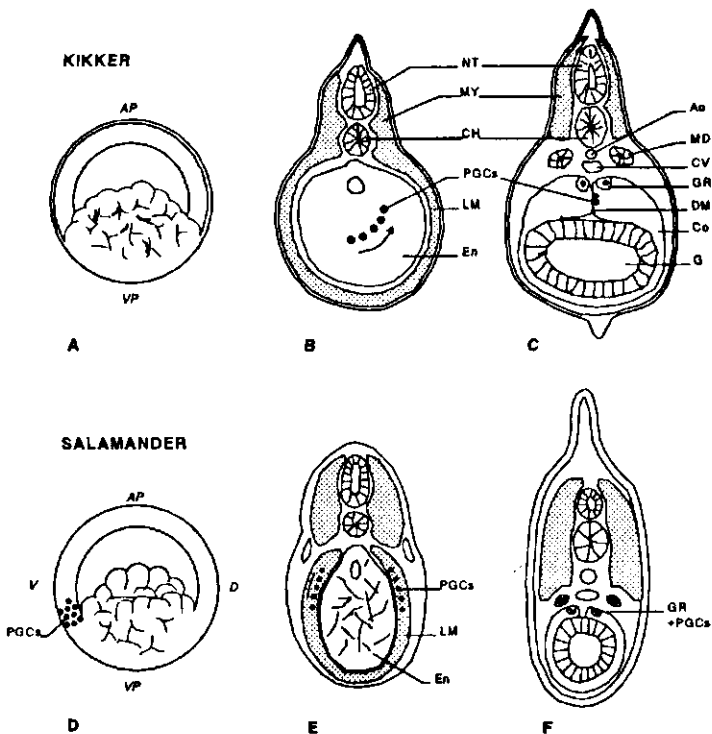


Fig. 3A,B,C. Migratie PGCs bij kikkers en padden.
A. Blastula, enkele entodermcellen bevatten kiemplasma.
B. Migratie van PGCs door het entoderm. **C.** Verdere migratie naar de geslachtsplooiën (via het dorsale mesenterium). (Verkl. afkortingen op p. 34/35)

Fig. 3D,E,F. Migratie PGCs bij salamanders.
D. Blastula met PGCs in het ventrolaterale mesoderm.
E. Migratie van PGCs door het laterale mesoderm. **F.** PGCs gearriveerd in geslachtsplooiën (GR).
 (Naar Nieuwkoop en Sutasurya, 1979)

Nieuwkoop en Sutasurya 1979). In aanvullende transplantatie-experimenten werd aangetoond dat door de inducerende invloed van het entoderm, PGCs konden worden gevormd in alle delen van de nog "totipotente" animale helft (epiblast) van de vroege salamandergastrula (Sutasurya en Nieuwkoop 1974; zie ook Nieuwkoop 1991). (Tijdens de normale ontwikkeling komt het entoderm alleen in contact met de vegetatieve rand van de animale helft van het embryo, (Fig. 3D).

Nieuwkoop concludeerde uit deze experimenten dat de herkomst van de PGCs bij salamanders geheel anders is dan bij kikkers en padden. Bovendien zijn de PGCs bij kikkers en padden gedurende enige tijd aanwezig in het entoderm en migreren ze door het entoderm en het dorsale mesenterium naar de geslachtsplooiën (Fig. 3A, B, C). Bij salamanders daarentegen, ontstaan de PGCs in het ventro-laterale mesoderm (dat wordt geïnduceerd in de animale helft (= epiblast) van het vroege gastrula-stadium en ze migreren via de meso-entodermale ruimte naar de geslachtsplooiën (Fig. 3D, E, F). Bij salamanders bevatten de PGCs kiemplasma-achtige elementen. Deze elementen verschijnen echter pas op een relatief laat ontwikkelingsstadium, nl. in migrerende PGCs. Ze zijn aanwezig als kleine perinucleaire lichaampjes (nuage) en ze bestaan uit fibro-granulair RNA en eiwit in nauwe samenhang met mitochondria. In elektronen-microscopische opnamen vertoont het nuage sterke gelijkenis met het kiemplasma van kikkers en padden (zie Eddy 1984).

1.4 Herkomst van PGCs bij zoogdieren en vogels

Nadat was aangetoond dat bij salamanders de geslachtscellen epigenetisch ontstaan, kreeg de vraag naar de herkomst van geslachtscellen hernieuwde

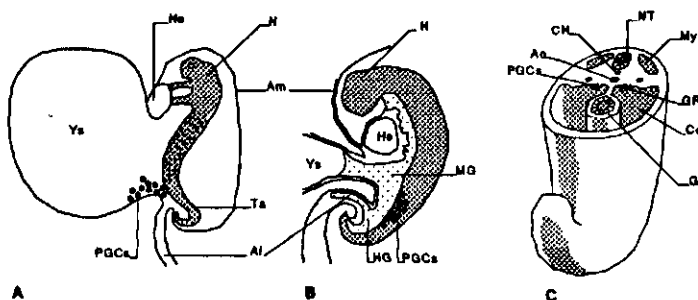


Fig. 4. Migratie PGCs bij muizen.

A. PGCs in het extra-embryonale caudale mesoderm (7-7.5 dpc). B.C. PGCs aangekomen in de geslachtsplooien (na migratie via einddarm en het dorsale mesenterium. (Fig. 4A,B naar Nieuwkoop en Sutasurya, 1979; fig. 4C naar Larsen, 1993). (Verkl. afkortingen op p. 34/35).

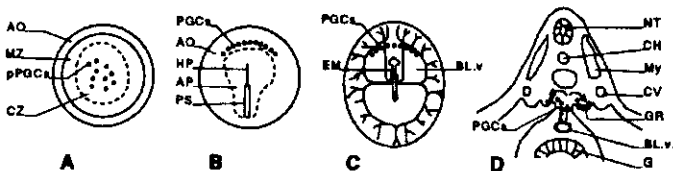


Fig. 5. Herkomst en migratie PGCs bij kippen.

A. Precursor PGCs (pPGCs) ontstaan in het centrale deel (CZ) van de area pellucida (epiblast) voor de aanvang van de gastrulatie (Ginsburg 1994). B. Tijdens de gastrulatie worden de PGCs passief verplaatst naar het extra-embryonale entoderm, de "germinal crescent" vóór het kopgebied van het embryo. C.D. Via bloedvaten worden ze naar de geslachtsplooien getransporteerd (naar Deuchar, 1975). (Verkl. afkortingen op p. 34/35).

belangstelling. Bij de andere groepen gewervelde dieren is het meeste werk gedaan bij zoogdieren (muis) en vogels (kip). Bij geen van beiden konden de PGCs vanaf de eicel worden getraceerd. Men dient echter wel voor ogen te houden dat wat bekend is over muis en kip niet kan worden gegeneraliseerd voor alle zoogdier- en vogelsoorten.

Met behulp van monoclonale antilichamen die specifiek reageren met PGCs van muizen, kon worden aangetoond dat voorlopercellen (precursors) van PGCs (pPGCs) oorspronkelijk aanwezig zijn in de epiblast (waaruit mesoderm en ectoderm ontstaan) op het vroege gastrulastadium (Hahnel en Eddy 1986). Met behulp van "tracer"technieken, waarbij klievende cellen worden "gemerkt" met een fluorescerende kleurstof die wordt doorgegeven aan de afstammelingen van de gemerkte cel, konden PGCs worden geïdentificeerd in de epiblast van muize-embryonen op een vroeger ontwikkelingsstadium, nl. 6.5 dag na de coïtus (dpc) (Lawson en Hage 1994). Vanaf 7-7.5 dpc zijn de PGCs aanwezig in het extra-embryonale caudale mesoderm (Fig. 4A). De PGCs bevatten dan het enzym alkalisch fosfatase waardoor ze gemakkelijk kunnen worden herkend. Ze delen sterk en ze migreren tussen 8.5 en 12.5 dpc via het einddarm entoderm en het dorsale mesenterium naar de geslachtsplooien aan de dorsale wand van de lichaamsholte (Fig. 4B, C). Tijdens de migratie neemt hun aantal sterk toe. Kiemplasma-achtige elementen (nuage), alhoewel zeer schaars, zijn waargenomen in migrerende PGCs vanaf 9 dpc (zie Eddy 1984). Er is algehele overeenstemming, gebaseerd op experimentele evidentie, dat de PGCs in muizen epigenetisch ontstaan (zie Gardner e.a. 1985).

Bij vogels zijn de klievingen meroblastisch, d.w.z. in slechts een deel van het ei, het animale deel, ontstaan

cellen. Hierbij ontstaat een schijfvormige laag cellen op de ongekliefde dooier. De pPGCs ontstaan in het centrale deel of area pellucida van deze celschijf (Fig. 5A) vóór de aanvang van de gastrulatie (Ginsburg 1994). Na de vorming van de hypoblast onder de area pellucida (die hierna epiblast wordt genoemd), dalen de pPGCs uit de epiblast af in de hypoblast. Tijdens de gastrulatie worden de PGCs in de hypoblast naar de voorzijde van het embryo verplaatst. Uiteindelijk zijn de PGCs gelocaliseerd in het extra-embryonale entoderm, de zg. "germinal crescent", vóór het kopgebied van het embryo (Fig. 5B). De PGCs gaan sterk delen en kunnen worden herkend aan hun grotere afmeting en bovendien bevatten ze veel glycogeen. Nadat de bloedvaten zijn gevormd worden de PGCs via de bloedvaten getransporteerd naar het gebied van de geslachtsplooiën. Daar verlaten de PGCs de vaten, migreren over een korte afstand en dringen het gonade-epitheel binnen (Fig. 5C). Kiemplasma-achtige elementen (nuage) zijn schaars en komen pas op een later ontwikkelingsstadium voor (stadium 4 van Hamburger/Hamilton; Climent Peris e.a. 1979). Er is evidentie dat de PGCs epigenetisch ontstaan, alhoewel het definitieve bewijs voor die hypothese nog ontbreekt.

1.5 Herkomst van PGCs bij vissen

Een groot aantal beschrijvingen is gewijd aan de herkomst en de differentiatie van PGCs bij vissen, speciaal beenvissen (zie reviews van Johnston 1951 en Vivien 1964). Het recente onderzoek is vooral uitgevoerd bij de karper (Nedelea en Steopoe 1970; Parmentier en Timmermans 1985), bij de prachtbarbeel (Timmermans en Taverne 1989; Gevers e.a. 1992A, B) en bij de Medaka (rijstvisje). Het onderzoek bij het laatstgenoemde visje betreft voornamelijk electronen-

microscopisch onderzoek (Satoh 1974, Hogan 1978, Hamaguchi 1982, 1985).

Bij beenvissen is de klieving meroblastisch, evenals bij vogels. Na een reeks klievingen ontstaat aan de animale pool een kap van cellen (blastoderm) op de ongekliefde dooier: dit is het blastula-stadium. Er ontstaat vervolgens een meerkernig cytoplasmalaagje (Yolk Syncytial Layer of YSL) als grenslaag tussen blastoderm en dooier en het blastoderm begint uit te breiden over de dooier (epibolie). Zodra 50% van de dooier door het blastoderm is omgeven, beginnen cellen aan de rand van het blastoderm naar binnen te rollen in animale richting (involutie, Wood en Timmermans 1988), gevolgd door convergente bewegingen naar één zijde van het blastoderm: de dorsale zijde (Fig. 6). Hier ontstaat een opeenhoping van cellen: de embryonale as. Inmiddels gaat het epibolieproces door tot de hele dooier door het blastoderm is omgeven. De embryonale as wordt dan langer en geleidelijk wordt daaraan de lichaamsvorm zichtbaar: een kopgebied en een romp waarin de vorming van somieten begint (Fig. 6E). Een mediane dwarsdoorsnede op het 100% epiboliestadium laat zien dat de drie kiembladen zijn gevormd, nl. ectoderm (met een verdikking op de plaats waar de neurale buis zal worden gevormd), mesoderm en entoderm (Fig. 7A). Dit is het vroegste stadium waarop de PGCs kunnen worden onderscheiden (onderzocht bij de prachtbarbeel, Timmermans en Taverne 1989; Gevers e.a. 1992b). De PGCs zijn te herkennen aan hun grotere omvang, hun grote lichtgekleurde kern en hun specifieke locatie tussen mesoderm en entoderm. Ze zijn niet aan te tonen met een specifieke cytochemische kleurmethode zoals bij de muis (alkalisch fosfatase) of de kip (glycogeen). Met electronenmicroscopisch onderzoek kon worden waargenomen dat de PGCs nuage bevatten vanaf het

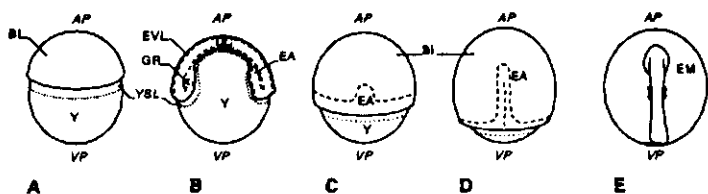


Fig. 6. Epibolie bij de prachtbarbeel, karper en zebravis
 A. Epibolie (uitbreiding) van blastoderm (BL) over de dooier (Y). B. (Doorsnede) Op het 50% epiboliestadium begin de involutie (inrolling). C. Ten gevolge van convergentie ontstaat daarna de embryonale as (EA). Deze wordt langer. E. Na 100% epibolie worden kopgebied en romp zichtbaar. (Verkl. afkortingen op p. 34/35).

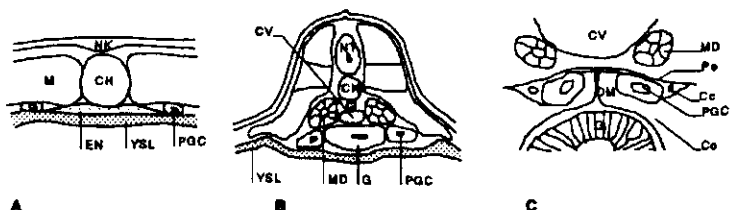


Fig. 7. Bij karperachtige vissen (karper, prachtbarbeel, zebravis) kunnen PGCs worden onderscheiden vanaf het 100% epibolie-stadium. De PGCs bevatten dan nuage (bij de prachtbarbeel vanaf 9 uur na bevruchting). B. Na 24 uur en 48 uur zijn de PGCs bij de prachtbarbeel tussen darm (G) en nierbuisjes (MD) gelegen. C. Vanaf 3 dagen na bevruchting zijn ze gelegen in de geslachtsplooiën. (Verkl. afkortingen op p. 34/35).

100% epibolie-stadium (10-12 uur na bevruchting). Op 24 uur en 48 uur na bevruchting zijn de PGCs gelocaliseerd in nauw contact met de nierbuisjes en de darm (Fig. 7B). Vanaf drie dagen na bevruchting zijn de PGCs gelegen in de geslachtsplooiën (Fig. 7C). Ze lijken passief op die plaats terecht te komen; actieve migratie-bewegingen werden niet waargenomen. Bij de zebravis en de karper verloopt deze ontwikkeling op overeenkomstige wijze.

Het aantal PGCs in embryonen van de prachtbarbeel is klein (gemiddeld 18 per embryo) en blijft klein tot een laat larvaal stadium (drie weken na bevruchting, Timmermans en Taverne, 1989). Een vergelijkbare mitotische rustperiode, waarin het aantal PGCs klein blijft, werd waargenomen bij de karper (gemiddeld 23 per embryo) en duurde 6 weken (Parmentier en Timmermans 1985). Die rustperiode is opmerkelijk daar in diezelfde periode de overige weefsels actief delen en ontwikkelen: van een gegeneraliseerde larve tot een juveniele vis, kenmerkend voor zijn soort (Osse 1990). Het kleine aantal niet-mitotisch actieve PGCs temidden van snel delende somatische cellen, deed ons besluiten de mitotische activiteit van precursor PGCs (pPGCs) tijdens epibolie en gastrulatie te onderzoeken. Dit werd uitgevoerd bij de prachtbarbeel, met behulp van radio-actief gelabeld thymidine (^3H -thymidine). Thymidine is een bouwsteen van DNA, het wordt tijdens de celdeling in het DNA ingebouwd. Door radio-actief gelabeld thymidine toe te dienen worden delende cellen radio-actief gelabeld en ze kunnen met behulp van de autoradiografiemethode worden waargenomen. Uit dit onderzoek kon worden geconcludeerd dat pPGCs hun mitotische activiteit beëindigen tussen 50% en 100% epibolie (tabel 1). Hiermee werd evidentie verkregen dat de stamcellen van de geslachtscellen gescheiden worden

Table 1. 3H-THYMIDINE LABELING OF PGCs IN *BARBUS CONCHONIUS*

| Age of embryos (hr) at time of injection | Stage | PGCs in larvae at 48 hours | | |
|---------------------------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------|--------------------------|
| | | Numbers of larvae | Mean number PGCs* | Percent labeled PGCs* |
| 2 | cleavage and onset | 2 | | |
| 3 | epiboly | 3 | 14 (\pm 3,4) | 100 (-) |
| 5 | 50% epiboly | 1 | | |
| 6 | and onset | 2 | 18,3 (\pm 2,7) | 79 (\pm 16,4) |
| 7 | gastrulation | 4 | | |
| 8 | completion | 4 | | |
| 9 | epiboly and gastrulation | 6 | 18,3 (\pm 1,8) | 45 (\pm 20,2) |
| 10 | onset | 4 | 19,3 (\pm 2,3) | 1 (\pm) |
| 11 | somitogenesis | 3 | | |

*: Standard deviations shown in parentheses. Embryos were injected with ^3H -thymidine at hourly intervals between 2 and 11 hours after fertilization. Specimens were fixed at the age of 48 h, for at that age the PGCs could be easily distinguished.

van de somatische cellen tussen het 50% (5 à 6 uur na bevruchting) en 100% (10 uur na bevruchting) epiboliestadium, dus vanaf de aanvang van de gastrulatie op het 50% epiboliestadium. De PGCs konden echter pas worden herkend vanaf het 100% epiboliestadium. Getracht werd de PGCs te herkennen op een vroeger ontwikkelingsstadium door monoclonale antilichamen te gebruiken, opgewekt tegen spermatozoa (Parmentier en Timmermans 1985) of tegen spermatogonia (Van Winkoop en Timmermans 1992). Deze monoclonale antilichamen reageerden specifiek met geslachtscellen in volwassen gonaden, maar ook met larvale PGCs, echter niet met embryonale PGCs. Ze konden dus niet worden gebruikt om embryonale PGCs te herkennen. Wel bleek dat de PGCs vanaf het vroege larvale stadium (3 dagen na bevruchting bij de karper), macromoleculen in hun

plasma-membraan bevatten, die karakteristiek zijn voor geslachtscellen, inclusief rijpe spermatozoa (Parmentier en Timmermans 1985).

De vraag rijst of de PGCs bij beenvissen zijn gepredetermineerd of dat ze epigenetisch ontstaan. Transplantatie-experimenten kunnen niet gemakkelijk worden uitgevoerd daar het aantal PGCs klein is en ze bovendien diep in het embryo zijn gelegen. De beschikbaarheid van fluorescerende labels voor levende cellen maakt het echter mogelijk om zgn. "cell-lineage" studies uit te voeren (de bestemming van afstammelingen van bepaalde cellen onderzoeken). In een dergelijk onderzoek kan het lot van een bepaald blastomeer worden gevolgd tijdens de ontwikkeling, daar alleen afstammelingen van die gelabelde blastomeer de label ontvangen. Dit type onderzoek is speciaal vruchtbaar bij diersoorten met transparante embryonen en die komen bij veel beenvissen voor. Kimmel en Warga (1987) hebben een dergelijk onderzoek uitgevoerd bij de zebravis en zij concludeerden dat op het 64-cel stadium het lot van de blastomeren volledig onvoorspelbaar was. Zij hadden echter de PGCs buiten beschouwing gelaten. Het zou heel goed mogelijk kunnen zijn dat er voor PGCs wel stamcellen bestaan op een vroeg klievingsstadium. Dat onderzoek werd door Gevers e.a. (1992a) uitgevoerd bij de prachtbarbeel. Gevers injecteerde embryonen eveneens op het 64-cel stadium (Fig. 8), met Lucifer Yellow-dextran als label. Ze kweekte de embryonen vervolgens op tot het 10-12 somietstadium (12 uur na bevruchting) daar dan de PGCs goed herkenbaar zijn in histologische doorsneden (zie fig. 7A). In 12 (27%) van de 45 embryonen waarbij een blastomeer van de onderste cellaag was geïnjecteerd, vond ze label in PGCs, terwijl geen label werd

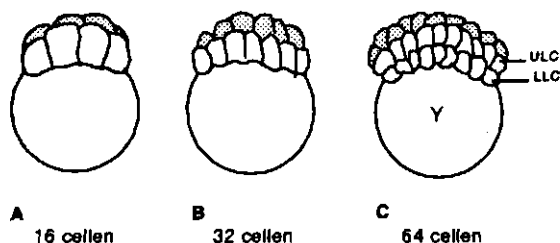


Fig. 8. Klievingen bij karperachtigen.
(De helft van het aantal cellen is weergegeven).
UL, bovenste cellaag; LLC, onderste cellaag.

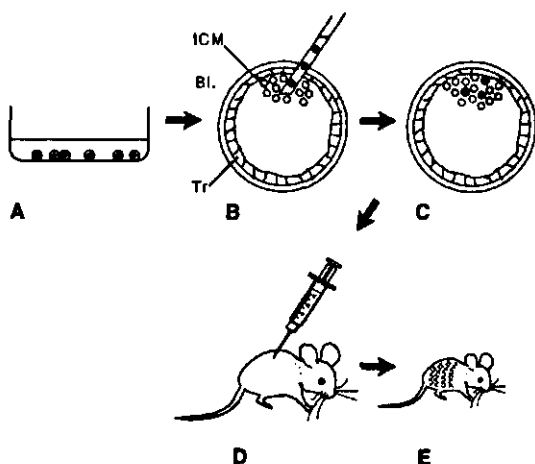


Fig. 9. Injectie van gekweekte cellen, afkomstig van een gepigmenteerde muizestam (A) in een blastocyst (blastulastadium) van een albino-muizestam (B). Deze blastocyst (Bl) wordt geïmplanteerd in de uterus van een gastmoeder (C,D). Er ontstaat een chimaer jong (naar Steward en Mintz, 1981). ICM, inner cell mass; Tr, trophoblast.

aangetroffen in PGCs na injectie van een blastomeer van de bovenste cellaag (30 embryonen). In alle gevallen, waarin PGCs waren gelabeld, werden ook somatische cellen gelabeld en in geen van de geïnjecteerde embryonen werden alleen PGCs gelabeld. Hiermee werd evidentie verkregen dat op het 64-cel stadium geen stamcel voor geslachtscellen aanwezig is. Dit maakt het waarschijnlijk dat de PGCs bij beenvissen epigenetisch zullen ontstaan en mogelijk op overeenkomstige wijze als in hogere vertebratengroepen, maar dit moet nog worden bewezen.

1.6 Conclusie

Uit het onderzoek over de herkomst van geslachtscellen blijkt, dat bij gewervelde dieren predeterminatie een uitzondering is, daar het alleen voorkomt bij één groep van de amfibieën (kikkers en padden). Er bestaat zelfs twijfel of er werkelijk sprake is van predeterminatie in die groep. Niettemin is het duidelijk dat herkomst en migratie bij kikkers en padden sterk afwijkt van die processen bij salamanders. Nieuwkoop concludeerde op grond daarvan dat beide groepen een verschillende fylogenetische herkomst hebben (zie Nieuwkoop 1991). Met betrekking tot salalmanders, zoogdieren en vogels blijkt dat PGCs ontstaan in de epiblast op het late blastula-stadium of vroege gastrula-stadium. De PGCs verschillen echter met betrekking tot hun locatie en hun migratie naar de geslachtsplooien. Dat zijn waarschijnlijk geen essentiële verschillen. Bij de karper en de prachtbarbeel lijken de PGCs op passieve wijze in de geslachtsplooien terecht te komen, zonder actieve celbewegingen.

Echter, de vraag of ze door inductie uit de epiblast ontstaan, zoals bij salamanders, vogels en zoogdieren, moet nog worden beantwoord.

2. Primordiale geslachtscellen als medium voor genmanipulatie

2.1 Zoogdieren

Met het doel het wetenschappelijk inzicht in de regulatie van genexpressie te verdiepen en ook met het oog op praktische toepassingen, zijn methoden ontwikkeld voor genmanipulatie bij primordiale geslachtscellen (PGCs). Dit is vooral bij zoogdieren gedaan, met de muis als model. Echter, de PGCs van zoogdieren zijn vrijwel ontoegankelijk voor manipulatie, daar zij pas ontstaan na implantatie van het embryo in de baarmoeder. Daarom werd een andere benadering gekozen. Het is bekend dat in de gonaden van bepaalde muizerassen zgn. teratocarcinoma-gezwellen kunnen ontstaan, die uit gedifferentieerde weefsels en ongedifferentieerde cellen bestaan. Deze gezwellen ontstaan uit PGCs. De ongedifferentieerde teratocarcinoma-cellen kunnen gedurende lange tijd worden gekweekt, terwijl zij het vermogen tot delen behouden (EC-cellen). Illmensee en Stevens (1979) slaagden erin de dochtercel van één zo'n EC-cel in een blastocyst (= blastula stadium) te injecteren en daarbij een normaal chimaer muize-jong te verkrijgen (Fig. 9). Afstammelingen van de donorcel (gemerkt met een iso-enzym) bleken te hebben bijgedragen aan alle weefsels van de chimaere muis. De andere dochtercel was in een dun glasbuisje gebracht en geïmplantéerd in het onderhuidse bindweefsel van een volwassen muis. Uit deze cel bleek een tumor te ontstaan. Dit experiment toonde duidelijk aan dat onder invloed van een normale omgeving de kwaadaardige tumorcel zich gedroeg als een normale ongedifferentieerde embryonale cel, echter in een abnormale omgeving groeide hij uit tot een gezwel. Om bijdragen van donorcellen gemakkelijk te kunnen herkennen, werd voor transplantatie-experimenten

gebruik gemaakt van een muizeras dat homozygoot was voor een zwarte vacht als donor en een muizeras dat homozygoot was voor een witte vacht als gastheer. Mintz en Illmensee (1975) waren als eersten in staat aan te tonen dat ongedifferentieerde cellen van een teratocarcinoma-tumor, na overbrengen in een gastheerblastocyst, PGCs konden leveren. Dit lukte in die tijd alleen met cellen die afkomstig waren van een in vivo tumor. Naderhand slaagden Steward en Mintz (1981) er in om ook geslachtscel-chimaera's te produceren van gekweekte teratocarcinoma-cellen (EC-cellen). Sinds enkele jaren is het mogelijk om zgn. "inner cell mass" cellen (die binnen de blastocyst zijn gelegen en die het latere embryo leveren) in kweek te brengen (ES-cellen). Gebleken is dat deze cellen na transplantatie eveneens PGCs kunnen leveren (zie Rossant 1993). Onderzoekers hebben echter ook geprobeerd om PGCs te isoleren uit embryonen en deze in kweek te brengen. Isolatie van PGCs bij 8.5 dpc muize-embryonen bleek mogelijk en ze konden worden gekweekt op een laag van voedingscellen met bepaalde eigenschappen (nl. een membraan-geassocieerde Steel factor) en toevoeging van enkele groeistoffen aan het voedingsmedium (leukemia inhibitory factor [LIF] en basic fibroblast growth factor [bFGF]; Labosky e.a. 1994). Onder die condities waren de PGCs in staat te overleven en te delen (EG-cellen). De afstammelingen hadden dezelfde eigenschappen als ES-cellen. Ze vormden echter teratocarcinoomgezwollen wanneer ze in naakte muizen werden geïnjecteerd.

Na injectie van EG-cellen in gastheerblastocysten, ontstonden chimaere muizen; een aantal ervan bevatte PGCs met eigenschappen van de donorcellen. Hiermee was het bewijs geleverd dat gekweekte PGCs (EG-cellen) het vermogen om geslachtscellen te vormen

hadden behouden.

Er is ook onderzoek uitgevoerd om na te gaan of de PGCs nog pluripotente EG-cellen kunnen leveren, nadat ze in de gonaden terecht zijn gekomen. Dit bleek mogelijk na isolatie uit 12.5 dpc geslachtsplooiën. Het lukte echter niet meer na isolatie uit 15.5 dpc embryonen (Labosky e.a. 1994). Na vergelijking van EG-cellen met ES-cellen, werden geen duidelijke verschillen gevonden. Geconcludeerd kan worden dat zowel gekweekte EG- als ES-cellen kunnen worden gebruikt voor gen-manipulatie via de geslachtscelijn.

2.2. Vogels

Slechts enkele publicaties zijn verschenen over chimaera's bij kippen waarbij van donorcellen afkomstige nakomelingen werden geproduceerd (zie Carsience e.a. 1993). Deze chimaera's werden verkregen via injectie van geïsoleerde area pellucida cellen (stadium X van Eyal-Giladi en Kochov, zie Carsience e.a. 1993) afkomstig van zwarte leghorns, in gastheerembryonen van witte leghorns op hetzelfde ontwikkelingsstadium. De donorcellen waren echter slechts bij 2 van de 106 chimaera's in de gonaden terecht gekomen. Na korte bestraling van de gastheerembryonen met een ⁶⁰Cobalt-bron, voorafgaand aan de transplantatie van donorcellen, werd een uitgebreide kolonisatie van de gastheergonaden verkregen. Carsience e.a. (1993) trokken uit deze resultaten de conclusie dat de bestraling de mitotische activiteit in het gastheerembryo remt, waardoor de verhouding tussen donor- en gastheercellen sterk toeneemt met als gevolg in de gonaden een veel groter aantal PGCs, die afkomstig zijn van donorcellen.

2.3 Vissen

Met betrekking tot beenvissen zijn recent geslachtscel-chimaera's verkregen bij de zebravis (Lin e.a. 1992) en bij het rijstvisje (Ozato en Wakamatsu 1994). Beide onderzoeksgroepen isoleerden cellen van gepigmenteerde embryonen op het mid-blastula stadium en injecteerden die cellen in albino embryonen van hetzelfde ontwikkelingsstadium. Een groot aantal van deze embryonen ontwikkelde tot chimaere vissen. Nadat eicellen hiervan waren bevrucht met sperma van albino-vissen, bleek 17-20% van de chimaera's gepigmenteerde nakomelingen te produceren. Hiermee was het bewijs geleverd dat uit donorcellen in de gastheerembryonen PGCs waren ontstaan. De weg naar verdere manipulaties met PGCs van vissen ligt hierdoor open. In de experimenten van Lin e.a. (1992) waren de donorcellen in enkele gevallen afkomstig van embryonen die niet alleen waren gepigmenteerd, maar die ook transgeen waren voor een bepaald genconstruct (RSV-lac Z). De auteurs konden aantonen dat de gepigmenteerde nakomelingen van enkele geslachtscel-chimaera's het transgenconstruct hadden geërfd. Hierdoor werd bevestigd dat de zgn. geslachtscel-chimaera's afkomstig waren van getransplanteerde midblastula donorcellen. In de oude literatuur (zie Johnston 1951) werd gesuggereerd dat stamcellen van geslachtsellen bij vissen zouden afstammen van de grenslaag (YSL) tussen celkap en dooier. De resultaten van Lin e.a. (1992) bewijzen echter dat dat niet het geval is en dat toekomstige geslachtsellen zich bevinden temidden van de diepe cellen in het embryo. Deze resultaten worden ondersteund door experimenten van Gevers en Timmermans (1991), die in geen enkel geval label aantroffen in blastomeren, en derhalve ook niet in PGCs, nadat de YSL was geïnjecteerd met een

"cell-lineage" marker.

2.4 Conclusies

Overtuigend is aangetoond dat geslachtscel-chimaera's kunnen worden geproduceerd via injectie van gekweekte embryonale cellen in gastheerblastocysten (muis) of via injectie van vroege blastulacellen in gastheerembryonen (kip, vis) van hetzelfde ontwikkelingsstadium. De eigenschappen van donordieren komen derhalve in het nageslacht terug.

Bij muizen bleek het mogelijk om geïsoleerde "inner cell mass" cellen (ES-cellen) en recent eveneens 8.5 dpc PGCs (EG-cellen) in kweek te brengen zonder verlies van het vermogen om geslachtscel-chimaera's te produceren. Bovendien is aangetoond bij de muis dat PGCs, kort na aankomst in de gonade-aanleggingen (12.5 dpc), nog het vermogen bezitten geslachtscel-chimaera's te leveren. Dit vermogen is echter verdwenen op 15.5 dpc.

De verkregen resultaten leveren betrouwbare methoden voor genmanipulatie van de geslachts-celijn en overdracht naar de nakomelingen. De aldus verkregen chimaere dieren zijn zeer waardevol voor de analyse van ontwikkelingsbiologische processen.

Ook voor praktische toepassingen is er nu veel mogelijk. De methoden zouden ook aangewend kunnen worden voor medische toepassingen, zoals herstel van defecte genen. Hier raakt men echter ethische kwesties die nog veel discussies vereisen, om zorgvuldige afwegingen mogelijk te maken.

Hoewel het onderzoek over PGCs nog veel ontbrekende puzzle-stukken kent, kunnen we nu al zeggen dat er ook toepassingsmogelijkheden zijn. Zoals er sinaasappelen

zonder pit bestaan, lijkt het ooit mogelijk om vissen te kweken die veel visvlees produceren en weinig of geen energie besteden aan het maken van geslachtscellen. Dat zou in economisch opzicht zeer aantrekkelijk zijn voor de teelt van vis.

Tot slot een terugblik

Aan het slot van mijn voordracht wil ik graag kort terugblikken op de afgelopen periode.

Ik ben vervuld van grote dankbaarheid dat ik veertig dienstjaren in goede gezondheid werkzaam heb mogen zijn. Veertien jaar heb ik gewerkt op het destijds grote Zoologische Laboratorium in Utrecht. Aan die periode bewaar ik de beste herinneringen.

In 1972 werden Jan Osse en ik beiden benoemd in Wageningen, Jan Osse als hoogleraar, ikzelf aanvankelijk als lector, naderhand hoogleraar. Jan Osse heeft zojuist als voorzitter van de vakgroep deze vergadering geopend.

Beste Jan, we hebben steeds in goede harmonie en vriendschap samengewerkt, al waren we het bepaald niet altijd met elkaar eens. Je grote openheid en generositeit heb ik altijd zeer bewonderd.

De eerste twee jaren waren zéér moeilijk, de werksfeer ronduit verlamd. Daar weten ook de medewerkers van het eerste uur, Nand Sibbing en Henri Stroband over mee te praten. Job Bouw, ik ben je erkentelijk voor de steun die je de eerste maanden bood als waarnemend voorzitter van de vakgroep. In 1974 werd de toenmalige dierkunde opgesplitst in een te vormen vakgroep Dieroecologie en onze vakgroep. Daarna ontstond een zeer plezierige werksfeer. De vakgroep

had jonge enthousiaste medewerkers, zéér bereid taken aan te pakken. Ik bewaar goede herinneringen aan de alternatieve thee onder de zonnebloemen tijdens de werkpauzes in die tijd.

Veel inzet was nodig want alle colleges en onderwijscollecties voor de nieuwe studierichting Biologie moesten worden opgebouwd. Het aantal medewerkers was veel te klein, maar gelukkig kwamen collega's uit Utrecht en Leiden ons te hulp. Gedurende twee jaar verzorgden zij als gastdocenten een flink deel van de colleges en praktika.

Ik wil hier alsnog de helpers van het eerste uur bedanken voor hun belangeloze hulp: Hanneke Geelen, Aldo Voute, Viggo Labordus, Jo van den Biggelaar, wijlen Wim Arnolds, Jaap van der Land, Joop van Lenteren en Pieter Heinzbroek.

Na die periode konden wij onze taken zelf aan. Om de collecties op te bouwen reisden we enkele zomers met een ploegje naar het Marien Biologisch Station in Banyuls aan de Middellandse zee en we keerden met auto's vol materiaal terug. Ik bewaar goede herinneringen aan glaasjes Banyuls onder de platanen, 's avonds op het dorpsplein genoten samen met Nand Sibbing, Jan en Joke Rombout en de Osse's.

Hoewel het opzetten van het onderwijs veel tijd vergde, kwam geleidelijk ook het onderzoek op gang en er ontstonden secties in de vakgroep. Henri Stroband, Paul Barends en Jan Rombout, jullie vormden, met de analisten Anja Thiele (later Taverne-Thiele) en Hans van de Meer, de groep histologie-ontwikkelingsbiologie samen met een wisselend aantal tijdelijke medewerkers. Er was een goede saamhorigheid, maar soms waren we het ook hevig oneens met elkaar. Dat werd dan echter

weer snel bijgelegd en ik heb goede herinneringen aan de heerlijke maaltijden bij jullie thuis waarbij dat gebeurde. Henri Strobant, jij bent 24 jaar lang mijn eerste medewerker gebleven en ik bewaar aan onze lange samenwerking goede herinneringen. Je had en hebt een grote werkkraft en je toonde veel creativiteit bij onderwijs en onderzoek. Je onderscheidde je echter vooral door je sterk sociale instelling. Ik dank je voor je vele goede bijdragen. Het onderwijs in de ontwikkelingsbiologie, dat je van mij hebt overgenomen, is bij jou in goede handen. Ik ben ervan overtuigd dat het ontwikkelingsbiologisch onderzoek door jou, samen met Truus te Kronnie en de ondersteuning van Henk Schipper, John Samallo en momenteel Carine Stevens op goede wijze zal worden voortgezet, voortaan onder leiding van Jan Osse, al zal de komende zware personeelsreductie ongetwijfeld z'n tol eisen.

In 1980 promoveerden Henri Strobant en Jan Rombout als eersten in de vakgroep. Ik heb respect voor de grote zelfstandigheid waarmee jullie hebben gewerkt. Dat geldt ook voor Cor Lamers die enkele jaren later volgde. Ik besloot de vervaardigde histologische vissepreparaten te gebruiken voor een studie naar de ontwikkeling van de primordiale geslachtscellen. Dat bleek niet eenvoudig te lukken. Hans van der Meer verleende voor een deel van zijn tijd ondersteuning en ik moet zeggen, Hans, dat jouw inspanningen, al ging het vaak fout, de basis voor het verdere geslachtscelwerk hebben gelegd. Je opvolgers, de analisten Nico Taverne, Jos van de Boogaart, Ronald Booms, John Dulos en momenteel Henk Schipper hebben allen goede bijdragen geleverd en ze zijn bovendien mede-auteur van artikelen geworden. Mijn dank voor jullie bijdragen. Belangrijk geslachtscelonderzoek is voorts

door Henk Parmentier als gast-onderzoeker en door de BION-promovendi Petra Gevers en Aart van Winkoop gedaan. Een serie goede publicaties is het resultaat van jullie werk.

De vakgroep bestond enkele jaren na de start uit drie secties: de functionele diermorfologie, de celbiologie en immunologie, en de histologie/ontwikkelingsbiologie, die elk met vrij grote zelfstandigheid opereerden. Ik bewaar goede herinneringen aan de Sinterklaasfeesten, de vele promotiefeesten en niet in het minst aan de sfeervolle Kerstlunch. Ik zal dat allemaal zeer missen. Groot respect heb ik steeds gehad voor de grote inzet bij onderwijs en onderzoek bij zowel de sectie functionele diermorfologie als de sectie celbiologie met de hoogleraren, respectievelijk Jan Osse en Wim van Muiswinkel voorop. Dat geldt overigens ook voor mijn sectie.

Zijn er dan nooit nare dingen gebeurd? Zeker wel.

In de vakgroep zijn echter alle problemen steeds in goed overleg opgelost en de uitkomsten in het vakgroepbestuur bekrachtigd. En zo hoort het ook.

Voor het goed functioneren van een vakgroep met veel basis-onderwijs, zoals de onze, zijn amanuenses en secretaresses heel belangrijk. De amanuensistaak was bij Sytze van den Berg en zijn medewerkers in goede handen. Het 1e secretariaat werd de eerste tien jaar met veel inzet behartigd door Gerda van Wijhe-Eggink, het was daarna in goede handen bij Hannie Vertregt en momenteel Anke Hana en Hilda Valk. Voor jullie grote inzet en efficiënte ondersteuning ben ik zeer erkentelijk. Uiteraard is een goede proefdiervoorziening zeer belangrijk en met name vissen vereisen een intensieve zorg. De vissekwiek is steeds op goede en efficiënte

wijze uitgevoerd door Sietze Leenstra en zijn ploeg. Mijn dank daarvoor.

Tenslotte wil ik Wim Valen noemen die een creatief tekentalent combineert met een gedegen beheersing van micro- en macrofotografie. Veel dank voor de vele en deskundige hulp.

In het voorgaande heb ik mij beperkt tot de vakgroep. De tijd ontbreekt om in te gaan op de samenwerking die er was en nog is met diverse Zodiac-vakgroepen en met onderzoeksgroepen in binnen- en buitenland.

Heb ik nog een boodschap? Ja, inderdaad.

In het verleden was het mogelijk bij de Landbouwuniversiteit te werven naar onderzoeksprojecten voor één jaar. Deze boden de mogelijkheid te onderzoeken of een bepaald onderzoeksproject ook uitvoerbaar zou zijn. Na zo'n jaar was er dan doorgaans voldoende basis om met succes te werven naar tweede geldstroomprojecten. Nu vakgroepen door het strenge bezuinigingsregime de mogelijkheid missen om de haalbaarheid van onderzoeksprojecten uit te zoeken, zouden zulke éénjaars onderzoeksprojecten zonder twijfel zeer nuttig zijn. Wellicht een suggestie voor de onderzoekscholen.

Ook zou ik willen pleiten voor het beschikbaar stellen van fondsen voor onderwijsverbetering, met name voor basisvakken, daar het de vakgroepen momenteel aan tijd ontbreekt dit zelf te doen. Daarbij denk ik aan een full-time plaats voor één jaar en soms wel twee jaar per project. In het verleden waren die mogelijkheden er, en ze zijn heel vruchtbaar geweest. Ik denk daarbij aan het werk van Jan Lammers en Henri Stroband en deels Louis Jagt, die twee jaar lang al hun tijd in zo'n project

voor het propaedeuse dierkunde-onderwijs hebben gestopt. Dat zou nu opnieuw nodig zijn.

Ik dank U voor uw aandacht.

References

- Blackler, A.W. (1962) Transfer of primordial germ cells between two subspecies of *Xenopus laevis*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 10: 641-51.
- Blackler, A.W. (1966) Embryonic sex cells in Amphibia. *Adv. Reprod. Physiol.* 1: 9-28.
- Carsience, R.S., Clark, M.E., Verrinder Gibbins, A.M. & Etches R.J. (1993) Germline chimeric chickens from dispersed donor blastodermal cells and compromised recipient embryos. *Development* 117: 669-675.
- Deuchar, E.M. (1975) Cellular interactions in animal development. Chapman and Hall, London, p.25.
- Climent Peris, S., Götzens, V.J. & Dominguez, L. (1979) "Nuage" in the primordial germ cells of the chick embryo. *Zbl. Vet. Med. C. Anat. Histol. Embryol.* 8:200-204.
- Eddy, E.M. (1984) Origin of the germ cell line. In: J Van Blerkom & PM Motta (eds): *Ultra-structure of reproduction*. Martinus Nijhoff, Boston, The Hague, pp. 1-12.
- Eyal-Giladi, H. & Kochav, S. (1976) From cleavage to primitive streak formation: a complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick. *Develop. Biol.* 49: 321-37.
- Gardner, R.L., Lyon, M.F., Evans, E.P. & Burtenshaw, M.D. (1985) Clonal analysis of X-chromosome inactivation and the origin of the germ line in the mouse embryo. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 88: 349-363.
- Gevers, P. & Timmermans, L.P.M. (1991) Dye-coupling and the formation and fate of the hypoblast in the teleost fish embryo, *Barbus conchoniuis*. *Development* 112: 431-438.
- Gevers, P., Dulos, J., Boogaart, J.G.M. van den &

- Timmermans, L.P.M. (1992a) A study on cell lineage, especially the germ cell line, in embryos of the teleost fish, *Barbus conchonioides*. Roux's Arch Dev Biol 201: 275-283.
- Gevers, P., Dulos, J., Schipper, H. & Timmermans, L.P.M. (1992b) Origin of primordial germ cells, as characterized by the presence of nuage, in embryos of the Teleost fish *Barbus conchonioides*. Eur. J. Morphol. 30 (3): 195-204.
- Ginsburg, M. (1994). Primordial germ cell formation in birds. In: J. Marsh & J. Goode (eds): *Germ-line development*, Ciba Foundation Symposium 182, Wiley Chichester, New York. pp. 52-61.
- Hahnel, A.C. & Eddy, E.M. (1986) Cell surface markers of mouse primordial germ cells defined by two monoclonal antibodies. Gamete Res. 15: 25-34.
- Hamaguchi, S. (1982) A light and electron-microscopic study on the migration of primordial germ cells in the teleost, *Oryzias latipes*. Cell Tissue Res. 227: 139-151.
- Hamaguchi, S. (1985) Changes in the morphology of the germinal dense bodies in primordial germ cells of the teleost, *Oryzias latipes*. Cell Tissue Res. 240: 669-673.
- Hogan, J.C. (1978) An ultrastructural analysis of cytoplasmic markers in germ cells of *Oryzias latipes*. J. Ultrastruct. Res. 62: 237-250.
- Illmensee, K. & Mahowald, A.P. (1974) Transplantation of posterior polar plasm in *Drosophila*. Induction of germ cells at the anterior pole of the egg. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71: 1016-1020.
- Illmensee, K. & Stevens, L.C. (1979) Teratomas and chimeras. Scientific American 240: 86-99.
- Johnston, P.M. (1951) The embryonic history of the germ cells of the largemouth black bass, *Micropterus*

- salmoides salmoides* (Lacépède). J. Morphol. 88: 471-543.
- Kimmel, C.B. & Warga, R.M. (1987) Interminate cell lineage of the zebrafish embryo. Dev. Biol. 124: 269-280.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. & Schilling T.F. (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. Dev. Dynamics 203: 253-310.
- Labosky, P.A., Barlow, D.P. & Hogan, B.L.M. (1994) Embryonic germ lines and their derivation from mouse primordial germ cells. In: J Marsh and J Goode (eds): *Germline development*. Ciba Foundation Symposium 182, Wiley, Chichester, New York. pp. 157-168.
- Lawson, K.A. & Hage W.J. (1994) Clonal analysis of the origin of primordial germ cells in the mouse. In: J Marsh & J Goode (eds): *Germline development*. Ciba Foundation Symposium 182. J. Wiley, Chichester, New York. pp. 68-84.
- Larsen, W.J. (1993) Human Embryology. Churchill Livingstone, New York. p 118.
- Lin, S., Long, W., Chen, J. & Hopkins, N. (1992) Production of germ-line chimeras in zebrafish by cell transplants from genetically pigmented to albino embryos. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4519-4523.
- Mintz, D. & Illmensee K. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. 72: 3585.
- Nedelea, M. & I. Steopoe (1970) Origine, caractères cytologiques et comportement des gonocytes primaires pendant l'embryo-génèse et chez les jeunes larves de *Cyprinus carpio* L. (Téléostéens). Anat. Anz. 127: 338-346.
- Nieuwkoop, P.D. (1947) Experimental investigations on the origin and determination of the germ cells, and on

- the development of the lateral plates and germ ridges in the urodeles. *Arch. Néerl.Zool.* 8: 1-203.
- Nieuwkoop, P.D. & Sutasurya, L.A. (1979) Primordial germ cells in the chordates. *Embryogenesis and Phylogenesis*. Cambridge University Press, Cambridge, London. pp. 187.
- Nieuwkoop, P.D. (1991) I. The different origin of the primordial germ cells (PGCs) in various groups of vertebrates. *Proc. Kon. Ned. Akad. v. Wetensch.* 94(1): 103-110.
- Osse, J.W.M. (1990) Form changes in fish larvae in relation to changing demands of function. *Neth. J.Zool.* 40(1-2): 362-385.
- Ozato, K. & Wakamatsu, Y. (1994) Developmental Genetics of Medaka. *Develop. Growth & Differ* 36(5): 437-443.
- Parmentier, H.K. & Timmermans, L.P.M. (1985) The differentiation of germ cells and gonads during development of carp (*Cyprinus carpio* L.). A study with anti-carp sperm monoclonal antibodies. *Journal of Embryology and experimental Morphology* 90: 13-32.
- Rossant, J. (1993) Stem cells: immortal germ cells? *Curr. Biol.* 3: 47-49.
- Sato, N. (1974) An ultrastructural study of sex differentiation in the teleost *Oryzias latipes*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 32: 195-215.
- Stewart, T.A. & Mintz, B. (1981) Successive generations of mice produced from an established culture line of euploid teratocarcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 6314-6318.
- Sutasurya, L.A. & Nieuwkoop, P.D. (1974) The induction of the primordial germ cells in the urodeles. *Wilhelm Roux' Arch. Entwicklungsmech. Organismen* 175: 199-220.

- Timmermans, L.P.M. & Taverne, N. (1989)
Segregation of primordial germ cells: their numbers and fate during early development of *Barbus conchonus* (Cyprinidae, Teleostei) as indicated by ³H-Thymidine incorporation. *Journal of Morphology* 202: 225-237.
- Winkoop, A. van & Timmermans, L.P.M. (1992)
Phenotypic changes in germ cells during gonadal development of the common carp (*Cyprinus carpio*). *Histochemistry* 98: 289-298.
- Wood, A. & Timmermans, L.P.M. (1988) Teleost epiboly: a reassessment of deep cell movement in the germ ring. *Development* 102: 575-585.

Verklaring der afkortingen

- AO, area opaca
Ao, aorta (lichaamsslagader)
Al, allantois
Am, amnion
AP, animale pool (in fig. 5: area pellucida)
Bl.v., bloedvat
Cc, cysteel
CH, chorda
Co, coeloom (lichaamsholte)
CV, cardinale vene
DM, dorsaal mesenterium (ophangband darm)
D, dorsaal
dpc, days post coitum
EA, embryonale as
EM, embryo
EVL, enveloping layer (deklaag)
En, entoderm
G, gut (darm)
GR, gonadal ridge (geslachtsplooi) (in fig. 6: kiemring)
H, hoofd
He, hart
HG, hind gut (einddarm)
HP, head process (kopuitsteeksel)
LM, laterale mesoderm
M, mesoderm
MD, mesonephric duct (primaire urineleider)
MG, mid gut (middendarm)
MY, myotoom
MZ, marginale zone van area pellucida
NK, neural keel (neurale verdikking bij de aanvang van de vorming van de neurale buis)
NT, neural tube (neurale buis)
Pe, peritoneum (buikvlies)

pPGCs, presumptieve PGCs
PS, primitiefstreep
RSV-lac Z, Rous sarcoma virus lac Z plasmide DNA
TA, tail (staart)
V, ventraal
VP, vegetatieve pool
Y, yolk cell (dooiercel)
Ys, yolk sac (dooierzak)
YSL, yolk syncytial layer (meerkernig cytoplasmalaagje
tussen celkap en dooier bij vissen)