

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/57512> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Zhu, Kongju

Title: A time-space translation mechanism for patterning the vertebrate anteroposterior axis

Date: 2017-11-29

Samenvatting en Discussie

Tijdens de embryonale fase ontwikkelen structuren langs de kop-staart as, ook wel de anterieure – posterieure as (A-P as) genoemd, progressief en tijdsafhankelijk: structuren aan de anterieure zijde ontwikkelen eerst gevolgd door de ontwikkeling van de posterieure zijde. Het is duidelijk dat deze ontwikkelingen tijdsafhankelijk zijn gereguleerd. Uit eerder onderzoek blijkt dat een ‘BMP/ anti-BMP afhankelijk tijd-ruimte vertaal mechanisme’ de tijd-ruimte coördinatie patronen van de romp formatie in kaart kan brengen. Het belangrijkste component van dit mechanisme is een BMP afhankelijk proces dat in tijd gevold kan worden en dat Hox genen sequentieel tot expressie brengt.

Een belangrijke functie van Hox genen is de regulatie van positionele onderdelen langs de A-P as tijdens de embryonale ontwikkeling. Een van de duidelijkste eigenschappen van de Hox genen is hun ‘collineariteit’: de expressie volgorde van deze genen in tijd (temporele collineariteit) en ruimte (ruimtelijke collineariteit) tijdens de vroege ontwikkeling van de A-P as komen overeen met de 3’ naar 5’ locatie op de chromosomen. De typische activatie sequentie van Hox genen in een BMP rijke omgeving is tijdens de vroege ontwikkeling in veel verschillende soorten gevonden: ‘non organiser mesoderm’ (NOM) in *Xenopus*, ‘posterior primitive streak’ in kip en muis. Dit komt overeen met eerdere bevindingen die laten zien dat een verrijking van BMP essentieel is voor de activatie van Hox genen. Ondanks dat Hox genen in een BMP verrijkte omgeving in een specifieke sequentie tot expressie komen overlappen de expressie domeinen grotendeels zonder de vertoning van een duidelijk patroon in de ruimte. De hypothese die wordt gesteld vanuit het ‘tijd-ruimte vertaal mechanisme’ suggereert dat deze domeinen sequentieel worden blootgesteld aan anti-BMP signalen vanuit de ‘Spemann organiser’ wanneer cellen bewegen tijdens gastrulatie. Dit fixeert de Hox gen expressie waardoor het tijdspatroon zich vertaalt in een ruimt patroon (tijd-ruimte vertaling). Met dit mechanisme kunnen positionele elementen sequentieel gespecificeerd worden op de A-P as. Dit proefschrift poogt de volgende twee vragen te beantwoorden: 1. Hoe wordt tijdsafhankelijke collineariteit tot stand gebracht? En 2. Is BMP/ anti-BMP betrokken in de patroonvorming tijdens de ontwikkeling van de kop?

Een fascinerende vraag waar ontwikkelingsbiologen al langere tijd hun hoofd over buigen is waarom de expressie van Hox genen als een golf door de Hox clusters beweegt. Het dogma is dat Hox collineariteit zijn oorsprong vindt in een tandem duplicatie van een ur-Hox gen tijdens evolutie. Ook is het gebaseerd op het sequentieel openen van het chromatine complex

in de 3' naar 5' richting, daar waar de Hox clusters gelokaliseerd zijn. Hierdoor worden er sequentieel steeds meer Hox genen beschikbaar voor transcriptie. Gezien het openen van het Hox chromatine complex goed correleert met Hox gen activatie en cel beweging tijdens gastrulatie is dit een ogenschijnlijk aantrekkelijke verklaring. Maar, het is lastig te verklaren hoe cellen op de A-P as op een tijd specifieke manier communiceren, zodat dezelfde combinatie van Hox genen tot expressie gebracht wordt als collineariteit alleen gereguleerd wordt door het openen van het chromatine complex. Daarnaast moeten cellen in een later stadium op de posterieure as zorgdragen voor een synchroon lopende afname van de anterieure Hox gen expressies. Deze complexiteiten zijn een duidelijke indicatie voor een ander mechanisme dat de celsynchronisatie en celcoördinatie reguleert in weefsels. Er zijn twee mogelijke verklaringen: regulatie van Hox genen wordt door een cel cyclus of andere mechanismen die in tijd gevolgd kunnen worden gecoördineerd, zoals de somitogenese klok. Alternatief zouden Hox genen gecoördineerd kunnen worden door zelfregulatie, bijvoorbeeld door Hox-Hox interacties.

In **Hoofdstuk 2** testen we ectopische expressie van vier verschillende Hox genen (*hoxd1*, *hoxb4*, *hoxa7* and *hoxb9*) in *noggin*-geinjecteerde en wild type embryo's. Omdat Hox gen expressie tijdens gastrulatie wordt geïnitieerd door BMP en *noggin* de initiële expressie van Hox genen onderdrukt fungeert *noggin* als een antagonist. Ectopische expressie van één van de Hox genen in *noggin*-geinjecteerde embryo's induceert de expressie van een aantal Hox genen. Interessant genoeg ontstond er alleen Hox gen inductie posterieur aan het gen dat ectopisch tot expressie is gebracht. Dit suggereert het bestaan van posterieure inductie – de inductie van posterieure Hox genen door anterieure Hox genen. Deze bevinding is consistent met de resultaten vanuit de ectopische Hox gen expressie in wild type embryo's. Het onderzoek naar wild type embryo's liet zien dat de expressie van posterieure Hox genen een repressief effect heeft op de expressie van anterieure Hox genen in een 'gain-of-function' opstelling (dit wordt posterieure dominantie genoemd in dit proefschrift – repressie van anterieure Hox genen door expressie van posterieure Hox genen). Er vinden dus zowel inducerende als repressieve interacties plaats tussen Hox genen.

Door het Hox gen *hoxb4* ectopisch tot expressie te brengen, ver voor het moment dat het normaal tot expressie komt, proberen we de verschillende functies van de posterieure inductie en posterieure dominantie interacties tijdens A-P patroonvorming in kaart te

brenge. Dit heeft de expressie van de Hox sequentie vervroegd zonder de volgorde in de sequentiële expressie te verstoren. Bovendien hadden genen (*hoxb4*, *hoxb6/c6*, and *hoxb9*) die tot expressie zijn gebracht door de overexpressie van *hoxb4* een anterieure expressie in een later stadium (st. 26). Dit resultaat onderstreept de relatie tussen tijdsafhankelijke en ruimtelijke collineariteit en ondersteunt het tijd-ruimte vertaal model dat uitlegt dat tijdsafhankelijke en ruimtelijke collineariteit nodig is voor ruimtelijke patroonvorming. Het werd duidelijk dat als de laatste paraloge groep Hox genen (*hoxd13*) als eerst tot expressie komen *hoxb4* geen repressief effect heeft op de expressie van *hoxd1* tot in st. 15. In tegenstelling tot posterieure inductie, welke activeert tijdens gastrulatie in het NOM waar BMP concentraties hoog zijn, activeert posterieure dominantie alleen na gastrulatie in het neurectoderm en paraxiale mesoderm waar BMP concentraties aanzienlijk lager zijn. Deze resultaten wijzen naar de verschillende functies van posterieure inductie en posterieure dominantie tijdens patroonvorming op de A-P as. Het inductieve effect van Hox interacties (posterieure inductie) heeft een duidelijke sleutel positie in de tijdsafhankelijke regulatie. Daarnaast spelen de repressieve interacties (posterieure dominantie) een belangrijke rol in het paraxiale mesoderm en neurectoderm waar in een ruimtelijk collineair Hox patroon ontstaat. Deze bevindingen komen overeen met een volledig overlappend patroon van Hox gen expressie tijdens gastrulatie in het NOM. Ook komt dit overeen met het patroon dat zich voordoet als de laatste groep Hox genen activeren vanaf neurulatie waarbij geen of gedeeltelijke overlap van de Hox gen expressie ontstaat. In alle waarschijnlijkheid veroorzaken de inductieve en repressieve interacties tussen Hox genen een dynamisch evenwicht wat dynamische metastabiele expressie zones mogelijk maakt. Patroon regulatie is een voorbeeld van een dergelijk dynamische stabiliteit.

We hebben een *Hoxc6* 'los-of-function' (LOF) uitgevoerd met antisense morfolino's zoals beschreven in **Hoofdstuk 3**, deze resultaten ondersteunen nogmaals de bevindingen van hoofdstuk 2. Het resultaat van LOF van dit enkele Hox gen in *Xenopus* kikkers is een dramatische verandering in het fenotype. Het knipt het posterieure deel van de embryonale as af op de nek-romp grens, dit is de grens van *hoxc6* expressie aan de anterieure zijde. De expressies van Hox genen aan de 3' anterieure kant van deze grens zijn verhoogd dan wel onaangetaast, terwijl de expressies van Hox genen aan de 5' posterieure kant van deze grens verloren zijn geraakt. In vergelijking met muizen is het fenotypische effect in *Xenopus* kikkers veel extremer, voor zowel LOF van het *hoxc6* gen als wel LOF van de complete

hox6 paraloge groep. Dit is mogelijk te verklaren door verschillend gedefinieerde formaties van de A-P as tussen muizen en kikkers. In de kikker wordt de formatie van de A-P as volledig gedefinieerd in een vroeg stadium terwijl in muizen deze formatie wordt gedefinieerd over een veel langere periode door axiale groei. Een mogelijk alternatieve verklaring komt voort uit discrepanties tussen gen ‘knockdown’ met behulp van anti-sense en gen ‘knockout’ door middel van deletie door genetische mutaties. Deze observatie is een discrepantie tussen veel verschillende soorten. Vaak worden deze discrepanties verklaard door ‘off-target’ effecten van de anti-sense reagentia (bijvoorbeeld morfolinos). Desalniettemin, uit recente studies blijkt dat, door het proteoom met het transcriptoom te vergelijken van *egf17* mutanten en morfanten, slechts deletie door mutaties, maar niet anti-sense ‘knockdown’, genetische compensatie veroorzaken. Dit zou goed het dramatische effect van *Hoxc6* LOF in kikker ‘knockdown’ met morfolinos verklaren in vergelijking met gen ‘knockout’ studies in muizen. Onze hypothese, dat vertebraten axiale patroonvorming wordt gemedieerd door door collineaire Hox-Hox interacties, is sterk ondersteund doordat het effect van *Hoxc6* LOF op Hox gen expressie goed correleert met de ‘gain-of-function’ resultaten uit Hoofdstuk 2.

Hoofdstuk 4 richt zich vooral op het beantwoorden van vraag twee uit dit proefschrift: Is BMP/ anti-BMP betrokken in de patroonvorming tijdens de ontwikkeling van de kop? Tijdens de eerste stadia van ons onderzoek bleek dat een behandeling met anti-BMP, door middel van een injectie met *noggin* op een specifiek moment in de blastula en gastrula fases van wild type *Xenopus* embryo’s, het definiëren van de A-P as sequentieel tot een halt roept op specifieke posities, inclusief het kop gedeelte. Dit effect is vergelijkbaar waargenomen in experimenten met zebravis embryo’s. Waarbij ook gen expressie analyses het progressieve arrest, door BMP inhibitie, van de A-P as ondersteunen. Hieruit blijkt dat in zebravis embryo’s een anti-BMP behandeling, vanaf halverwege blastula tot halverwege gastrula, de gen expressie van vier anterieure genen sequentieel reguleert: *six3*, een marker van het voorhersenen; *otx2*, een marker van het voorhersenen en het middenhersenen; *gbx1*, een rostrale achterhersenen marker, en *hoxb1b*, een marker voor de caudale achterhersenen. Deze resultaten wijzen uit dat BMP mogelijk betrokken is bij de tijdsafhankelijke A-P as patroonvorming van de kop. Verder beschrijft Hoofdstuk 4 de behandeling van anti-BMP op BMP4 geïnjecteerde *Xenopus* embryo’s op specifieke momenten in de embryonale ontwikkeling. Deze behandeling fixeert de expressie van *six3*, *otx2*, *gbx2* en *hoxd1* wat

wederom het boven genoemde verdere ondersteuning biedt. In deze gen sequentie is *hoxd1* als laatst gepositioneerd en het meest posterieure component, deze genen liggen sequentieel geordend langs de A-P as in de kop en zijn complementair aan de sequentie van Hox genen in de romp. De genen in deze sequentie kunnen niet door Hox genen tot expressie worden gebracht op een temporale wijze. De sequentiële fixatie van deze genen door BMP inhibitie op specifieke momenten is daarom vermoedelijk te wijten aan een BMP gereguleerd tijdsafhankelijk proces ‘upstream’ van deze gen collectie. Het tijd gereguleerde mechanisme in de kop en de regulatie van de ruimtelijke Hox gen expressie in de romp zijn vermoedelijk geïntegreerde tijdsafhankelijke processen. Deze geïntegreerde processen kunnen worden gestabiliseerd door anti-BMP signalen en vertalen zich naar ruimtelijke gen expressie patronen.

Hoofdstuk 5 is een conceptuele analyse over de vorming van vertebraten A-P as patronen aan de hand van het BMP/anti-BMP tijd-ruimte vertaal model. Deze analyse laat zien dat een plethora aan beslis momenten betrokken zijn tussen de verschillende transitie van axiale domeinen, bijvoorbeeld ‘extreme anterior domain (EAD)’, kop, nek, romp, buik en staart domeinen. Voor correcte A-P as definiëring zijn er interacties nodig tussen externe signaaltransductie routes en de axiale tijdsafhankelijke processen op deze beslis momenten. Recapitulerend, dit proefschrift onderzoek hoe BMP signalen de vertebraten A-P as definieert door invloed uit te oefenen op de sequentie waarin Hox genen tot expressie worden gebracht. De Hox genen liggen op het romp deel van deze as en komen sequentieel tot expressie in een tijdsafhankelijke en ruimtelijke manier tijdens de kop-staart formatie. De sequentiële activatie van Hox genen is BMP afhankelijk en tegelijkertijd afhankelijk van collineaire Hox-Hox interacties. De tijdsafhankelijke informatie waar Hox genen voor coderen kan worden gestabiliseerd door anti-BMP signalering wat zich vervolgens vertaald naar informatie over ruimtelijke ordening. In het kop gedeelte van de as bevindt zich een nog onbekende collectie van genen, welke gefixeerd kunnen worden door BMP inhibitie en waarin tijdsafhankelijke informatie schuil gaat. BMP inhibitie van deze gen sequentie resulteert in een ruimtelijk expressie van genen over de A-P as.