



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Spatio-temporal gene expression analysis from 3D in situ hybridization images

Welten, M.C.M.

Citation

Welten, M. C. M. (2007, November 27). *Spatio-temporal gene expression analysis from 3D in situ hybridization images*. Leiden Institute of Advanced Computer Science, group Imaging and Bio-informatics, Faculty of Science, Leiden University. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/12465>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/12465>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Samenvatting

In de ontwikkelingsbiologie wordt activiteit van genen, genexpressie, bestudeerd om inzicht te krijgen in ontwikkelingsprocessen, en om modellen te ontwikkelen voor ziekten en afwijkingen. In dit proefschrift zijn biologische en digitale methoden ontwikkeld, toegepast en gevalideerd om genetische en morfologische vraagstukken tijdens embryonale ontwikkeling te kunnen analyseren in 3D, in plaats en in tijd.

Op basis van deze technieken hebben we een protocol ontwikkeld, een zogenaamde workflow, om grote aantallen driedimensionale genexpressie-patronen in plaats en op verschillende tijdstippen tijdens de ontwikkeling.

Het bestuderen van ontwikkelingsprocessen heeft specifieke uitdagingen. Er komen vele genen tegelijkertijd tot expressie en veel processen vinden in relatief korte tijd plaats. Genexpressie-patronen komen niet altijd overeen met de anatomische structuren, en expressie – patronen van verschillende genen moeten met elkaar vergeleken worden in plaats en tijd om het verloop van de ontwikkelingsprocessen en de vorming van organen te kunnen volgen. Er zijn verscheidene technieken voor de analyse van genexpressie voorhanden; de meeste gegevens over genexpressie zijn echter alleen in 2D beelden.. Om genexpressie en de differentiatie van structuren te kunnen volgen gedurende de ontwikkeling, zijn zowel spatiële gegevens, in 3D, als gegevens over tijd noodzakelijk. Met huidige molecuair-biologische en beeldanalyse technieken kunnen dergelijke analyses gedaan worden.

In de onderzoeksgroep Imaging and Bioinformatics van de Imagery and Media Group is een “3D Atlas of Zebrafish development “ ontworpen. Deze atlas is bedoeld als online referentie voor onderzoekers en kan uiteindelijk gebruikt worden om genexpressie-patronen op te projecteren. Als aanvulling op deze 3D Atlas is momenteel een “zebrafish gene expression database” in ontwikkeling. Deze genexpressie-database kan beschouwd worden als de molecuair – biologische tegenhanger van de 3D Atlas. Genexpressie-gegevens in plaats en tijd, kunnen geprojecteerd worden op de anatomische structuren van een virtueel embryo in de 3D Atlas, en vergeleken worden op co-expressie (tegelijkertijd tot expressie komen) en co-lokalisatie (op dezelfde plaats tot expressie komen). Zo krijgt men een goed inzicht in de staat van ontwikkeling zelf, en in activiteit van genen die betrokken zijn bij de ontwikkeling van specifieke weefsels of organen.

Deze spatio-temporele gegevens moeten op een of andere wijze gegenereerd worden. Hiertoe hebben wij een werkschema ontwikkeld, gebaseerd op fluorescente *in situ* – hybridisatie (FISH), confocale laser scanning microscopie (CLSM), 3D reconstructie met – in dit geval – TDR-3Dbase software en software voor data-analyse Frequent Episode Mining in Developmental Analysis (FEDA). Met deze tools kunnen grote 3D gegevens van genexpressie verkregen worden, op betrekkelijk eenvoudige en non-destructieve wijze.

Om 3D opnamen van genexpressie-patronen mogelijk te maken, hebben we een protocol ontwikkeld voor fluorescente *in situ* hybridisatie (FISH): ZebraFISH.

In **Hoofdstuk 2** wordt de methode en techniek van ZebraFISH besproken. Voor deze fluorescente *in situ* hybridisatie wordt gebruik gemaakt van Tyramide Signal Amplification (TSA), gebaseerd op het veelgebruikte *in situ* hybridisatie – protocol voor zebravis (Thisse et al. 1993). Deze kleurmethode levert in een korte reactietijd een sterk signaal op, terwijl er weinig achtergrondkleuring optreedt.

Het voordeel van deze benadering is dat van genexpressie-patronen, aangetoond met behulp van ZebraFISH, 3D opnamen gemaakt kunnen worden m.b.v. confocale laser scanning microscopie (CLSM).

We hebben de technieken en het werkschema toegepast op twee case studies tijdens de embryonale ontwikkeling:

- 1) De vroege ontwikkeling van de zebravis.
- 2) De latere ontwikkeling van zebravis en vergelijking met andere modelorganismen.

Case study Early zebrafish development

In **Hoofdstuk 3** zijn de expressiepatronen van de genen die coderen voor de 14-3-3 eiwitten geanalyseerd in zebravis-embryo's van 18 tot 48 uur oud. In deze studie hebben we ZebraFISH, CLSM en 3D reconstructie toegepast om complexe genexpressie-patronen te lokaliseren. Door de toepassing van onze methoden vonden we meer genexpressie-patronen en in eerdere stadia van ontwikkeling dan in voorgaande studies. Onze methoden maakten het mogelijk om expressie-patronen van genen die coderen voor 14-3-3 gamma en tau eiwitten in de zebravis, nauwkeurig in kaart te brengen tijdens opeenvolgende stadia van ontwikkeling.

In **Hoofdstuk 4** zijn de ZebraFISH methode, CLSM en 3D reconstructie toegepast op losse cellen: leukocyten of voorlopers daarvan. De genexpressie-patronen voor *l-plastin*, een algemene marker voor leukocyten, en *mpx*, een marker voor neutrofiele granulocyten zijn bestudeerd in verschillende stadia van ontwikkeling (24 tot 72 uur). Aanvullend hierop, als basis voor verdere studie, is de verdeling van de *l-plastin* en *mpx* expresserende cellen geanalyseerd met betrekking tot de formatie van bloed en de aanleg van bloedvaten. De schematische 3D modellen die in deze studie gepresenteerd worden, laten nauwkeurige inspectie toe van deze cellen en hun relatie tot anatomische structuren.

Case study Late zebrafish and cross species development

In deze case studie ligt de nadruk op genen die een rol spelen in de aanleg van de gepaarde vinnen van vissen en de ledematen van tetrapoden (viervoeters).

In **Hoofdstuk 5** zijn *in situ* hybridisatie en 3D reconstructie gebruikt om een rudimentaire structuur te bestuderen met betrekking tot de evolutie van vogels. De genexpressie-patronen van moleculaire markers die een rol spelen bij kraakbeenvorming, de transcriptiefactor *sox9* en de receptor *bmpr1b*, zijn bestudeerd in van vleugel en poot in kippenembryo's van 4.5 tot 8 dagen oud. *In situ* hybridisatie met *sox9* leverde een specifiek genexpressiepatroon op in de vleugel, dat wij hebben geïdentificeerd als een digit I-domein. Deze structuur ontwikkelt zich niet verder tot kraakbeen.

In **Hoofdstuk 6** is de timing van expressie van genen die een rol spelen bij ontwikkeling van vinnen bij de zebravis en ledematen van de kip, vergeleken met die van andere modelorganismen, om inzicht krijgen in genetische netwerken die een rol spelen bij de ontwikkeling van de verschillende modelorganismen. Genexpressie-patronen voor zebravis en kip zijn geproduceerd met behulp van eigen experimenten. Gegevens voor

muis (*Mus musculus*), axolotl (*Ambystoma mexicanum*), klauwpad (*Xenopus laevis* en *X. tropicalis*) zijn verkregen door literatuurstudie.

Een belangrijke stap waarmee het mogelijk wordt ontwikkelingsgegevens te vergelijken is de relatieve tijdschaal voor ontwikkeling. Voor elk organisme is zo'n relatieve tijdschaal berekend. De gegevens van genexpressie zijn uitgezet in deze relatieve tijdschaal van ontwikkeling. De methode "Frequent Episode Mining" (FEDA) is gebruikt voor analyse van evolutionaire relaties, gebaseerd op heterochronie - verschil in timing – van genexpressie tijdens de ontwikkeling van vin en ledemaat. De relatieve tijdschaal van ontwikkeling is hierbij opgenomen in de analyse. Het FEDA algoritme is flexibel: het kan op verschillende data worden toegepast, zoals op functies van genen, locaties van expressie, anatomische structuren, verschillende diersoorten en timing.

In **Hoofdstuk 7** wordt het werk, beschreven in dit proefschrift, beschouwd in perspectief met de meest recente literatuur. De belangrijkste conclusies uit de hoofdstukken worden in dit hoofdstuk samengevat.