



Universiteit
Leiden
The Netherlands

The function of mitogen activated protein kinases in zebrafish development

Krens, S.F.G.

Citation

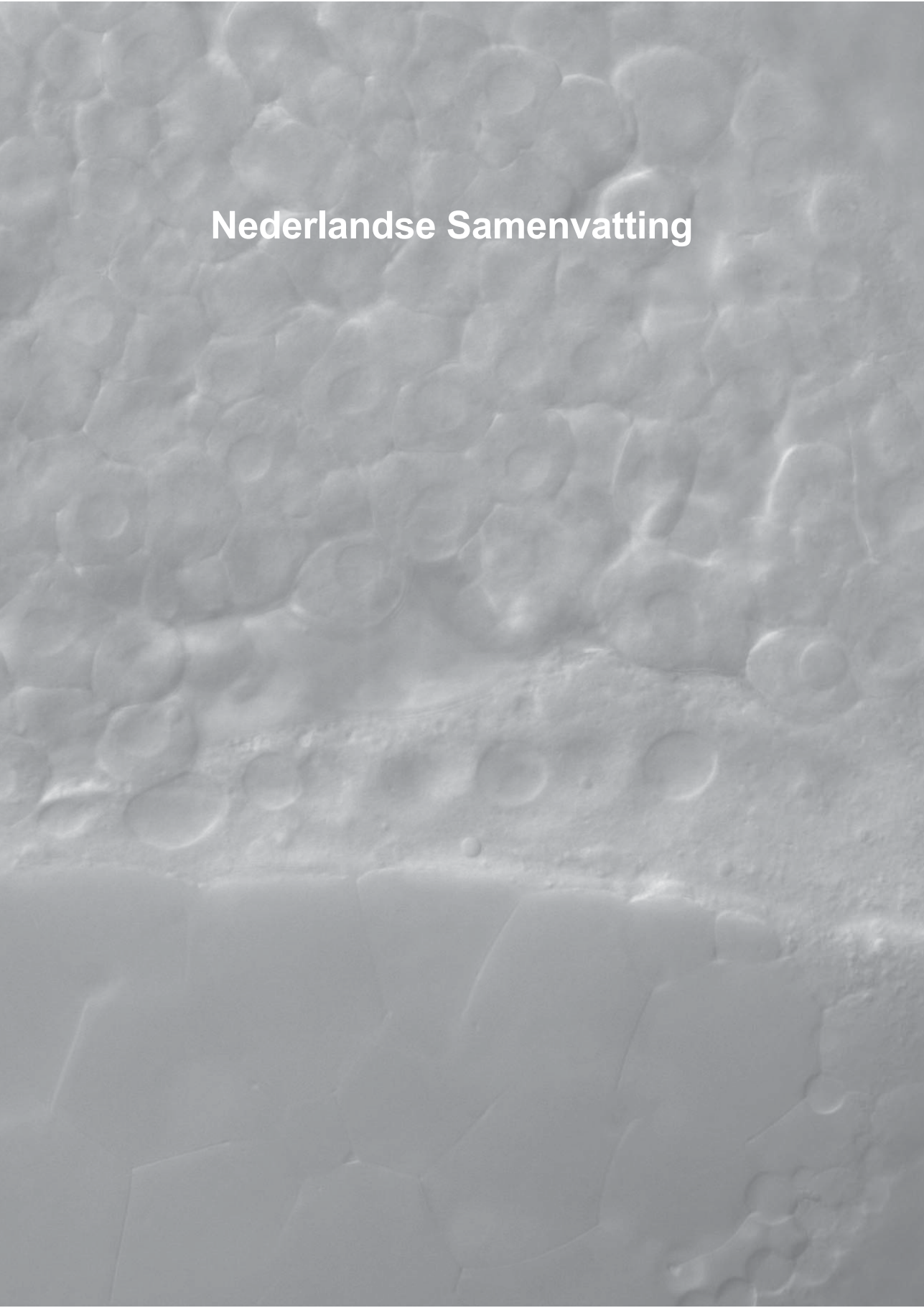
Krens, S. F. G. (2007, September 19). *The function of mitogen activated protein kinases in zebrafish development*. Molecular Cell Biology, (IBL) and biophysics, (LION), Faculty of Science, Leiden University. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/12348>

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/1887/12348>

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



Nederlandse Samenvatting

Nederlandse samenvatting

De 'Mitogen Activated Protein Kinases (MAPK's) vormen een enzym-familie die een belangrijke rol speelt bij het doorgeven van signalen binnen de cel. Deze enzymfamilie is evolutionair geconserveerd in planten en dieren. De MAPK-modules zijn essentiële signaaltransductieroutes die intracellulaire reacties beïnvloeden welke door extracellulaire signalen worden veroorzaakt. Door farmacologische en genetische studies en door het gebruik van *in vitro* celcultuursystemen, hebben we inzicht gekregen in talrijke cellulaire processen die beïnvloed worden door de MAPK-eiwitfamilie, zoals weefselmorphogenese, celproliferatie, celdifferentiatie, celoverleving en immuunreacties. Een consequentie van deze brede rol van MAPK's is dat een verstoorde MAPK-sig-naaltransductieroute grote gevolgen kan hebben, zoals het ontstaan van ziekten of de verstoring van de embryonale ontwikkeling.

In zoogdieren zijn tot op heden 14 *mapk*-genen geïdentificeerd. Eén van de best gekarakteriseerde MAPK-sig-naaltransductiemodules is die van de Extracellular signal-Regulated Kinases 1 en 2 (ERK1/ERK2). De belangrijkste doelstelling van de studie die in dit proefschrift wordt beschreven, is het begrijpen van het activeringsmechanisme en de functie van ERK1 en ERK2 tijdens ontwikkelingsprocessen, zoals celmigratie en celdifferentiatie. Om de activering en functie van ERK1 en ERK2 te onderzoeken hebben wij gebruik gemaakt van embryonale zebraviscelculturen en zebravisembryo's.

In eerste instantie heb ik mij gericht op de vraag of Chitine Oligosaccharides (CO's) de ERK-MAPK's kunnen activeren in gekweekte embryonale zebraviscellen. Deze vraagstelling was gebaseerd op eerder onderzoek waaruit bleek dat deze molekulen een belangrijke rol vervullen tijdens ontwikkelingsprocessen van gewervelde dieren. Tevens zijn hyaluronan-oligosacchariden (HA's), die erg lijken op CO's, betrokken bij het reguleren van de migratie-eigenschappen van metastaserende kankercellen. Bij de biosynthese van zowel HA's als CO's zijn leden van de hyaloronan synthase (HAS) eiwitfamilie betrokken. In een studie van Bakkers et al. is aangetoond dat uitschakeling van HAS2 in zebravisembryo's, celmigratieprocessen tijdens de embryogenese van de zebravis verstoort (Development, 2004).

Uit onze resultaten bleek dat stimulatie van gekweekte zebraviscellen met CO's leidt tot een transiente activatie van ERK1 en ERK2, met een maximum dat bereikt werd 15 minuten na toediening. Daarnaast hebben wij ook de sig-naaltransductieroute die leidt tot activatie van ERK1 en ERK2 door CO-stimulatie bestudeerd. Wij concluderen dat er een receptorsysteem met een hoge affiniteit voor dit oligosaccharide moet bestaan, dat na binding een sig-naal doorgeeft via de ERK-sig-naaltransductieroute, bestaande uit RAF, MEK en ERK. Na activatie fosforyleert ERK het target-eiwit p90RSK (RSK1, zie

hoofdstuk 2). Daarnaast werd er na injectie van chitine tetrasachariden in zebravisembryo's een verhoogde activering van ERK-MAPK gedetecteerd tijdens vroege ontwikkelingsstadia (gastrulatie, niet getoonde gegevens). Dit resultaat suggereert dat de signaleringsmechanismen van CO's tijdens vroege ontwikkelingsprocessen al functioneel zijn.

Vervolgens hebben we ons geconcentreerd op het bepalen van de functie van de downstream signaal componenten ERK1 en ERK2 tijdens de zebravis ontwikkeling, door gebruik te maken van morpholino antisense oligonucleotiden (morpholinos; MO's). Met behulp van MO's kan het vertalingsproces van een mRNA naar een bepaald eiwit (translatie) specifiek geblokkeerd worden, resulterend in een verlaagde aanwezigheid ('knockdown') van het eiwit van interesse (ERK1 of ERK2). Deze aanpak resulteerde in zebravisembryo's met ernstige ontwikkelingsdefecten ten gevolge van het blokkeren van de translatie van ERK1 en ERK2. Aangezien er nog weinig bekend is over de specificiteit van ERK-MAPK's is het interessant om het zebravismodel te gebruiken om meer inzicht in de specifieke functies van ERK1 en ERK2 te verkrijgen.

Om de rol van de verschillende *mapk*-genen verder te kunnen bestuderen, gebruik makend van de zebravis als modelorganisme, hebben we eerst de leden van de *mapk*-genfamilie in het zebravis genoom geïdentificeerd, gekloneerd en gekarakteriseerd (hoofdstuk 3). Het zebravisgenoom bevat genen die coderen voor de leden van alle verschillende MAPK-subfamilies: ERK, JNK en p38. De expressie van deze genen bleek een grote dynamiek te vertonen gedurende verschillende ontwikkelingsstadia en in verschillende weefsels. Dit wijst erop dat de expressie van deze genen strak gereguleerd is. Tevens suggereren de verschillen in expressie verschillende functies voor de individuele MAPK's tijdens embryogenese.

Vervolgens heb ik me geconcentreerd op het ontrafelen van de mogelijk specifieke functies van ERK1 en ERK2 tijdens embryonale ontwikkeling. Hiervoor werd gebruik gemaakt van de al eerder genoemde morpholino 'knockdown' methode (gen-specifieke inhibitie van eiwittranslatie). Uit onze studie bleek dat gen-specifieke "knockdown" van ERK1 en ERK2 verschillende effecten had op de celmigratieprocessen die plaatsvinden tijdens de gastrulatiestadia, namelijk de convergentie- en extensie- celmigratieprocessen. Convergentie-celmigratie is het proces waarbij cellen van de ventrale zijde naar de dorsale zijde van het embryo migreren, terwijl door het extensie-celmigratieproces de (anterior-posterior) lichaamsas wordt verlengd.

Embryo's met een gen-specifieke 'knockdown' van ERK1 vertoonde een vertraagde convergerende celmigratie, terwijl de extensie van de lichaamsas niet significant veranderd was. Dit in tegenstelling tot ERK2 knockdown embryo's, die een vermindering in de extensie van de lichaamsas ver-

toonden, maar geen significante verandering van de convergentie-celmigratie. Een stringenter toepassing van de morpholino-'knockdown' techniek (het gebruik van een hogere MO-concentratie) toonde aan dat ERK2 de actieve MAPK is in de blastula-margin en dat de afwezigheid van geactiveerd ERK2 in de blastula-margin zelfs de initiatie van epibolie (de migratie van blastulacellen over de vegetatieve dooiercel) blokkeert. Deze ERK2 'knockdown' embryo's werden geblokkeerd in hun verdere embryonale ontwikkeling, terwijl ERK1 'knockdown' embryo's slechts een geringe vertraging in epibolie lieten zien (hoofdstuk 4).

Om meer inzicht te krijgen in de verschillende functies van ERK1 en ERK2 bij de beschreven ontwikkelingsprocessen en om de specifieke verschillende 'target'-genen van ERK1 en ERK2 te identificeren, hebben wij de genexpressieprofielen van ERK1- en ERK2 knockdown embryo's bepaald met behulp van de microarray-technologie (hoofdstuk 5). De vergelijking van de verkregen genexpressieprofielen van ERK1- en ERK2- knockdown embryo's liet zien dat ERK1 en ERK2 zowel gemeenschappelijke als specifieke genen beïnvloeden. Tevens werden er genen gevonden die anti-gecorreleerd waren in hun expressie in ERK1- versus ERK2 knockdown embryo's. Deze resultaten bevestigen de conclusie uit onze morpholino-studies dat ERK1 en ERK2 verschillende functies hebben tijdens embryonale ontwikkelingsprocessen.

Het genexpressieprofiel van ERK1 knockdown embryo's wees op een mogelijk verstoorde 'dorsal-ventral patterning', aangezien een aantal genen die betrokken zijn bij de ontwikkeling van de ventrale zijde van het embryo verminderd tot expressie kwamen. Dit leidt mogelijk tot een dorsalisatie van het embryo. Daarentegen werd slechts een klein aantal ventrale genen beïnvloed in ERK1-morphants en werd geen verhoogde expressie van dorsale genen waargenomen. Hierdoor kunnen wij niet definitief concluderen dat ERK1 knockdown de embryo's dorsaliseert. Ook genen waarvan bekend is dat zij een rol spelen bij gastrulatie-celmigratieprocessen vertoonden een veranderde expressie in ERK1 knockdown embryo's. Dit is in overeenstemming met de hiervoor beschreven ontwikkelingsdefecten van ERK1 knockdown embryos die wijzen op een rol voor ERK1 voor gastrulatie-celmigratieprocessen.

Uit de analyse van het genexpressieprofiel van ERK2 knockdown embryo's bleek dat belangrijke signaaltransductieroutes voor mesoderm en endoderm ontwikkeling verstoord waren. Dit resulteerde in een verlaagde expressie van mesoderm- en endoderm-specifieke genen. Genen die de initiatie van mesodermaal weefsel stimuleren (Nodal-signalen) kwamen verhoogd tot expressie, terwijl signalen die betrokken zijn bij het behoud en onderhoud van mesodermale weefsels (FGF- en WNT-signalen) negatief werden beïnvloed.

Nederlandse samenvatting

Gecombineerd wijst dit erop dat mesendoderm-differentiatie in ERK2 knock-down embryo's nog wel geïnitieerd werd, maar het behoud van de mesendoderm-identiteit verstoord was. Dit resulteert in een verstoorde mesoderm ontwikkeling en blokkering van verdere embryonale ontwikkeling. Wij concluderen uit onze data dat ERK2 van belang is voor het vormen van mesoderm. Veel vroege mesoderm specifieke genen zijn tijdens latere ontwikkelingsstadia ook betrokken bij celmigratieprocessen. Dit feit ondersteunt onze eerdere aanwijzingen voor een rol voor ERK2 tijdens embryonale celmigratieprocessen.

Conclusies

Uit dit onderzoek is gebleken dat het zebravisgenoom codeert voor leden van alle subklassen van MAPK's. Hierdoor is het mogelijk om de functie van deze eiwitten te bestuderen in de zebravis. Chitine Oligosaccharides (CO's) activeren ERK1 en ERK2 in culturen van embryonale zebraviscellen via een receptorsysteem met een hoge affiniteit voor oligosachariden. Verdere studie naar de functie van ERK1 en ERK2 tijdens embryonale ontwikkelingsprocessen laat zien dat ERK1 en ERK2 verschillende rollen hebben tijdens embryonale celmigratieprocessen en differentiatie van verschillende weefsel- en celtypen. Tenslotte reguleren ERK1 en ERK2 de expressie van zowel gezamenlijke als specifieke 'target'-genen tijdens de embryogenese.