



Universiteit
Leiden
The Netherlands

A day in the life of a germ cell - on gametogenesis and pluripotency
Gomes Fernandes, M.

Citation

Gomes Fernandes, M. (2018, November 7). *A day in the life of a germ cell - on gametogenesis and pluripotency*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/66721>

Version: Not Applicable (or Unknown)

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/66721>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/66721> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Gomes, Fernandes M.

Title: A day in the life of a germ cell - on gametogenesis and pluripotency

Issue Date: 2018-11-07

The page features decorative elements consisting of black dots arranged in various patterns. In the top-left corner, there is a grid of dots with a white triangular shape overlapping it. In the top-right corner, there is a grid of dots with a white triangular shape overlapping it. In the bottom-left corner, there is a large, irregular shape filled with a grid of dots. In the bottom-right corner, there is a white triangular shape overlapping a grid of dots.

SAMENVATTING

SUMMARY

SAMENVATTING

Om functionele gameten *in vitro* te kunnen afleiden moeten we eerst kiemcel-lijnen en zijn ontwikkeling begrijpen. De meeste van de huidige kennis met betrekking tot humane kiemcellen (hPGC's) is geëxtrapoleerd van verschillende diermodellen. Echter, zoals wordt gedemonstreerd in dit proefschrift en in andere publicaties, zijn er belangrijke verschillen tussen diersoorten. Vanwege de ethische kwesties en schaarste van humaan embryonisch weefsel worden veel belangrijke tijdstippen in het leven van een humane kiemcel slecht begrepen.

In dit proefschrift worden meerdere kritische tijdstippen van humane kiemcelontwikkeling behandeld. Kiemcellen worden gespecificeerd tijdens de vroege embryonische ontwikkeling - rond het begin van de gastrulatie. Tot recentelijk, bleef humane gastrulatie ontoegankelijk. In **hoofdstuk 2**, gebruiken we een cultuursysteem welke *in vitro* aspecten van humane embryonische stamcel (hESC's) afleiding, (door suppletie met Activin A), combineert met verlengde blastocyst-cultuur om de cellijnsegregatie te kunnen onderzoeken (12dpf, days post-fertilization). Met dit model, hebben wij, voor de eerste keer, de verschijning van echte hPGC's aangetoond. Door gebruik van een combinatie van selecte antilichamen, konden wij PGC's onderscheiden van epiblast en endoderm in het blastocyst. De data suggereert dat humane PGC's delaminieren van de POU5F1+ epiblast gericht op de GATA6+ endoderm rond 12dpf.

In **hoofddtuk 3** worden migrerende en vroeg post-migratie hPGC's uitgebreid gekarakteriseerd in een zeldzaam 4,5 weken oud humaan embryo. Een breed paneel van markers zijn gekarakteriseerd en gevalideerd in de aorta-gonad-mesonephros regio van een CS 12-13 humaan embryo en het is aangetoond dat er een overvloedigheid bestaat aan expressie van een aantal transcriptie factoren en celoppervlaktemarkers tijdens deze stadia. De data suggereert ook dat muis en humane PGC's mogelijk op andere migratie signalen reageren en daarom verschillende celoppervlaktemarkers tot expressie brengen, wat de noodzaak benadrukt voor functionele *in vitro* studies (en de validatie hiervan) in humaan weefsel. De epigenetisch markers H3K27me3 en 5mC (globale DNA methylisatie) waren voldoende om de POU5F1+ hPGC's te onderscheiden van de omliggende somatische cellen.

In **hoofdstuk 4** wordt een uitgebreide karakterisatie van het expressiepatroon en subcellulaire compartimentalisatie van de PIWIL eiwit familie gedurende humane embryonale ontwikkeling en spermatogenese uitgevoerd. De data laat geslachtsspecifiek compartimentalisatie van PIWIL eiwitten in hPGC's zien, wat zeer verschillend is vergeleken met wat in muizen beschreven is. In zowel mannelijke als vrouwelijke late kiemcellen, is PIWIL4 maar niet PIWIL2 aanwezig in het intermitochondriaal cement, in wederzijds exclusieve compartimenten in oocyten in primordiale follikels. In vrouwelijke meiotische kiemcellen, beschrijven we, voor de eerste keer, de accumulatie van PIWIL1 in een enkelvoudige compacte korrel welke gelijkenissen vertoont in vorm en lokalisatie met het mannelijk-specifieke satellite-body en chomatoïd-body. PIWIL3 was alleen tot expressie gebracht in groeiende oocyten.

Meerdere studies suggereren dat ergens gedurende de transitie van naïef tot primed pluripotentie competentie voor PGC-inductie wordt verworven in cultuur, in parallel met wat er *in vivo* gebeurt. In **hoofdstuk 5**, worden de vereisten van BMP-SMAD signalering geanalyseerd om pluripotentie in de naïeve en grondtoestand-cultuurcondities te houden. We lieten tijdelijke activatie zien van de BMP-SMAD signalering-pathway in mESC's welke een BMP-SMAD responsieve reporter transgeen bevatten. Activatie van de BMP-SMAD reporter transgeen in naïeve mESC's correleerde met lagere niveaus van genomische DNA methylatie, hoge expressie van 5-methylcytosine hydroxylases Tet1/2 en lage niveaus van DNA methyltransferasen Dnmt3a/b. Met behulp van dubbele Smad1:Smad5 knockout mESC's hebben we aangetoond dat BMP-SMAD signaleren overbodig is voor zelfvernieuwing in muizen ESC's (in zowel de naïeve als de grondtoestand), maar een belangrijke rol speelt in lineage priming, zoals ook gebeurt gedurende vroege embryonale ontwikkeling en PGC specificatie. De data suggereert dat BMP-SMAD signalering lineage priming in mESC's moduleert door kortdurende regulatie van de enzymatische machinerie verantwoordelijk voor DNA methylatie.

SUMMARY

In order to derive functional gametes *in vitro*, we first need to understand germ cell lineage and its development. Most of the current knowledge regarding human germ cells (hPGCs) is extrapolated from different animal models. As shown in this thesis and other recent publications, there are important species differences that need to be addressed. Due to the ethical nature and scarcity of human embryonic material many important time-points in the life of a human germ cell are poorly understood. In this thesis, several critical time-points of human germ cell development are addressed.

Germ cells are specified during the early stages of embryonic development, around the gastrulation onset. Until recently, gastrulation in the human remained inaccessible. In **Chapter 2**, we adopted a culture system combining features of human embryonic stem cells (hESCs) derivation, by supplementation with Activin A, and extended blastocyst culture *in vitro* to examine lineage segregation in human blastocyst outgrowths (12dpf, day post-fertilization). We show, using this model, emergence of bona fide hPGCs for the first time. Using a combination of selected antibodies, we were able to distinguish PGCs from epiblast and endoderm in blastocyst outgrowths. These data suggested that human PGC delaminate from the POU5F1+ epiblast facing the GATA6+ endoderm around 12dpf.

In **Chapter 3**, migratory and early post-migratory hPGCs were extensively characterized in a rare 4.5 week-old human embryo. A broad panel of markers were characterized and validated in the aorta-gonad-mesonephros region of a CS 12-13 human embryo and it was shown that there is redundancy in the expression of several transcription factors and cell surface membrane markers at this stage. The data also suggests that mouse and human PGCs may respond to different cues to migrate and hence express different surface markers, reinforcing the need of functional studies and the validation of *in vitro* discoveries in human tissue. The epigenetic marks H3K27me3 and 5mC (global DNA methylation) were sufficient to distinguish POU5F1+ hPGCs from the surrounding somatic cells.

In **Chapter 4** an extensive characterization of the expression pattern and subcellular compartmentalization of the PIWIL protein family during human embryonic development and spermatogenesis was performed. The data showed a sex-specific compartmentalization of PIWIL proteins in hPGCs, very different to that described in the mouse. Both in male and female late germ cells, PIWIL4 but not PIWIL2 was present in the intermitochondrial cement, occupying mutually exclusive compartments in oocytes in primordial follicles. In female meiotic germ cells, we described for the first time the accumulation of PIWIL1 in a single condensed granule that bears similarities in terms of shape and localization to the male-specific satellite-body and chromatoid-body. PIWIL3 was only expressed in growing oocytes.

Several studies suggest that at some point during the transition from naïve to primed, pluripotency competency for PGC induction is acquired in culture, in parallel with what happens in vivo. In **Chapter 5**, requirement of BMP-SMAD signalling to keep pluripotency in naïve and ground state culture conditions was analysed. We showed transient activation of the BMP-SMAD signalling pathway in mESCs containing a BMP-SMAD responsive reporter transgene. Activation of the BMP-SMAD reporter transgene in naïve mESCs correlated with lower levels of genomic DNA methylation, high expression of 5-methylcytosine hydroxylases Tet1/2 and low levels of DNA methyltransferases Dnmt3a/b. Using double Smad1;Smad5 knockout mESCs we showed that BMP-SMAD signalling is dispensable for self-renewal in mouse ESCs (both in the naïve and ground state), and plays an important role in lineage priming, as also occurs during early embryonic development and PGC specification. These data suggested that BMP-SMAD signalling modulates lineage priming in mESCs, by transiently regulating the enzymatic machinery responsible for DNA methylation.

