



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Developmental regulation and evolution of cAMP signalling in Dictyostelium

Alvarez-Curto, E.

Citation

Alvarez-Curto, E. (2007, October 23). *Developmental regulation and evolution of cAMP signalling in Dictyostelium*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/12476>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License:

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/12476>

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

Samenvatting

Summary for the non-biologist

Samenvatting voor niet-biologen

Ontwikkelings biologie

Ontwikkelings biologen bestuderen de processen die leiden tot de vorming van een complex, meercellig organisme vanuit een simpeler vorm zoals een embryo of een bevruchte eicel. Een verscheidenheid aan organismen zoals kikkers (*Xenopus*), fruit vliegen (*Drosophila*) en amoebes (*Dictyostelium*) wordt gebruikt als model systemen ter bestudering van deze ontwikkelings processen.

Dictyostelium discoideum behoort tot de groep van sociale amoebes. Dit zijn solitaire eencelligen, die wanneer de voedselbron raakt uitgeput samen stromen en een meercellige structuur vormen. Hoewel mensen, amoebes, vliegen en kikkers geen fysieke gelijkenis vertonen, zijn er vanuit een moleculair gezichtspunt (dus qua hormonen, receptoren, enzymen etc.), veel overeenkomsten in signaal overdracht routes die belangrijke cellulaire en ontwikkelings processen gebruiken (zoals bijv. de ontwikkeling van een embryo). Alle levende organismen ontvangen verschillende soorten stimuli waarop een respons wordt gegeven (bijvoorbeeld, een toename in het bloed suikergehalte verhoogt de afgifte van een specifiek hormoon: insuline. De juiste respons op een signaal vergt detectie en verwerking door het juiste cel type of orgaan en hiervoor is een efficiënte cel communicatie cruciaal. Ontwikkelings biologen onderzoeken dus ook hoe cellen via de juiste boodschappen en antwoorden met elkaar communiceren en organiseren. In hogere organismen is de werking van deze signaal systemen uitermate complex en moeilijk te ontrafelen. Daarom kan de bestudering van signaal overdracht, celdifferentiatie en patroonvorming van een simpele levensvorm als de sociale amoëbe helpen inzicht te verschaffen in hoe deze processen in complexere organismen werken.

***Dictyostelium discoideum* levens cyclus en ontwikkelings programma**

Ons leefmilieu verandert continu en daarom is flexibele aanpassing aan nieuwe condities noodzakelijk om te kunnen overleven. *Dictyostelium* cellen leven gewoonlijk in de grond en voeden zich met bacterien en andere micro-organismen. Het is doorgaans een rijke leefomgeving die echter aan grote veranderingen in temperatuur, zuurgraad (pH) en vochtigheid onderhevig kan zijn en waar van tijd tot tijd voedsel op kan raken. Via evolutie hebben *Dictyostelium* amoebes mechanismen ontwikkeld om deze veranderingen aan te kunnen en te overleven als er tijdelijk geen voedsel is. Cellen stromen dan samen tot meercellige aggregaten die zich ontwikkelen tot vruchtlichamen, bestaande uit een steel met daarop een sporen hoofdje. Een vruchtlichaam wordt gevormd uit zo'n 100,000 cellen die aanvankelijk gelijke eigenschappen hebben maar zich uiteindelijk differentieren (=ontwikkelen) in steel- of sporecellen afhankelijk van de signaal moleculen waaraan ze blootgesteld worden.

Ongeveer 20% van de cellen differentieren zich tot dode steel cellen en 80% tot sporen, die levensvatbaar zijn en ontkiemen als de condities (voedsel, temperatuur, vochtigheid) er gunstig voor zijn. De dode steel tilt de sporen van de grond zodat ze goed kunnen verspreiden. Sporen zijn resistent tegen extreme condities en ontkiemen tot de nieuwe generatie amoebes. De levenscyclus van *Dictyostelium* (de transformatie van eencellige, solitaire amoëbe via meercellige tussenstadia tot een vruchtlichaam bestaande uit een steel met sporen hoofd) voltooit zich onder normale omstandigheden in 24 uren. Een belangrijk tussenstadium na celaggregatie is de vorming van een zgn. slak. De slak is een cilindervormige, bewegende structuur en heeft een "kop tot staart" ontwerp. De kop of pre-steel regio, bestaat uit de voorste 20% en de staart of pre-spore regio bestaat uit de achterste 80% van de cellen. Onder invloed van licht en temperatuur zoekt de slak een gunstige plaats om zich op te richten en het vruchtlichaam te vormen. Het is gedurende deze fase dat de "lot's bepaling" tot spore of steel cel vast komt te liggen.

Het voornaamste signaal molecuul dat de meeste stappen in de progressie van *Dictyostelium's* levens cyclus reguleert heet cyclisch AMP (of cAMP). Amoebes kunnen cAMP produceren en uitscheiden. Tijdens aggregatie detecteren amoebes dit uitgescheiden,

extracellulaire cAMP met specifieke receptoren en worden zo tot elkaar aangetrokken. Dit proces van het bewegen naar een chemische verbinding, heet chemotaxis en cAMP noemen we de “chemo-attractant”. Amoebes die honger krijgen door het opraken van voedsel beginnen cAMP uit te scheiden. Dit cAMP stimuleert buur cellen tot productie en uitscheiding van cAMP, hetgeen leidt tot het doorgeven van het cAMP signaal en het samen stromen van cellen tot aggregaten. Zo start de meercellige ontwikkeling en de sturende rol van extracellulair cAMP is uniek voor *Dictyostelium*.

De eiwitten of enzymen die cAMP produceren heten adenylyl cyclases en *Dictyostelium discoideum* heeft er drie: ACA, ACB and ACG. Het geproduceerde cAMP heeft vele intracellulaire functies maar kan ook uitgescheiden worden om extracellulaire functies te vervullen. De juiste temporele (tijd) en spatiele (plaats) regulering van cAMP concentraties is vereist voor correcte cel differentiatie en uiteindelijke overleving.

Een aantal complexe processen vinden plaats gedurende de levens cyclus en de grote meerderheid hiervan wordt gereguleerd door cAMP. Er zijn morfogenetische bewegingen, wat betekent dat groepen cellen zich mobiliseren om bepaalde structuren zoals de slak en later het vruchtlichaam (bestaande uit de steel en het sporenhoofd) te vormen. In de slak worden cel bewegingen bepaald door de tip (het voorste puntje van de kop) van waaruit cAMP pulsen worden verzonden, die voor de orientatie van de cellen zorgen. Ook cel differentiatie vindt nu plaats. Dit betekent dat cellen pre-spore of pre-steel cel karakteristieken verkrijgen en zich uiteindelijk eigenschappen verwerven die nodig zijn om of spore- of steelcel te worden. Van de voor tot achterkant van de slak, vormt zich een “kop tot staart” as. Langs deze “kop tot staart” as, vind je de pre-steel cellen het dichtst bij de kop (anterior) en de pre-spore cellen bevinden zich in de staart (posterior). Het ontwikkelen en verkrijgen van deze patroonvorming in *Dictyostelium* wordt gereguleerd door de differentiele expressie van de verschillende componenten van de cAMP signaaltransductie machinerie.

Het doel en de conclusies van dit proefschrift

Aangezien cAMP het meest belangrijke signaal molecuul in de ontwikkeling van *Dictyostelium* is, wilde ik onderzoeken waar en wanneer het geproduceerd wordt en hoe de productie ervan gereguleerd wordt. Omdat verschillende *Dictyostelium* soorten homologe ontwikkelings programma's hebben, heb ik ook onderzoek naar evolutionaire verwantschap tussen de verschillende soorten gedaan, door het vergelijken van de genetische profielen (DNA code) van enkele belangrijke componenten van de cAMP signaal machinerie.

De adenylyl cyclases produceren cAMP op verschillende tijden en in verschillende regio's van de slak, hetgeen van belang is voor correcte cel differentiatie (hoofdstuk 1). ACA reguleert de aggregatie van *Dictyostelium* cellen en komt tot expressie in het voorste puntje, de tip van de slak. Van hieruit wordt het geproduceerde cAMP pulsgewijs naar de achterliggende cellen in de slak uitgezonden en wordt de beweging van de (cellen van de) slak bepaald. In hoofdstuk 1 heb ik ook aangetoond dat ACB specifiek tot expressie komt in de pre-steel regio van de slak, in het voorste deel het dichtst bij de tip. ACB reguleert voornamelijk processen in de late ontwikkeling; zoals de oprichting van de slak tot een vruchtlichaam en de maturatie (=rijping) van de sporen en steel cellen. ACB, in combinatie met andere componenten van de signaal machinerie, zorgt voor correcte spore vorming en inkapseling van de pre-spore cellen. ACG komt ook tot expressie in sporen en kan geactiveerd worden door hoge osmolariteit (dat is een hoge concentratie van geladen verbindingen) van het vocht in het sporenhoofd. De hoofd functie van ACG is het voorkomen van ontkiemen onder ongunstige condities. Ik heb ook gevonden dat ACG veel eerder in het slakken stadium aanwezig is (hoofdstuk 1). Tijdens dit stadium is het aanwezig in het achterste deel van de slak, waar het cAMP produceert, dat de pre-spore differentiatie in gang zet. Samenvattend, in de slak komen de cyclases tot expressie in de tip (ACA), de pre-steel regio (ACB) en de pre-spore regio (ACG). In hoofdstuk 1 toon ik ook aan dat functies van de adenylyl cyclases deels overlappend zijn (de afwezigheid van een bepaald cyclase kan gecompenseerd worden door een ander aanwezig cyclase). Dit maakt het moeilijk om de individuele rol van een specifiek cyclase te bepalen op momenten dat ook andere cyclases aanwezig zijn.

Via genetische manipulatie m.b.v. moleculair biologische technieken kunnen specifieke genen uitgeschakeld worden (het maken van gen knock-outs) en kan zo de functie van een bepaald eiwit of enzym worden geanalyseerd. Als bijvoorbeeld het ACG-gen wordt uitgeschakeld, dan is het verwachte fenotype (het zichtbare resulterende defect) dat van sporen die ontkiemen onder condities van hoge osmolariteit. Soms is de uitschakeling van genen onmogelijk (i.g.v. dodelijke consequentie) of niet praktisch (als bijv. de ontwikkeling in een heel vroeg stadium wordt geblokkeerd). Een farmacologische aanpak kan hier een uitweg bieden. Synthetische verbindingen die receptoren of enzymen kunnen remmen of activeren kunnen op een zelf gekozen moment worden ingezet. In hoofdstuk 2, onderzoek ik mogelijke remmers van de verschillende adenylyl cyclases en identificeer ik tenminste 2 specifieke remmers voor ACA en ACG.

Als cAMP wordt afgebroken, wordt o.a. adenosine gevormd. Dit afbraak product, is zelf een signaal molecuul en kan tot significante concentraties toenemen. Adenosine kan interfereren met de werking van cAMP in aggregatie en pre-spore differentiatie. In hoofdstuk 3, bestudeer ik de rol van het enzym adenosine kinase, dat adenosine fosforyleert en het daardoor dus in concentratie af doet nemen. De adenosine concentratie blijkt invloed op de grootte van de slak maar niet op pre-spore differentiatie te hebben.

Dictyostelium discoideum is een soort van de *Dictyosteliden* die we als model organisme voor differentiatie en patroonvorming gebruiken. Er zijn echter vele andere soorten beschreven die grote overeenkomsten vertonen en allemaal aggregeren bij uithongering en vruchtlichamen vormen als overlevings strategie. De vorm en grootte van deze vruchtlichamen kunnen behoorlijk verschillen. Sommige soorten hebben zelfs meer dan een sporenhofd, zoals *Dictyostelium*, *Polysphondylium*.

In hoofdstuk 4, hebben we de eerste fylogenetische stamboom geconstrueerd op basis van moleculaire verwantschap. Een fylogenetische stamboom geeft inzicht in de evolutionaire ontwikkeling van soorten en vertelt dus welke soorten en families verwanter en/of ouder zijn dan anderen. De gepresenteerde fylogenetische stamboom is gebaseerd op de vergelijking van DNA profielen (van specifieke genen) van meer dan 80 *Dictyostelium* soorten. Gebruikmakend van de stamboom kunnen we concluderen dat de soorten van de *Dictyosteliden* die verder geevolueerd zijn, een groter vruchtlichaam hebben ontwikkeld dan de "oudere" soorten.

Deze stamboom laat ook zien wanneer bepaalde karakteristieken voor het eerst in de evolutie voorkomen; zoals bijvoorbeeld het gebruik van cAMP als chemo-attractant (hoofdstuk 5).