Universiteit Leiden
The Netherlands

Tail regeneration in the Tokay Gecko (Gekko gecko)

Nurhidayat, L.

Citation
Nurhidayat, L. (2025, January 9). *Tail regeneration in the Tokay Gecko (Gekko gecko)*. Retrieved from https://hdl.handle.net/1887/4175313

Version:	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/1887/4175313

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

Nederlandse samenvatting

Regeneratie is het vermogen van een organisme om beschadigd of verloren weefsel te herstellen zonder de productie van littekenweefsel, waarbij het nieuwgevormde weefsel de functie van het verloren weefsel vervangt (Pirotte et al., 2016; Poss, 2010). Regeneratie is belangrijk als een van de overlevingsstrategieën die dieren gebruiken om met verwondingen om te gaan (Bely en Nyberg, 2010; Gurtner et al., 2008). Regeneratie gaat verder dan wondgenezing of reparatie, waarbij het verloren weefsel eenvoudig wordt bedekt door epitheel of vervangen door littekenweefsel (zoals bij zoogdieren bijvoorbeeld). Regeneratie kan plaatsvinden op verschillende biologische organisatieniveaus, van cel tot volledig lichaam, en kan op verschillende stadia in de levenscyclus van een dier worden geïnitieerd (Bely en Nyberg, 2010). Het omvat altijd celproliferatie en differentiatie na een verwonding en is daarom afhankelijk van de aanwezige populatie stamcellen (Ricci en Srivastava, 2018; Tanaka en Reddien, 2011). De beschikbaarheid van stamcellen in verschillende dieren kan het verschil in regeneratief vermogen tussen soorten verklaren.

Regeneratie bij gewervelde dieren is beperkter vergeleken met ongewervelden. Bij mensen en muizen, bijvoorbeeld, is de capaciteit voor echte regeneratie beperkt tot de vingertoppen, mits (bij mensen) het nagelbed behouden is (Gang en Lenghi, 1982; Muneoka en Dawson, 2021; Narayanan, 2015; Tang et al., 2014). De lever bij mensen en andere zoogdieren kan verloren delen herstellen, maar sommige onderzoekers beschrijven dit als een regulatie van de fysiologische grootte in plaats van echte regeneratie (Michalopoulos, 2007; Wang et al., 2019b). Andere gewervelde dieren vertonen echter indrukwekkende regeneratieve capaciteiten. Waaronder Teleostei (beenvissen) zoals de zebravis (*Danio rerio*), Lissamphibia zoals salamanders (Urodela) en Squamata zoals hagedissen, gekko's inbegrepen (Li et al., 2015). Deze dieren worden vaak gebruikt als modellen voor regeneratiestudies omdat ze inzichten bieden die niet beschikbaar zijn bij zoogdieren met hun beperkte regeneratie vermogen (Kurup en Ramachandran, 2011; Song et al., 2010).

Hagedissen staan bekend om het fenomeen van staart-autotomie, waarbij de staart afbreekt langs bestaande breukvlakken wanneer het gegrepen wordt door een roofdier. Autotomie is bedoeld om een roofdier af te leiden, omdat het afgebroken staartfragment enige tijd op de grond blijft trillen (Bae et al., 2014). Autotomie bij hagedissen gaat over het algemeen gepaard met het vermogen om het verloren stuk staart te regenereren.

De staartregeneratie van hagedissen resulteert in de ontwikkeling van een nieuwe, complexe structuur (de vervangende staart) vanuit een groep prolifererende cellen op de staartstomp, het blastema. Het is onder andere de vorming en differentiatie

van het blastema die de hagedis een nuttig model maakt voor het bestuderen van weefselregeneratie (Bely en Nyberg, 2010; Hill et al., 2012; Lozito en Tuan, 2015; Russell et al., 2015).

In dit proefschrift gebruiken we de tokay gekko (*Gekko gecko*) als modelsoort. De tokay gekko is een hagedis, lid van de suborde Lacertilia, familie Gekkonidae. De tokay gekko komt voot van noordoostelijk India tot zuidelijk China en in heel Zuidoost-Azië (Das, 2015). De totale lichaamslengte (TL; snuit tot het puntje van de staart) van de tokay gekko is ongeveer 35 cm en de snuit-vent lengte (SVL) is ongeveer 18,5 cm (Cobos en Higham, 2022); het is de op een na grootste levende gekko na de Nieuw-Caledonische gekko (Rhacodactylus leachianus) (Kongbuntad et al., 2016).

In **Hoofdstuk 1** hebben we de huidige literatuur over regeneratie, vooral bij gewervelden, en het belang van het bestuderen van regeneratie in verschillende soorten samengevat. Bovendien hebben we de staartregeneratie bij hagedissen dieper onderzocht. Als amnioten staan hagedissen dichter bij zoogdieren (inclusief mensen) dan de Urodela en Teleostei modelsoorten.

In **Hoofdstuk 2** beschrijven we de weefselstructuur van zeven stadia van de regenererende staart van de volwassen tokay gekko. We ontdekten dat het proces van staartregeneratie bij de tokay gekko histologisch gezien een reeks goed gedefinieerde fasen omvat die overeenkomen met die waargenomen bij andere hagedissen, hoewel er soortspecifieke variaties in timing en complexiteit zijn. Daarnaast ontdekten we dat het blastema in de regenererende staart van de tokay gekko heterogeen is, zelfs toen het nog in het pre-blastema weefsel onder het wondepitheel zat op 8 dpa (dagen na autotomie). Ten slotte vonden we geen histologisch bewijs van een apicale groeizone zoals gezien bij Urodela.

In **Hoofdstuk 3** beschrijven we een onderscheidend moleculair kenmerk in elk stadium van de staartregeneratie bij de tokay gekko. Er was een vroege verhoging van het aantal immuun-gerelateerde genen in de wondgenezingsfase, gevolgd door de verhoging van een subset ontwikkelingsgenen in de blastema fase en de verhoging van genen die verband houden met skeletspier maturatie en functionele ontwikkeling in de differentiatiefase. Bovendien vonden we dat het transcriptoom-profiel van de regenererende staart-blastema, met betrekking tot ontwikkelingspatroongenen, verschilt van dat van de embryonale staart.

In **Hoofdstuk 4** tonen we, met behulp van single-cell mRNA-sequencing, aan dat het regenererende staart-blastema en de embryonale staartknop bij de tokay gekko bestaat uit verschillende celclusters. Daarnaast ontdekten we, door gebruik te maken van een bioinformatica, dat de terminale toestanden in het geregenereerde staart-blastema

voornamelijk ontwikkelen vanuit hun eigen cellijn. Dit verschilt van de embryonale staartknop, waarin de voorloperpopulatie voornamelijk pluripotente stamcellen betreft.

In **Hoofdstuk 5** we richtten ons met name op genen die betrokken zijn bij axonogenese, chondrogenese, myogenese en segmentatie. Wij identificeerde de kandidaatgenen met bulktranscriptomics en single-cell mRNA-sequencing en met in situ hybridisatie hun ruimtelijke expressie in de weefselsecties van de regenererende staart. De bevindingen in dit hoofdstuk suggereren dat de regeneratie van de tokay gekko staart de vroege activering van een stamcelpopulatie omvat, waarschijnlijk bestaand uit satellietcellen en fibroblasten, die het positionele geheugen behouden van de oorspronkelijke staart. Dit positionele geheugen vergemakkelijkt de regeneratie van een passende staartvervanging, zonder nieuwe patroonvorming zoals waargenomen bij normale ontwikkeling.

In **Hoofdstuk 6** leveren we een genoomassemblage en annotatie van de tokay gekko, die kan worden gebruikt als een genoomreferentie voor een breed scala aan biologisch onderzoek met de tokay gekko als modelorganisme, met name studies gericht op weefselregeneratie.

Samenvattend suggereert onze studie dat staartregeneratie bij de tokay gekko gebruikmaakt van duidelijk ander mechanismen dan de blastema-gebaseerde regeneratie die wordt waargenomen bij salamanders en beenvissen. Bovendien is regeneratie bij deze gekko niet simpelweg een re-activatie van ontwikkelingsprocessen. Ondanks dat de regeneratiestadia vergelijkbaar zijn met die van de axolotl en zebravis (wondgenezing, blastemavorming, differentiatie en maturatie), verschilt de tokay gekko staartregeneratie in celrekrutering voor de blastema. Het lijkt meer afhankelijk te zijn van de activering van lijngebonden, residente stamcellen van de onbeschadigde staart, in plaats van het genereren van stamcellen door de-differentiatie van volwassen cellen. Dit zou kunnen verklaren waarom de regenererende tokay gekko staart slechts een subset van ontwikkelingsgenen heractiveert — en dat zelfs relatief laat in het regeneratie proces doet (16 dpa), niet eerder, zoals verwacht zou worden als het blastema een ontwikkelingsveld was. Tokay gekko staartregeneratie lijkt ook gebruik te maken van het bestaande positionele geheugen van de resdinte stamcellen om de verloren structuur te herbouwen.

Onze bevinding van een stamcelgebaseerd regeneratiemechanisme, beperkt tot bepaalde cellijnen bij reptielen, zou toepassingen kunnen hebben in de menselijke regeneratieve geneeskunde. Interessant genoeg zijn enkele fenomenen in zoogdierregeneratie, zoals de regeneratie van muisvingertopjes (Johnson et al., 2020; Lehoczky et al., 2011) en hertengeweien (Qin et al., 2023; Wang et al., 2019a), ook

afhankelijk van de activering van cellijn gebonden stamcellen. Zoogdieren hebben echter bepaalde beperkingen als onderzoeksmodellen voor regeneratie, vergeleken met de tokay gekko. In het muisvingermodel is regeneratie bijvoorbeeld beperkt tot een zeer klein gebied en vindt het alleen plaats als de vinger wordt geamputeerd distaal van het laatste interphalangeale gewricht (Borgens, 1982). En het hertengeweimodel zou onpraktisch zijn qua kosten en betreft alleen de regeneratie van botweefsel (Qin et al., 2023; Wang et al., 2019a). Daarom wordt de gekko een aantrekkelijk model voor het bestuderen van een type regeneratie, waarvan wij geloven dat het gedeeld wordt met mensen en andere zoogdieren, dat gebaseerd is op cellijn gebonden, residente stamcellen.

Toekomstig onderzoek zou de moleculaire routes, signaalcascades en cellulaire dynamiek die de activering en differentiatie van de residente stamcelpopulaties verantwoordelijk voor tokay gekko staartregeneratie beheersen moeten analyseren . Dit kan worden aangevuld met lijntraceringsstudies om de betrokken residente stamcellen definitief te identificeren en te karakteriseren, hun rol te bevestigen en hun activering tijdens regeneratie te bepalen. Bovendien zou verder onderzoek naar de mechanismen die ten grondslag liggen aan het positionele geheugen in tokay gekko residente stamcellen waardevolle inzichten kunnen bieden in hoe positioneel geheugen het regeneratieproces stuurt. Deze inzichten zouden mogelijk kunnen worden benut om bio-engineeringstechnieken te ontwikkelen, zoals ondersteunende scaffolds, die regeneratie kunnen begeleiden en vergemakkelijken, waardoor onderzoeksbevindingen naar medische toepassingen kunnen worden vertaald.