Early differentiation dynamics of the trophoblastic lineage and its cross-communication with the embryo

Citation for published version (APA):

Frias Aldeguer, J. (2019). *Early differentiation dynamics of the trophoblastic lineage and its cross-communication with the embryo*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20190411ja>

Document status and date:

Published: 01/01/2019

DOI:

[10.26481/dis.20190411ja](https://doi.org/10.26481/dis.20190411ja)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Download date: 26 Apr. 2023

English summary

Mouse embryonic development spans over a period of 21 days. During this time, as cells proliferate, they also specialize in order to carry out different functions. After egg fertilization, the zygote undergoes a series of symmetric divisions until the morula stage. All the cells included in the early morula have the potential to specialize (or differentiate) into any cell type. The process of differentiation is gradual and goes through several partially differentiated states only present in the embryo. It is at the morula stage that the first differentiation occurs, in a process known as the first lineage commitment, event leading to differentiation into Inner Cell Mass (ICM) and Trophectoderm (TE). While the ICM represents the embryonic compartment, precursor of all the tissues present in the adult, the TE represents the first extraembryonic compartment which will develop into the placenta. After the first lineage commitment, the TE remains surrounding the ICM and cavitates leading to a cystic structure. This morphology gives the name to the next embryonic stage known as the blastocyst. Until this stage, the embryo has not yet implanted in the uterus. Such implantation is mediated by the TE and for it to occur, partial differentiation needs to occur in both embryonic and extraembryonic compartment. Differentiation of a subset of cells in the TE is necessary for initial attachment and invasion of the endometrium.

We are capable of culturing *in vitro* the analogues of the cells in the ICM and the TE. Embryonic Stem Cells (ESCs) are the analogues of the embryonic compartment while Trophoblast Stem Cells (TSCs) represent the extraembryonic counterpart. Both of these are stem cells, meaning that are cells with the potential to differentiate into all specialized derivatives. Although the ESCs and TSCs are representative of the cells in the ICM and TE respectively, the TSCs we are capable of culturing show certain aberrations when directly compared with the TE cells.

In the first two experimental chapters of this thesis, we focused on characterizing those TSC aberrations as well as trying to correct for them. In order to do so we relied on the expression of a set of genes which serve as a reliable approximation for checking the differentiation state of TSCs. One of those genes is known as *Cdx2*. By looking for regulators capable of increasing the expression of *Cdx2* in our TSCs culture, we were able to find new culture conditions that make the cells more comparable that those present in the TE.

Our group previously managed to develop a protocol which under specific conditions combines ESCs and TSCs leading to structures functionally and morphologically comparable to the mouse blastocyst. We called this structures “blastoids”. Importantly, blastoids are capable of implanting in the uterus of females triggering a response in the endometrium only comparable to the one observed upon implantation of real embryos.

Blastoids can be generated in large numbers. This attribute makes the blastoid a suitable tool for genetic or pharmacological screenings as well as for studying the interaction between

embryonic and extraembryonic compartments. In Chapter 4 we made use of the blastoid for identifying a pathway that originates from the embryonic compartment and leads to proliferation and cavitation of the TE-like cyst.

Although the blastoid have an extremely promising potential in the fields of developmental biology, in vitro fertilization and pharmaceuticals, the efficiency at which we obtain blastoids is suboptimal since only 10 to 15% of the structures we recover show the correct morphology and cell distribution. We hypothesized that an improvement of the culture of TSCs would ultimately lead to an increase in blastoid formation efficiency. By using the Cdx2 regulators we discovered in chapter 3, we were able to generate new culture conditions that lead to cells more comparable to the cells in the TE. We could confirm that these new TSCs have a better communication with ESCs making them significantly more efficient at generating blastoids.

By studying the nature of those blastoids, we were able to observe that the extraembryonic compartment of blastoids generated with the new TSCs autonomously show partial differentiation in the trophoblastic layer, a process necessary for attachment to the endometrium.

The work described in this book represents an improvement in the culture of TSCs, making them more suitable for their use as a model for studying trophoblastic lineage development as well as for the generation of more reliable *in vitro* models such as the blastoid.

Nederlandse samenvatting

De ontwikkeling van een muizenembryo duurt 21 dagen. Tijdens deze ontwikkeling prolifereren de cellen in het embryo zich. Tegelijkertijd specialiseren de cellen zich ook, zodat ze hun specifieke taken kunnen uitvoeren. Nadat de eicel bevrucht is, ondergaat de zygote een aantal symmetrische delingen, zodat de zygote zich ontwikkelt tot een morula. Alle cellen in de jonge morula hebben de potentie om zich te specialiseren (of te differentiëren) in iedere celtype. Het proces van deze differentiatie is geleidelijk, en tijdens dit proces ondergaan de cellen meerdere fases van differentiatie die alleen in het embryo plaatsvinden. Tijdens het morula stadium beginnen de eerste cellen zich te differentiëren. Dit proces wordt ook wel de eerste lineage commitment genoemd. Hiermee wordt bedoeld dat de cellen hun eerste stappen van differentiatie ondergaan, en zich beginnen toe te spitsen op hun specialisatie. Deze fase leidt tot differentiatie van de binnenste zogeheten Inner Cell Mass (ICM) en het Trophectoderm (TE). De ICM is de massa die later het embryo zelf zal vormen en bevat de voorlopercellen van alle weefsels die later in het volwassen organisme aanwezig zullen zijn. Het TE vormt zich rondom de ICM, en vormt later de placenta. Tijdens het eerste lineage commitment vormt het TE zich om de ICM en maakt een bolvormige structuur, zoals een cyste. Deze bolvormige structuur wordt ook wel de blastocyste genoemd. Tot aan dit stadium heeft het embryo zich nog niet genesteld in de baarmoeder. Deze innesteling wordt verzorgd door het TE. Om dit te laten gebeuren is het nodig dat zowel het ICM als het TE deels gedifferentieerd zijn. Differentiatie van een deel van de cellen in het TE is nodig voor initiële binding en het zich ingraven in de baarmoederwand.

Wij zijn in staat om in vitro analogen van de ICM en TE cellen te kweken. Embryonale stamcellen (ESCs) zijn de analogen van het embryonale deel, het ICM, terwijl de Trofoblast stamcellen (TSCs) het extra-embryonale deel, het TE, representeren. Beide celtypen zijn stamcellen. Dit betekent dat deze celtypen de mogelijkheid hebben om naar alle gespecialiseerde celtypen te differentiëren. Hoewel de ESCs en TSCs de cellen van het ICM en het TE representeren, zijn er voornamelijk enkele verschillen tussen gekweekte TSCs en de TE-cellen.

In de eerste twee hoofdstukken van dit proefschrift focussen we ons op de karakterisatie van de verschillen tussen TSCs en TE cellen. Ook proberen we deze verschillen te corrigeren. Hiervoor hebben we de expressie van een set genen gekozen die kunnen worden gebruikt om de staat van differentiatie van TSCs te bepalen. Één van de genen in die set is *Cdx2*. Door naar regulatoren te kijken die de expressie van *Cdx2* verhogen in gekweekte TSCs, konden we nieuwe kweekcondities vinden die de TSCs meer op TE cellen laten lijken.

Onze onderzoeksgroep heeft een protocol ontwikkeld met specifieke kweekcondities waardoor de ESC en TSC gecombineerd een structuur vormen die functioneel en morfologisch vergelijkbaar is met de blastocyste van de muis. We noemen deze structuren “blastoiden”. De blastoiden zijn in staat om zich te nestelen in de baarmoeder van de muis, met als gevolg dat er een reactie plaatsvindt in het endometrium. Deze reactie lijkt sterk op de reactie die

plaatsvindt wanneer er een echt embryo zich innestelt.

De blastoïden kunnen worden gekweekt in grote aantallen. Deze eigenschap is ideaal voor genetische of farmacologische studies, of voor het bestuderen van de interactie tussen de embryonale en extra-embryonale onderdelen. In hoofdstuk 4 maken we gebruik van de blastoïde voor het identificeren van een signaaltransductieroute dat stamt van het embryonale deel, en wat leidt tot de proliferatie en de vorming van de holte in een TE-achtige cyste.

Hoewel de blastoïde een veelbelovende nieuwe techniek is in het onderzoeksveld van de ontwikkelingsbiologie, in vitro fertilisatie en farmacologie, is de efficiëntie waarmee we blastoïden kunnen kweken suboptimaal. Slechts 10 tot 15 procent van de structuren die we overhouden in de kweek vertonen het juiste aantal cellen en de correcte morfologie. Wij veronderstelden dat een verbetering van de kweekcondities van de TSCs zou leiden tot een verhoogde efficiëntie van blastoïde-formatie. Door Cdx2-regulatoren te gebruiken, zoals te lezen in hoofdstuk 3, kwamen we erachter dat dit tot verbeterde kweekcondities leidde, en dat de cellen meer vergelijkbaar waren met het TE. We bevestigden dat deze nieuwe TSCs een verbeterde communicatie hadden met de ESCs, waardoor ze significant beter waren in het genereren van blastoïden.

Door de blastoïden te bestuderen, zijn we erachter gekomen dat de extra-embryonale structuur van de blastoïden die met deze nieuwe TSCs waren gekweekt een gedeeltelijke differentiatie naar de trofoblastische laag vertonen. Dit proces is cruciaal voor de verbinding met het endometrium.

Dit proefschrift toont een verbetering aan wat betreft de kweekcondities van TSCs, waardoor deze meer geschikt zijn voor het gebruik als model voor de ontwikkeling van de trofoblastische cellen. Daarnaast wordt er aangetoond dat er hierdoor een verbeterd in vitro model zoals de blastoïde kan worden gegenereerd.

Resumen en español

El desarrollo embrionario en ratón dura 21 días. Durante este tiempo, mientras las células proliferan, también se especializan para llevar a cabo distintas funciones. Después de la fertilización del óvulo, el cigoto experimenta una serie de divisiones celulares simétricas hasta el estadio de mórula. Todas las células que forman parte de la mórula tienen el potencial de especializarse (o diferenciarse) en cualquier tipo celular. Este proceso de diferenciación es un proceso gradual, pasando por múltiples estadios parcialmente diferenciados que solo se dan en el embrión. Durante el estadio de mórula, ocurre el primer proceso de diferenciación, un evento que da lugar a la Masa Celular Interna (MCI) y al Trophectodermo (TE). Mientras que la MCI representa el linaje embrionario, precursor de los tejidos presentes en el adulto, el TE representa el linaje extraembrionario, precursor de la placenta. Tras comprometerse a uno de esos dos linajes, las células del TE quedan rodeando las células de la MCI y empiezan a generar una cavidad dando lugar a una estructura cística. Esta forma es la de que da nombre al siguiente estadio embrionario, conocidos como blastocisto. Hasta este punto, el embrión aún no se ha implantado en el útero. Dicha implantación es llevada a cabo por el TE y para que ocurra, es necesario que se dé una diferenciación parcial tanto en el linaje extraembrionario como en el embrionario. La diferenciación parcial en un grupo de células del TE es crucial para que haya un contacto inicial entre endometrio y embrión.

Es posible cultivar *in vitro* los análogos de las células la MCI y de el TE. Las células madre embrionarias (CMEs) son los análogos de las células de la MCI mientras que las células madre trofoblásticas (CMTs) son los análogos de las células del TE. Estos dos tipos celulares, como células madre, tienen el potencial de diferenciarse en otros tipos celulares derivados. Aunque las CMEs y las CMTs representan las células de la MCI y del TE respectivamente, las CMTs que podemos cultivar a día de hoy muestran ciertas aberraciones cuando las comparamos directamente con las células del TE.

En los dos primeros capítulos experimentales de esta tesis, nos centramos en caracterizar y corregir las aberraciones que observamos en las CMTs. Para ello, nos hemos fijado en la expresión de un grupo de genes que nos sirve como aproximación para comprobar el estado de diferenciación de las CMTs. Uno de esos genes es *Cdx2*. Buscando moduladores de la expresión de *Cdx2* en nuestro cultivo de CMTs, conseguimos encontrar nuevas condiciones de cultivo que permiten obtener células más similares a aquellas presentes en el TE.

Nuestro grupo ha conseguido desarrollar un protocolo que bajo ciertas condiciones, combina CMEs y CMTs dando lugar a estructuras funcional y morfológicamente comparables al blastocisto. Hemos llamado a estas estructuras "blastoides". Los blastoides son capaces de implantar en el útero de hembras, generando una reacción en el endometrio solo comparable a la observada cuando un verdadero embrión se implanta.

Podemos generar blastoides en grandes cantidades. Esta propiedad hace de los blastoides una

herramienta adecuada para su uso en estudios genéticos y farmacológicos además de para estudiar la interacción entre linajes embrionario y extraembrionario. En el capítulo 4 hicimos uso de los blastoides para identificar una ruta de señalización con origen en la MCI que promueve la proliferación y cavitación del cisto del TE.

Aún a pesar de que el blastoide tiene un potencial muy prometedor en los campos de biología del desarrollo, fertilización in vitro y farmacología, la eficacia a la que obtenemos los blastoides es sub-óptima ya que solo el 10-15% de las estructuras que recuperamos muestran la morfología y organización celular correcta. Generamos la hipótesis de que una mejoría en el cultivo de CMTs llevaría a un incremento en la eficacia a la hora de generar blastoides. Usando los moduladores de expresión de Cdx2 que descubrimos en el capítulo 3, pudimos generar nuevas condiciones de cultivo que dan lugar a células más similares a las células del TE. Pudimos confirmar que estas nuevas CMTs muestran mejor comunicación con las CMEs, haciéndolas más eficientes a la hora de formar blastoides.

Estudiando la naturaleza de los blastoides generados con las nuevas CMTs, pudimos observar que las células de linaje extraembrionario generaron de manera autónoma una diferenciación parcial, un proceso necesario para el contacto inicial con el endometrio.

El trabajo descrito en este libro representa una mejoría en el cultivo de CMTs, haciéndolas mejores en su uso como modelo para estudiar el linaje trofoblástico en biología del desarrollo así como para la generación de nuevos modelos in vitro de más confianza como el blastoide.