Cell 背靠背 | 利用类器官和机器学习解析打破对称的关键通路

胚胎轴向伸长形成了神经管和侧向中胚层，中胚层进一步形成体节。体节的顺序形成是由多种信号通路 NOTCH、FGF 以及 WNT 通路所控制的【1】。这些信号通路形成体节分割时钟，前后轴形成主要依赖于 FGF、WNT 等信号的梯度。但是在子宫内小鼠胚胎以及人类中建立对称打破的测量和扰动系统受到巨大的伦理挑战，因此，对对称打破的体外研究系统的需求应运而生。类器官（Organoid）成为了可重复性以及稳健性的体外重现系统。

近日，美国哈佛大学 **Sharad Ramanathan** 研究组背靠背发表两篇 ***Cell*** 文章，分别为 ***Controlling organoid symmetry breaking uncovers an excitable system underlying human axial elongation*** 以及 ***Controlling human organoid symmetry breaking reveals signaling gradients drive segmentation clock waves***，**通过建立干细胞来源的类器官对称打破的机器学习生物工程方法，系统性筛选发现 FGF 信号通路对于分节时钟以及体节的前侧决定的关键性作用。**

Cell

CellPress

Article

Controlling organoid symmetry breaking uncovers an excitable system underlying human axial elongation

Giridhar M. Anand,[1,2,3,*] Heitor C. Megale,[1,2,3] Sean H. Murphy,[1,2,3] Theresa Weis,[1,2,3] Zuwan Lin,[4,5] Yichun He,[2,5] Xiao Wang,[5,6] Jia Liu,[2] and Sharad Ramanathan[1,2,3,7,*]

Cell

CellPress

Article

Controlling human organoid symmetry breaking reveals signaling gradients drive segmentation clock waves

Yusuf Ilker Yaman[1,3,*] and Sharad Ramanathan[1,2,3,4,*]

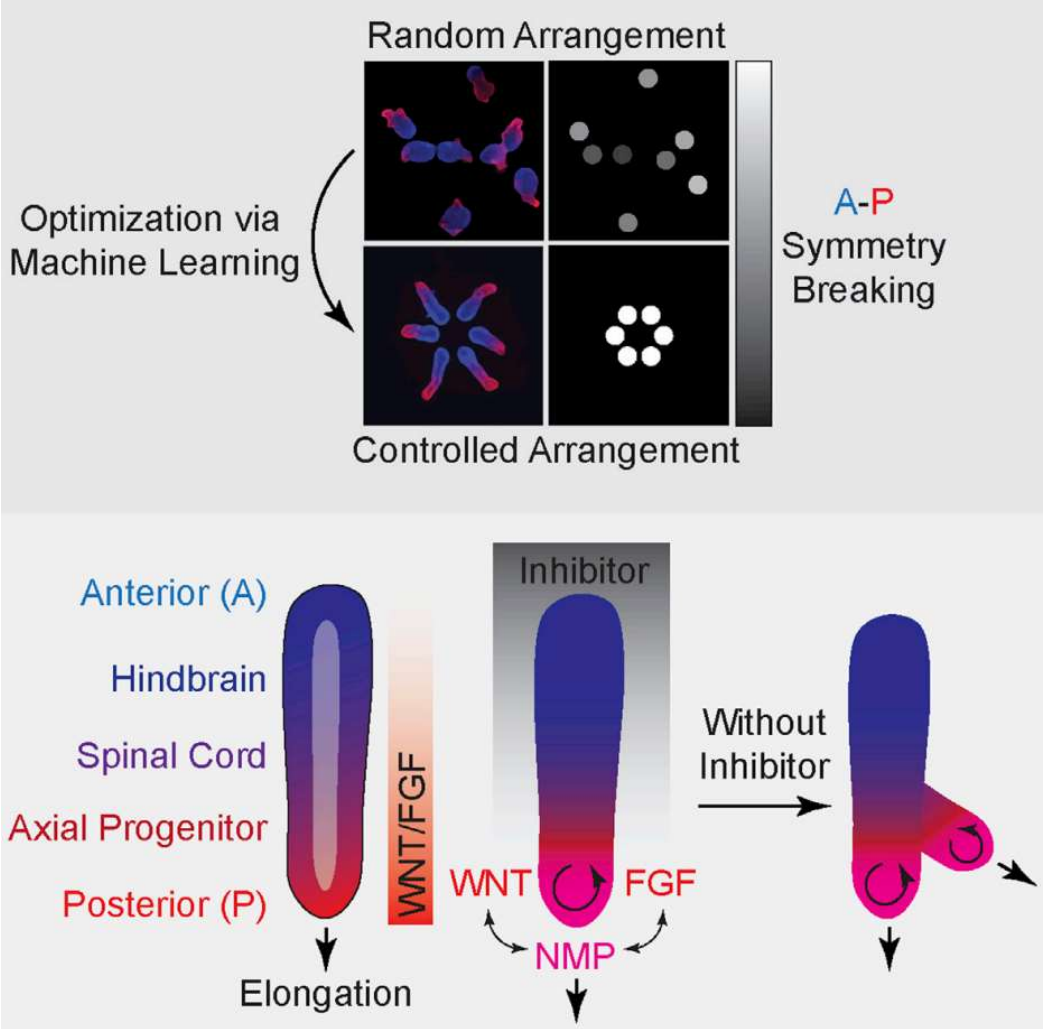
人类胚胎打破对称性形成身体的前后轴，为了开发能够对该过程进行研究的类器官模型，作者们使用基质胶对人诱导多能干细胞在微平台上进行培养和诱导分化。作者们最初会观测到形成的上皮囊状体（Epithelial cysts）呈现随机排列，说明每个单位区域中细胞的密度是不同的。为了产生类器官，作者们将囊状体通过激活 WNT 信号通路以及抑制 BMP 以及 TGFbeta 信号通路进行分化。在分化四天后，作者们对类器官进行分化细胞标记物免疫染色，CDX2 标记类器官后侧，SOX1 标记神经管前侧细胞，证明了分化后的类器官的 A-P 轴的建立。

进一步地，作者们为了对逐渐延伸的类器官进行系统性的分析，希望建立一个大规模的机器学习模型。通过对空间分布优化以及 A-P 轴逐渐建立，作者们能够对目标类器官的特征进行记录和分析。正确延伸的类器官能够重现体

内神经管延伸的几个方面，比如粘连蛋白 ZO1 的表达、A-P 轴有丝分裂与细胞核迁移方向一致等。

为了对延伸生长的类器官中细胞类型进行鉴定，作者们使用单细胞 RNA-seq 对类器官进行分析。作者们采集了 12 个 4 天的类器官，获得了 7752 个细胞的高质量转录组信息。通过对细胞类型的聚类分析，作者们发现具有 A-P 轴延伸特征的类器官中包含后脑、脊髓以及轴向祖细胞。在鉴定出组成型细胞类型后，作者们希望对起始类器官轴向延伸的信号进行探究。通过无差别的筛选差异表达的转录因子、受体、分泌因子等，作者们对 WNT 以及 FGF 信号通路基因的表达进行了单细胞分析。作者们发现在延伸的类器官中 WNT 以及 FGF/ERK 信号会极性化的定位在类器官的后部。

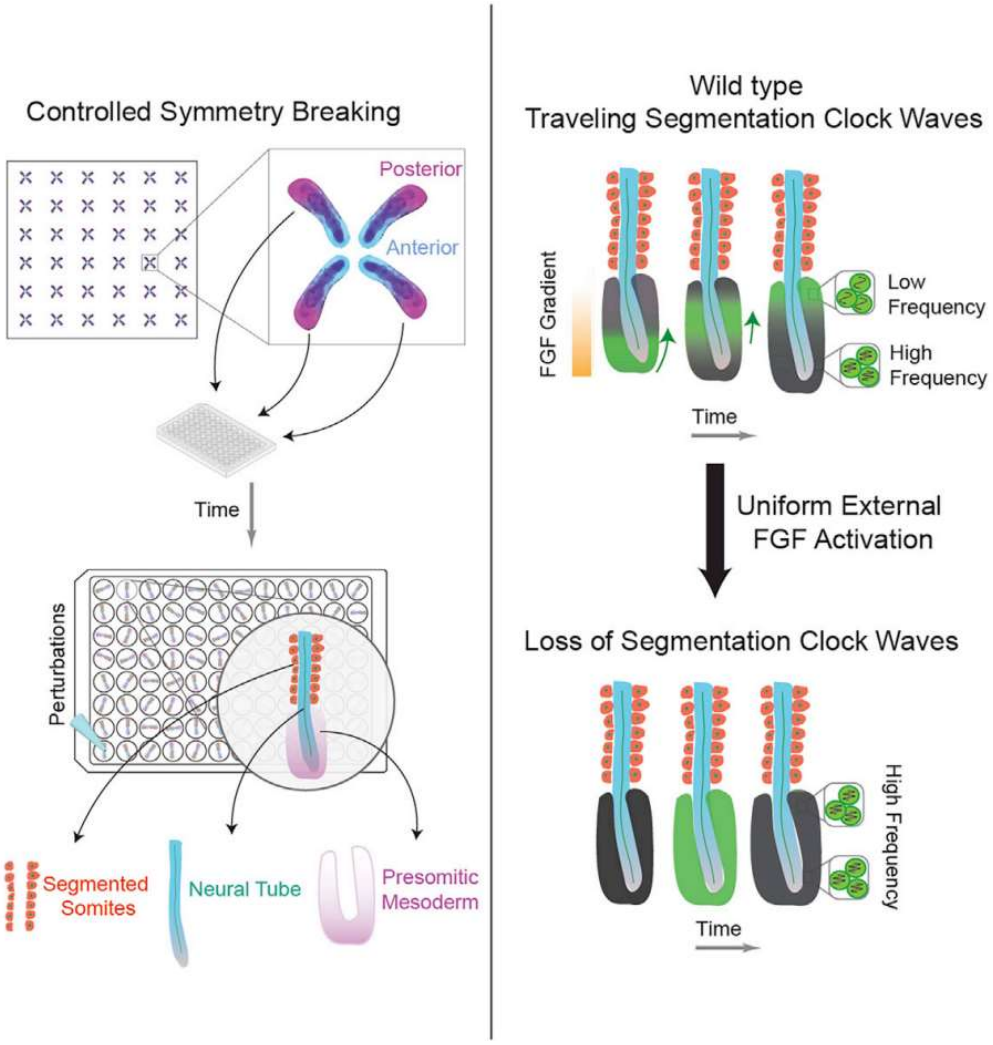
随后作者们想知道 WNT 配体是否会驱动轴向的发生，为此，作者们通过阻碍 WNT 分泌，发现生长四天后类器官的形状会变圆，失去 A-P 轴向变化。进一步地，作者们想知道尾芽中调控 WNT 配体活性的内源和外源因子分别是什么，为此作者们在诱导多能干细胞品系中进行了 CRISPRi 实验敲除 CDX2。到第四天，CDX2 敲除后的类器官变得很短，并且 CDX2 的表达也消失了，说明 CDX2 对于 A-P 轴建立非常关键。另外，作者们发现 WNT 抑制因子形成正反馈环路从而确保类器官中 A-P 轴的稳健形成。



在第二篇文章中，作者的工作通过使用前文所建立的学习平台对类器官对称性打破的机制进行进一步地研究。通过单细胞分析确定了 48 个对于轴向的建立的关键基因。作者们对 WNT、FGF、RA 以及 NOTCH 信号通路的表达梯度进行检测，发现该 A-P 轴类器官能够概括多种不同信号通路在 A-P 轴向的表达特征。

考虑到形态、细胞组成以及信号通路表达谱特征，作者们将 120 小时年龄的类器官作为对人类胚胎体节形成的研究模型。通过该模型，作者们希望确定

顺序体节分节时钟的特征，为了定量化前后体节特征，作者们使用了同时表达不同荧光标记的 MESP2 以及 HES7 的 iPSC 细胞建立的类器官，发现体节顺序分节过程中 HES7 存在振荡波动。作者发现振荡时钟中主要是由 FGF 而非 WNT 信号通路所控制，FGF 梯度驱动 HES7 以一定频率振荡并促进波形的前进，从而促进体节的逐渐形成。



总的来说，这两篇背靠背的文章通过共同建立 A-P 对称性打破的类器官模型，对人类早期胚胎发育过程进行体外模拟，并建立了大规模的机器学习平台，一方面可以对早期胚胎发育过程进行研究，另外一方面该工作也提供了类器官的小分子筛选实验模型。

原文链接：
https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.12.042https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.12.043