

University of Groningen

## Neglected aspects of hormone mediated maternal effects

Kumar, Neeraj

DOI:  
[10.33612/diss.101325389](https://doi.org/10.33612/diss.101325389)

**IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.**

*Document Version*  
Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*  
2019

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*  
Kumar, N. (2019). *Neglected aspects of hormone mediated maternal effects: Studies on early embryonic modulation of maternal hormonal signals in avian eggs and related methodological aspects*. University of Groningen. <https://doi.org/10.33612/diss.101325389>

### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

## **Dutch Summary**

## HOOFDSTUK 1

Dit proefschrift focust op aspecten van hormoongemedieerde maternale effecten bij vogels die tot noch toe niet onderzocht zijn. Embryo's van gewervelden worden al vroeg blootgesteld aan moederhormonen. Dit kan gevolgen hebben voor het fenotype van het nageslacht (hormoongemedieerde maternale effecten). Eieren leggende soorten zijn vaak gebruikt om deze effecten te bestuderen, daar het embryo ontwikkelt in het ei, waar de moeder haar hormonen afzet. Hierdoor zijn experimentele manipulaties van deze blootstelling mogelijk, zonder de moeder daarbij te hinderen. Vogelsoorten zijn een bijzonder geschikt model omdat de ecologie van vogels vaak bekend is en gemakkelijk in het veld kan worden bestudeerd, waardoor studies naar de adaptieve betekenis van maternale effecten mogelijk worden.

Verschillende studies hebben steroïden, meestal androgenen, geïnjecteerd in vogeleieren, waardoor de variatie in de afzetting van hormonen in de dooier door de moeder wordt nagebootst. Daarbij is een breed scala aan effecten van de behandeling op de nakomelingen gevonden. De fenotypische effecten omvatten kenmerken zoals de broedtijd, het succes van het uitkomen, de stofwisseling, de immuun functie, de endocriene functie, de groei, het concurrentievermogen, de voortplanting, de keuze van de partner en de overlevingskans. Dit suggereert dat de moeder in staat is om het fenotype van het nageslacht aan te passen aan de huidige omgeving via haar steroïde hormonen, maar de onderliggende mechanismen zijn to noch toe onbekend. In voorgaande studies werd (i) de toewijzing van het moederhormoon vaak niet correct bepaald, en (ii) het embryo vaak gezien als een passieve speler en verondersteld een 'slaaf' te zijn van de signalen van de moeder, maar zijn eigenlijke rol in het vertalen van de hormonale signalen van de moeder; de acceptatie en de uiteindelijke omzetting van deze signalen (zie Fig. 3 in hoofdstuk 1) is onvoldoende bekend.

## HOOFDSTUK 2

De dosis aan steroïden die voor manipulatie in de experimentele studies is gebruikt, is gebaseerd op de fysiologische niveaus, die vaak gemeten wordt met behulp van radioimmunoassays (RIA's). In hoofdstuk 2 hebben we de vraag behandeld: zijn RIA-gebaseerde hormoonmetingen in eieren betrouwbaar? We vonden dat de veelgebruikte RIA-methode, d.w.z. zonder uitgebreide extractie- en zuiveringsstappen en antilichaamkarakterisering, afwijkende hormoonmetingen gaf in vergelijking met de meer betrouwbare massaspectrometriemethode. Daarom lijken de voorgaande bevindingen van RIA-gebaseerde experimentele manipulatie van ei-hormonen onwaarschijnlijk mede door het gebruik van farmacologische doses in plaats van de beoogde manipulatie in het fysiologisch voorkomende bereik. Aangezien de mate waarin RIA's afwijkende meetingswaarden gaven, afhankelijk is van de soort en de volgorde waarin de eieren gelegd zijn, lijken op RIA gebaseerde studies ook inadequaaf voor de interpretatie van variaties binnen een soort, in de hormoontoewijzing van het moederdier, alsook voor vergelijkingen tussen soorten, die

de eco-evolutionaire verklaringen voor hormoongemedieerde maternale effecten beïnvloeden.

Daarom moeten hormoongemedieerde maternale effecten worden geverifieerd met behulp van biologisch relevante (d.w.z. binnen het fysiologische bereik van elke soort) hormoondoses op basis van massaspectrometrische metingen. Dit zou ook een mogelijke verklaring kunnen zijn voor de discrepantie die in de literatuur wordt gerapporteerd (sommige studies vinden een positief effect van hormooninjecties op een bepaalde eigenschap, terwijl andere geen effect of negatieve effecten vinden), aangezien de mate waarin verschillende studies de geïnjecteerde farmacologische doses per soort en legvolgorde kunnen verschillen, alsook de kenmerken van de gebruikte RIA.

Bovendien wordt in de studies op basis van RIA's vaak melding gemaakt van 5 $\alpha$ -dihydrotestosteron (DHT), het krachtigste androgeen, dat in de eidooier aanwezig is. Intrigerend genoeg was 5 $\alpha$ -DHT niet waarneembaar in de eidooier van één van de drie bestudeerde vogelsoorten (kokmeeuw, rotsduif en rode kamhoen), bij analyse door LC-MS/MS, ondanks het feit dat de kwantificatielimiet van 5 $\alpha$ -DHT zo laag is als 0,1 nmol/L, wat een voorzichtigheid rechtvaardigt bij aannames over de betrouwbaarheid van de klassieke radio-immunoassays voor de hormoonanalyses van de eieren.

### HOOFDSTUK 3

De differentiële hoeveelheid moederhormonen in de dooier van pas gelegde eieren naar de omgeving van het moederdier en de legvolgorde worden verondersteld een differentiële toewijzing van de moeder te vertegenwoordigen. Verschillende studies hebben hormonen in vogeleieren geïnjecteerd die deze differentiële embryonale blootstelling aan moederhormonen nabootsen. Deze benadering heeft echter inconsistenties aan het licht gebracht in de omvang en richting van hormoongemedieerde maternale effecten (zie hierboven). We vonden dat (1) moederhormonen in vogeleieren al verrassend snel gemetaboliseerd worden, namelijk tussen ovulatie en ovipositie, (2) de snelheid en richting van metabolisme verschilt tussen eieren die een andere positie hebben binnen de legorde, en (3) dat dit niet te wijten is aan van de moeder afkomstige enzymen in de dooier.

Deze bevindingen hebben belangrijke gevolgen op het gebied van hormoon gemedieerde maternale effecten: (1) aangezien de schattingen van de hormoontoewijzing van het moederdier vanuit de ovipositie voor injecties inadequaat zijn, vereist de interpretatie van zowel de resultaten van dergelijke experimenten als hun ecologische en evolutionaire interpretaties validatie, en (2) verschillende eitjes van dezelfde soort vertonen systematische verschillen in hormoonmetabolisme, wat mogelijk een verklaring kan zijn voor de discrepantie tussen de resultaten van hormooninjectie-experimenten en een nieuw perspectief geeft op gezinsconflicten wanneer dit extreem vroege metabolisme embryonaal is.

#### HOOFDSTUK 4

Over het algemeen wordt gedacht dat ei steroïden van het moederdier de embryonale lichaamsweefsels moeten bereiken om functioneel te zijn. Maar hoe en wanneer dit gebeurt blijft onduidelijk, ook of moeder androgenen in hun actieve vorm in embryonale weefsels terechtkomen of reeds gemetaboliseerd zijn. We injecteerden met stabiele isotopen gelabelde primaire androgenen, testosteron (T) en androstenedione (A4), in kippeneidooiers en testten hun aanwezigheid in embryonale weefsels na vijf dagen incubatie. Met behulp van massaspectrometrie, een zeer betrouwbare methode voor de moleculaire identificatie, vonden we dat geïnjecteerde androgenen bijna volledig geklaard waren uit het homogenaat van de dooier, maar niet werden gevonden in embryonale weefsels, wat duidt op hun omzetting naar andere stoffen. We hebben ook aangetoond dat deze androgenen niet worden geconjugeerd of omgezet in een meer krachtige downstream metaboliet, DHT, of het conjugaat ervan. Bovendien is het onwaarschijnlijk dat androgenen worden gearomatiseerd in oestrogenen, zoals oestradiol (E2) in zo een vroeg stadium van embryonale ontwikkeling. Omdat aromatase (het enzym dat nodig is voor aromatisatie) komt pas na dag 5 van de incubatie in kip tot expressie, hetgeen experimenteel ondersteund is door het ontbreken van een dergelijke vroege omzetting van androgeen naar oestrogenen.

Onze bevindingen duiden dat de androgenen worden omgezet in metabolieten waarvan de biologische functies nog niet gekarakteriseerd zijn. Het suggereert ook dat de maternale effecten van verhoogde hormoonblootstelling van het embryo ofwel gemedieerd worden door de metabolieten zelf, ofwel de effecten zeer vroeg plaatsvinden (voordat de actieve hormonen gemetaboliseerd worden), misschien door receptor-gemedieerde genregulatie, of via een niet-genetisch route tijdens de vroege embryonale ontwikkeling. Zo openen onze bevindingen nieuwe onderzoeksmogelijkheden voor mechanismen die ten grondslag liggen aan hormoon gemedieerde maternale effecten. Bovendien zouden de resultaten kunnen verklaren hoe gonadale steroïden van de moeder hun effecten kunnen uitoefenen zonder de seksuele differentiatie te verstoren, aangezien ze worden gemetaboliseerd nog voor de seksuele differentiatie van de gonaden en de hersenen, en de eigen hormoonproductie van het embryo begint.

#### HOOFDSTUK 5

Vaak wordt aangenomen dat bij hormoon gemedieerde maternale effecten het embryo slechts een passieve rol speelt, maar sommige studies wijzen anders uit. Om de rol van het embryo te bestuderen, analyseerden we de dynamiek van een breed scala aan gonadale steroïde hormonen tijdens de vroege incubatiefase (eerste 4,5 dagen) in eieren van de rotsduif, waarbij de laatste gelegde eieren van een leg meer maternale androgenen krijgen. We vonden dat (1) de actieve moederhormonen zoals progesteron (P4) en T substantieel en snel gemetaboliseerd werden, met een overeenkomstige toename van zogenaamd minder krachtige metabolieten, zoals pregnenolon en etiocholanolon, al op een kwart van

de totale incubatieperiode, (2) dit gebeurde enkel in bevruchte en niet in onbevruchte eieren, en (3) de dynamiek van de androgeenstofwisseling verschilde tussen de eitjes met een verschillende legorde - de later gelegde eieren hadden een hoger androgeen metabolisme.

Onze resultaten bevestigen niet alleen eerdere studies over de rol van het embryo bij de vertaling van hormonale signalen van de moeder, maar tonen ook aan dat de eieren systematisch verschillen (hogere stofwisseling in de laatste legpositie van een legsel) in de hormoonomzetting naargelang hun positie in de legvolgorde in de legvolgorde binnen een leg. Dit suggereert dat het embryo in staat zou kunnen zijn om zijn metabole capaciteit aan te passen aan de signalen van de moeder, aangezien de hormoonafzetting van de moeder over de legvolgorde verschilt. Dit suggereert ook dat embryo's actieve spelers zijn in de omgang met maternale signalen in plaats van een passieve rol te spelen, zoals eerder is aangenomen, en dus hun eigen belangrijke rol kunnen spelen binnen gezinsconflicten. Zo kan de moeder bijvoorbeeld ei-hormonen manipuleren om haar eigen fitheid over die van haar nakomelingen te vergroten, afhankelijk van factoren zoals de kwaliteit van de vader en het geslacht van de nakomelingen, in combinatie met andere omgevingsfactoren. Zo zullen embryo's die hun endocriene omgeving actief kunnen reguleren door natuurlijke selectie bevoordeeld worden. Onze resultaten tonen aan dat in studies naar hormoon gemedieerde maternale effecten de rol van het embryo niet de aandacht heeft gekregen die het verdient. De resultaten creëren echter ook een schijnbare paradox, aangezien het bekend is dat de vroege verschillen in deze hormonen aanzienlijke effecten kunnen hebben op het kuiken, terwijl we ook aantonen dat deze verschillen bij 4,5 dagen incubatie nauwelijks meer aanwezig zijn. Deze paradox kan op drie manieren worden opgelost: ten eerste kunnen de actieve hormonen al voor hun uitputting receptor-gemedieerde genetische en/of niet-genetische veranderingen in embryonaal weefsel induceren; ten tweede kunnen steroïden intercaleren met het DNA en daardoor niet-receptor gemedieerde genetische effecten hebben; ten derde kan het embryo de geconjugeerde metaboliëten tijdens de ontwikkeling weer omzetten in hun niet-geconjugeerde vormen en kunnen deze metaboliëten zelf biologisch actief zijn en niet-genetisch werken (bijv. door niet rechtstreeks de genexpressie maar andere cellulaire signaalroutes te beïnvloeden). Tegelijk, omdat de bevindingen dat de verschillen in moederhormonen aanzienlijke effecten kunnen hebben op de ontwikkeling en het gedrag van het kuiken, zijn uitgevoerd met behulp van farmacologische doses (zie hoofdstuk 2) en gemeten op ogenschijnlijk verkeerde tijdstippen (zie hoofdstuk 3), kunnen die bevindingen zelf biologisch irrelevant zijn. Dit biedt meerdere opties voor vervolgonderzoek.

De bevindingen lossen verder een reeds lang bestaande raadsel op over hoe gonadale steroïden van de moeder in het ei maternale effecten kunnen induceren zonder de embryonale seksuele differentiatie te verstoren, aangezien we aantonen dat het embryo in staat is om de meeste van de actieve moedersteroïden te metaboliseren nog voordat het proces van seksuele differentiatie begint. Deze bevindingen zijn naar onze mening een

belangrijke leidraad voor mechanistische studies die dringend nodig zijn voor correcte functionele interpretaties van hormoon gemedieerde maternale effecten, en tegelijkertijd bieden ze vanuit ecologisch perspectief opties voor nieuwe onderzoeksmogelijkheden.

## HOOFDSTUK 6

Om functioneel te zijn, moeten de androgenen de embryonale weefsels bereiken en die weefsels moeten androgeenreceptoren (AR) hebben. Echter, zeer vroeg in de incubatie, worden androgenen in de dooier door het embryo snel gemetaboliseerd naar zogenaamd minder krachtige vormen (zie hoofdstuk 4 en 5). Bovendien zijn de steroïden zijn lipofiel, en hoe het embryo in staat is om deze hormonen op te nemen van de dooier in de hydrofiele circulatie om hun effecten op het lichaamweefsel uit te oefenen blijft vooralsnog een raadsel. Met behulp van kippeneieren ontdekten we voor het eerst dat het embryo AR en oestrogeenreceptoren (ER) tot expressie brengen in de extra-embryonale membranen (EM's), al op een kwart van de totale incubatietijd tot het uitkomen, voordat de eigen hormoonproductie begint, een nieuwe optie voor de werking van moederhormonen biedt. Ten slotte laten we zien dat het embryo met een verhoogd gehalte aan androgeen in de dooier de AR-expressie in de EM's downreguleert, wat erop duidt dat het embryo zich kan aanpassen aan de signalen van de moeder.

De resultaten brengen het onderzoeksveld vooruit door een oplossing te bieden voor drie reeds lang bestaande vragen in het veld: (1) de vraag van de hormoonopname van lipofiele dooier naar embryonale circulatie, omdat we laten zien dat de opname eventueel niet nodig is - de hormonen kunnen namelijk werken op de receptoren van EM's, die zich op het grensvlak van dooier en embryonale circulatie bevinden, (2) de vraag of het embryo slechts een passieve ontvanger is van de signalen van de moeder, wat de moeder de overhand zou geven in een familiaal conflict. Aangezien we een actieve rol van het embryo laten zien in de aanpassing van zijn receptor expressie in de EM's aan de hormoonspiegels van de dooier, duidt dit erop dat het embryo niet alleen een slaaf is van de signalen van de moeder, en (3) moedersteroïden van de gonaden hun effecten kunnen uitoefenen zonder de seksuele differentiatie van het embryo te beïnvloeden, aangezien de hormonen niet het embryonale lichaamweefsel hoeven te bereiken, maar ook via EM's kunnen werken. Dergelijke vroege en niet-specifieke werking van maternale hormonen kan ook verklaren waarom hun effecten op de nakomelingen zo divers van aard zijn, aangezien de effecten zeer vroeg tijdens de ontwikkeling van een organisme zouden plaatsvinden en dus weid kunnen reiken, in plaats van beperkt te blijven tot een bepaald weefsel, bijv. de hersenen of gonaden.

Deze bevindingen bieden nieuwe mogelijkheden, niet alleen voor andere ovipareuze soorten, maar ook voor onderzoek bij zoogdieren, waarbij noch de expressie van steroïde receptoren in de foetale placenta noch hun expressie in relatie tot moederhormonen in een zo vroeg stadium is bestudeerd. De resultaten openen ook nieuwe onderzoeksrichtingen met betrekking tot mechanismen voor hormoon gemedieerde maternale effecten, zoals de activering van de EM-receptoren en hun cellulaire en fysiologische effecten in het embryo.

## **HOOFDSTUK 7**

Naast deze samenvatting hierboven per hoofdstuk, rapporteer ik verder in hoofdstuk 7 hoe deze verschillende studies zich tot elkaar verhouden, een mogelijke eco-evolutionaire betekenis van de in dit proefschrift gerapporteerde mechanistische bevindingen, de relevantie van de bevindingen bij vogels voor andere gewervelde taxa, en een algemene conclusie.



