



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Unravelling cell fate decisions through single cell methods and mathematical models

Mircea, M.

Citation

Mircea, M. (2022, December 20). *Unravelling cell fate decisions through single cell methods and mathematical models*. *Casimir PhD Series*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3505763>

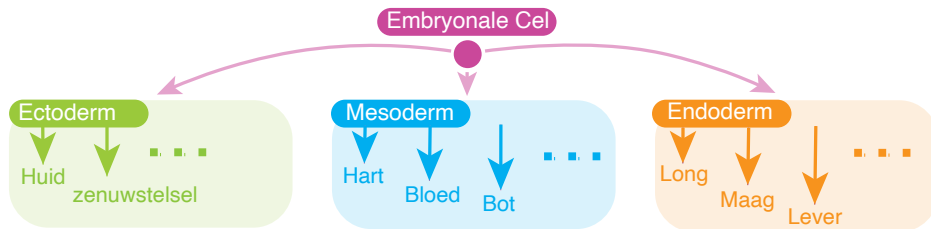
Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3505763>

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

SAMENVATTING



Figuur 6.8: De drie celtypen die tijdens de gastrulatie voorkomen.

Het menselijk leven begint met één bevruchte eicel die zich ontwikkelt tot de ongeveer 30 biljoen cellen waaruit ons lichaam is opgebouwd. In het begin is het ei slechts één enkele cel met het potentieel om zich te delen en te veranderen in uiterlijk, functie en samenstelling. Deze veranderingen zijn nodig om zich tot een volledig mens te ontwikkelen, waarbij cellen van het hart heel anders zijn dan cellen in de longen of de hersenen. Er wordt geschat dat wij ongeveer 200 verschillende celtypen in ons lichaam hebben. Cellen in een vroeg stadium na de bevruchting hebben nog het potentieel om elke cel van het lichaam te worden. Deze noemen we **embryonale cellen**. De weg van de embryonale cel naar een volledig gespecialiseerde cel bevat vele tussenstadia. We kunnen ons dit pad voorstellen als onze weg naar een carrière. Als kind kunnen we nog alles worden wat we willen, maar op school en aan de universiteit nemen we beslissingen die ons specialisatiegebied verder inperken. Met elke beslissing die we nemen komen we een stap dichterbij een gespecialiseerd vakgebied en tegelijkertijd wordt het minder waarschijnlijk om van loopbaan te veranderen. Een van de eerste en meest cruciale beslissingsmomenten in de ontwikkeling is bijvoorbeeld de **gastrulatie** (zie Fig. 6.8). Op dat moment ontstaan drie verschillende celtypen uit de embryonale cellen. Dit zou vergelijkbaar zijn met het maken van een keuze voor een universitaire studie. Deze keuze zal, in de meeste gevallen, de rest van ons leven beïnvloeden. Op dit punt kan de cel kiezen tussen één van de drie celtypen: endoderm, mesoderm en ectoderm. Deze keuze zal de toekomstige loopbaankeuzes beperken: Mesoderm wordt bijvoorbeeld het hart, de bloedcellen of het botweefsel; Ectoderm wordt het zenuwstelsel of de huid; Endoderm wordt de lever, de maag of de longen. In deze samenvatting wil ik u verder begeleiden op de reis van de embryonale cel.

embryonale cellen:

Cellen van het embryo die de potentie hebben om elke cel van het lichaam te worden.

gastrulatie:

Het punt waar drie belangrijke celtypen ontstaan: endoderm, mesoderm en ectoderm.

Om werkelijk te begrijpen hoe een enkele cel beslissingen neemt om een gespecialiseerd celtype te worden, moeten we het binnenste van de cel bekijken. We moeten uitzoeken waar deze informatie is opgeslagen en hoe deze wordt gebruikt. Elke cel in ons lichaam bevat hetzelfde DNA, dat gedurende het hele leven van de cel bewaard blijft. Het draagt

Informatiestroom in een cel:

DNA → RNA → eiwitten

informatie over de bouwstenen van ons lichaam. Om preciezer te zijn bestaat het uit vele genen die in het DNA zijn gecodeerd. Elk gen bevat andere informatie, bijvoorbeeld over de kleur van de ogen, de haarkleur of de lengte. Het bevat ook genen die celtypes specificeren. Voor elk celtype moeten dus andere genen actief worden. Om dat te doen, wordt de informatie die de cel op dat moment nodig heeft doorgegeven van het DNA naar het RNA. Elke cel in ons lichaam heeft andere RNA-moleculen. De laatste informatieoverdracht vindt daarna plaats van RNA naar eiwit. Er wordt aangenomen dat het DNA ongeveer 20.000 genen bevat die coderen voor een eiwit, en onze cellen kunnen wel 500.000 verschillende eiwitten bevatten. Eiwitten zijn de belangrijkste bestanddelen van de cel omdat zij een groot aantal functies hebben. Eiwitten zijn als de werknemers in een bedrijf, elk van hen heeft een andere taak te vervullen en om het bedrijf te laten werken moet iedereen zijn werk doen. We kunnen de binnenkant van een embryonale cel in ontwikkeling zien als een startend bedrijf. Het moet veel veranderingen aanbrengen in zijn structuur en werknemers tot het een gevestigde onderneming wordt. Met de hulp van alle werknemers in het bedrijf zal het bedrijf uiteindelijk een beslissing nemen voor de volgende fase. Een soort eiwit dat in dit verband belangrijk is, wordt **transcriptiefactor** (TF) genoemd. TF's beslissen welke genen actief zullen zijn en welke ongebruikt zullen blijven in een cel. Zij controleren de eiwitsamenstelling in de cel en kunnen worden gezien als de managers in het bedrijf. Zij kunnen de werknemers in het bedrijf aannemen en ontslaan. TF's die een groot aantal genen kunnen controleren, worden **master TF's** genoemd en zouden dus directeuren van het bedrijf zijn. Vooral master TF's geven de cel vaak zijn identiteit, wat betekent dat in verschillende celtypes verschillende sets van master TF's een rol spelen. Zo heeft elk bedrijf zijn eigen groep van directeuren en samen beslissen zij over het merk van het bedrijf. TF's kunnen elkaar ook controleren en parallel werken. Op die manier vormen ze een netwerk dat een **genregulerend netwerk** wordt genoemd. In dit scenario kunt u zich voorstellen dat de directie meer moet inhuren of zich moet herstructureren. Als verschillende directeuren om een positie twisten, dan kan de winnende groep directeuren beslissen over het nieuwe bedrijfsmerk.

Om te weten welke eiwitten in de cel actief zijn, moeten ze worden gemeten. Het liefst zouden we alle eiwitten in een cel willen meten om te begrijpen wat er precies aan de hand is, maar dat is nog niet mogelijk. Wat wel mogelijk is, is het meten van de RNA-moleculen in een enkele cel met een methode die **scRNA-seq** (Single Cell RNA Sequencing) wordt genoemd. De grootste verzameling van gegevens die tot dusver met deze methode is geproduceerd bevatte 1,3 miljoen hersencellen. Aangezien eiwitten worden gemaakt uit RNA, kunnen we een schatting krijgen van het aantal eiwitten in een cel door het aantal RNA's te meten. scRNA-seq heeft ongekende inzichten opgeleverd in de definitie van een celtype en de ontwikkeling van een embryonale cel. Celtypen worden nu gedefinieerd op basis van het aantal RNA's en vele nieuwe celtypen zijn in de afgelopen decennia op deze manier ontdekt.

transcriptiefactoren:

Een eiwit dat de activiteit van sommige genen kan controleren.

master TF's:

TF's die de activiteit van veel genen kunnen regelen.

genregulerend netwerk:

Een netwerk van eiwitten die elkaar activeren en onderdrukken.

single-cell RNA sequencing:

Een methode om het volledige RNA in elke cel te meten.

In *hoofdstuk 1* van dit proefschrift wordt de celidentiteit in meer detail besproken en wordt uitgelegd welke veranderingen zich voordoen tijdens de ontwikkeling van een cel.

Het schetst vele single-cell technieken die momenteel worden gebruikt om DNA, RNA, eiwitten en chemische modificaties in elke enkele cel te meten. Tenslotte introduceert het wiskundige modellen voor celontwikkeling om de mechanismen en oorzakelijke verbanden tussen genen beter te begrijpen.

Hoofdstuk 2 leidt een methode af, genaamd phiclust, om de zuiverheid van een celtype in scRNA-seq gegevens te evalueren. Aangezien we alle RNA moleculen in een cel kunnen meten, is het belangrijk te evalueren wanneer twee cellen van hetzelfde type zijn. Elke cel heeft verschillende RNA-moleculen als gevolg van willekeurige fluctuaties en processen die geen verband houden met celidentiteit. Onze nieuwe methode kan bepalen of de verschillen in RNA-moleculen tussen cellen verschillend zijn van willekeurige fluctuaties. Als de verschillen groter zijn, dan zijn de cellen van verschillende types. We hebben phiclust gebruikt op scRNA-seq data van een ontwikkelende nier en ontdekten celtypes die voorheen over het hoofd zijn gezien. Op deze manier kan phiclust helpen bij het classificeren en identificeren van de vele celtypen in ons lichaam.

Tijdens de ontwikkeling worden cellen beïnvloed door vele factoren die de beslissing van de cellen kunnen veranderen. Net als voor ons, wanneer we beslissen over een carrièrepad, maakt het uit aan welke omgevingsinvloeden we zijn blootgesteld. Hetzelfde gebeurt voor cellen: Hun beslissing hangt af van de beslissingen van andere cellen in hun omgeving. Een embryonale cel bevindt zich natuurlijk in de baarmoeder van de moeder. Het bestuderen van cellen in de natuurlijke context wordt **in vivo** genoemd. Om ethische redenen is het onmogelijk de menselijke ontwikkeling in vivo nader te bestuderen. Bovendien vinden in vivo veel processen gelijktijdig plaats die we niet kunnen controleren en waarvan we ook niet weten wat hun invloed is. Daarom hebben we besloten te kijken naar systemen **in vitro**. In vitro verwijst naar studies buiten de normale biologische omgeving in een gecontroleerde laboratoriumomgeving. Om embryonale cellen buiten het lichaam te bestuderen, moeten ze worden geëxtraheerd en gekweekt in een schaal. Zodra ze in vitro stabiel zijn, noemen we ze embryonale stamcellen. Embryonale stamcellen behouden nog steeds hun potentieel om elk celtype van het lichaam te worden, maar ze zijn wel uit hun oorspronkelijke omgeving gehaald. Ook om ethische redenen maken biologen vaak gebruik van **geïnduceerde pluripotente stamcellen** (iPSC's). Deze cellen worden uit rijpe cellen van het lichaam gehaald, bijvoorbeeld uit de huid. Vervolgens worden zij omgevormd tot de kenmerken van een stamcel en krijgen zij het potentieel om elk celtype van het lichaam te worden. Samengevat: *embryonale cellen in vivo zijn embryonale stamcellen in vitro*.

in vivo:

Een proces waar cellen in hun natuurlijke biologische omgeving zijn.

in vitro:

Een proces waarbij cellen buiten hun biologische omgeving in een schaal liggen.

geïnduceerde pluripotente stamcellen: Volgroeide cellen die omgevormd zijn tot stamcellen.

endotheliale cellen:

Cellen die vaten vormen in het lichaam.

In *hoofdstuk 3* wordt de invloed van master TF ETV2 op bloedvatcellen in vitro bestudeerd. Cellen die de bloedvaten in ons lichaam vormen worden **endotheelcellen** genoemd. In het algemeen is hun functie het vormen van een barrière tussen een vloeistof, bijvoorbeeld bloed, en het omringende weefsel. In het bijzonder zijn bloedvatvormende endotheelcellen belangrijk voor de goede werking van het hart. Om het besluitvormingsproces van een endotheelcel te begrijpen, werden iPSC's in een schaalje gelegd en door specifieke

chemische signalen gestimuleerd om endotheelcellen te worden. Maar zoals hierboven beschreven, zijn er tussenstadia in de reis van de embryonale cel, die in vitro moeten worden gerespecteerd. Om de metafoor van het carrièrepad te gebruiken, betekent dit dat de cel eerst één van de drie basis carrièrepaden moet kiezen die voor cellen mogelijk zijn. Voor een endotheelcel is dit het mesoderm. Om een bloedvat te worden moet hij zich, bijvoorbeeld tijdens zijn masterstudie, specialiseren in het **cardiaal** mesoderm (dat verband houdt met het hart). Na zijn masterstudie kan hij nu kiezen voor de taak van een endotheelcel. Verrassend is dat bij de experimenten twee celtypes ontstaan: endotheelcellen en hartspiercellen die verantwoordelijk zijn voor de samentrekkingen van het hart. Dit betekent dat de cellen na de masterstudies nog steeds konden kiezen tussen twee verschillende taken. Met behulp van scRNA-seq hebben we aangetoond dat de beslissing afhangt van de master TF ETV2. Als er minder ETV2 is zullen de iPSCs hartspiercellen worden en als er meer ETV2 is zullen ze endotheelcellen worden. Hier kunnen we zien hoe belangrijk master TFs zijn in de beslissing van de cel. Als een master TF is ETV2 in staat de activiteit van andere genen te beheren. Als er voldoende ETV2 in de cel is zal het dus genen van de endotheliale celidentiteit activeren en op deze manier het merk van de cel te veranderen. Na deze verandering is ETV2 niet langer nodig en wordt het uit de regiefunctie ontslagen. Dit is een voorbeeld van een gen-regulerend netwerk en hoe het verandert als de cel keuzes maakt.

Zoals hierboven vermeld, kunnen omgevingsfactoren de beslissing van een cel beïnvloeden. Een manier waarop dit gebeurt is door communicatie met elkaar. Cellen communiceren bijvoorbeeld via specifieke eiwitten, genaamd **liganden**. Dit type eiwit heeft de eigenschap de cel te verlaten en naar de volgende cel te gaan. Als het bij een andere cel aankomt, verandert het het gen-regulerende netwerk van de ontvangende cel. Met andere woorden, dit bericht-eiwit kan de beslissingen van de managers in een ander bedrijf beïnvloeden. In de eerste helft van dit proefschrift lag de nadruk op veranderingen in de interne samenstelling van de cellen. In de tweede helft zullen we dit uitbreiden door de invloed van cellulaire communicatie op de celsamenstelling te onderzoeken. We zullen in vitro celtypes bestuderen die van nature in vivo samen zouden voorkomen om te begrijpen hoe ze elkaar beïnvloeden.

cardiaal:

Gerelateerd aan het hart.

liganden:

Eiwitten die door cellen worden gebruikt om te communiceren.

paraxiaal:

Cellen die langs een as liggen.

In *hoofdstuk 4* wordt de invloed van de ontwikkelingsoorsprong op de cellulaire communicatie in endotheelcellen vergeleken. Dit hoofdstuk is een voortzetting van *hoofdstuk 3*, waarin hartspiercellen en endotheelcellen werden afgeleid. In vivo bestaat het menselijk hart uit meerdere celtypes, waaronder hartspiercellen, bloedvatcellen (endotheelcellen), en bindweefsel. Daarom werden deze drie celtypes samengebracht in een schaalte in vitro om een hartweefselomgeving te creëren. Endotheelcellen vormen echter niet alleen bloedvaten, maar kunnen bijvoorbeeld ook lymfevaten vormen die lymfe in plaats van bloed vervoeren in het lichaam. Wij wilden begrijpen hoe endotheelcellen beslissen welk type bloedvat zij worden: Worden ze ofwel beïnvloed door de communicatie met naburige cellen of beïnvloed door de ontwikkelingsoorsprong van de cel (vorige carrièrekeuzes)? Om deze reden werd een tweede experiment toegevoegd waarbij endotheelcellen zich specialiseerden in het **paraxiale** mesoderm in plaats van het cardiale mesoderm. Endo-

theelcellen afkomstig van het paraxiale mesoderm vormen gewoonlijk lymfevaten in plaats van bloedvaten. Vervolgens werden beide endotheelcellen, van beide achtergronden, in dezelfde hartweefselomgeving gebracht. Met scRNA-seq zagen we dat de RNA-profielen van beide endotheelcellen zeer vergelijkbaar waren na integratie in het hartweefselmilieu. Dit resultaat toont aan dat cellulaire communicatie voor endotheelcellen belangrijker is dan de ontwikkelingsachtergrond. Het laat ook in het algemeen zien dat omgevingsinvloeden een groot effect hebben op de beslissingen van cellen.

In een tweede voorbeeld in *hoofdstuk 5* laten we zien hoe cellulaire communicatie kan leiden tot de vorming van een neurale buis in vitro. We onderzochten cellulaire communicatie in een bekend in vitro modelsysteem, namelijk gastruloïden. Dit systeem is een model voor gastrulatie dat het moment bij uitstek is tussen de drie universitaire studies van de cel (zie Fig. 6.8): endoderm, ectoderm en mesoderm. Wij hebben gebruik gemaakt van embryonale stamcellen van muizen om dit belangrijke beslissingsmoment te reproduceren. De embryonale stamcellen zijn in staat om alle drie celtypen zelf te vormen in een schaalte. Maar we weten uit in vivo studies dat het embryo omgeven is door een laag cellen die we **extraembryonale endodermcellen** (XEN) noemen. Wanneer embryonale stamcellen in vitro werden gecombineerd met XEN-cellen, vormden de XEN-cellen een buitenste laag rond de stamcellen, net als in vivo. Nog opvallender was dat de stamcellen structuren begonnen te vormen die leken op een buis. Deze structuren zijn niet waargenomen zonder toevoeging van XEN-cellen. Ze moeten dus een direct gevolg zijn van de communicatie tussen de twee celtypen. Met scRNA-seq en microscopie hebben wij deze structuren gekarakteriseerd. We ontdekten dat ze evolueren uit het ectoderm, dat verantwoordelijk is voor het ontstaan van het zenuwstelsel. Deze bevindingen wijzen op de betrokkenheid van XEN-cellen bij de vorming van neurale buis-achtige structuren. Bovendien stelden wij vast dat ook de muizenembryonale stamcellen veranderingen veroorzaken in het RNA van XEN-cellen. Dit experiment toont aan dat communicatie tussen cellen al in de vroege stadia van de ontwikkeling van een cel zeer belangrijk is.

In de vorige hoofdstukken hebben we met scRNA-seq en microscopie elementen gekarakteriseerd die betrokken zijn bij de beslissingen van een cel. Echter willen we ook wiskundige modellen formuleren om de causale relaties in een gen-regulerend netwerk te begrijpen. Daarom zijn we begonnen deze gegevens te gebruiken om wiskundige

vergelijkingen op te stellen over geninteracties tijdens de ontwikkeling in *Hoofdstuk 6*. Deze vergelijkingen, die **dynamische systemen** worden genoemd, beschrijven de tijdsevolutie van elk gen in het genregulerend netwerk. In een dynamisch systeem bepalen parameters de sterkte van interacties tussen genen of moleculen. Wij gebruikten fysisch geïnformeerde diepe neurale netwerken (PINNs) om deze parameters met gemeten gegevens te bepalen. Een neurale netwerk is een techniek voor machinaal leren die gewoonlijk met succes wordt gebruikt voor patroonherkenning. PINNs combineren machinaal leren met natuurkundige wetten. Op die manier kunnen we patronen in de gegevens vinden terwijl we ons houden aan vooraf bepaalde wiskundige vergelijkingen. Wij hebben twee relevante experimentele scenario's behandeld: Eén waarbij cellen communiceren en metingen van enkele cellen beschikbaar zijn. Deze gegevens kunnen bijvoorbeeld worden gegenereerd door eiwitten in

extraembryonale cellen van het endoderm:

Cellen die de buitenkant van het embryo vormen.

dynamische systemen:

Vergelijkingen die evolueren in de tijd.

de tijd in beeld te brengen. In het andere scenario communiceren cellen niet, en zijn alleen momentopnamen beschikbaar. In dit model kunnen dan bijvoorbeeld scRNA-seq-metingen worden gedaan. Deze analyse biedt een uitgangspunt voor het verwerven van mechanistische inzichten in de ontwikkeling van een embryonale cel door gebruik te maken van verschillende datasets.

Ik hoop dat deze samenvatting u een glimp heeft laten zien van de zeer complexe reis van een embryonale cel. We hebben laten zien hoe we de celidentiteit kunnen bepalen op basis van scRNA-seq gegevens, en we hebben de invloed van master TF's nader bekeken. Vervolgens hebben we cellulaire communicatie aan de experimenten toegevoegd en ontdekt dat deze een cruciale invloed heeft op het ontwikkelingstraject van een cel. Ten slotte hebben we al deze informatie gecombineerd in een wiskundig model dat ons in staat stelt de mechanismen te begrijpen die betrokken zijn bij de beslissingen van de cel. Er valt echter nog veel te onderzoeken voordat we volledig begrijpen hoe een cel zijn beslissingen neemt.

Moge de embryonale cel altijd de juiste keuze maken!