



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Confronting ALS: understanding multicellular contribution to neurodegeneration : computational analysis and hiPSCs in vitro modelling as a multidisciplinary approach

Limone, F.

Citation

Limone, F. (2023, September 26). *Confronting ALS: understanding multicellular contribution to neurodegeneration : computational analysis and hiPSCs in vitro modelling as a multidisciplinary approach*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3642489>

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/1887/3642489>

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

Nederlandse Samenvatting

De confrontatie aangaan met ALS: meercellige bijdrage aan neurodegeneratie begrijpen

Computationele analyse en hiPSC's in vitro modellering als een multidisciplinaire aanpak

Amyotrofische laterale sclerose (ALS) is een dodelijke neurodegeneratieve aandoening die wordt gekenmerkt door een progressief verlies van motorische functies. Hoewel het bekend staat om de gelijknamige sclerose van het ruggenmerg die te zien is bij een autopsie, is ALS het resultaat van de degeneratie van extratelencefale cortico-spinale motorneuron (CSMN), en het daaraan gelinkte geleidelijk verlies van cortico-spinale banen en de degeneratie van motorneuronen van het ruggenmerg, wat resulteert in controle verlies over spieren en ademhalingsfalen. Het blijft onduidelijk waarom specifieke soorten motorneuronen selectief door de ziekte worden aangetast. Hoewel genetische studies van familiale ALS ons begrip van deze aandoening enorm hebben vergroot, is de overgrote meerderheid van de ALS-gevallen sporadisch (90%), zonder familiegeschiedenis en meestal zonder bekende genetische oorzaak. Het is nog onbekend of familiale mutaties en sporadische mutaties leiden tot vergelijkbare moleculaire veranderingen en hoe verschillende cellulaire subtypes kunnen bijdragen aan deze veranderingen, wordt nog nader onderzocht. De beperkte beschikbaarheid van hersenweefsel en de onduidelijkheid over de veranderingen in specifieke celtypen vormen twee belangrijke hindernissen: ten eerste dienen de moleculaire processen die bij patiënten worden verstoord te worden begrepen op cellulair niveau per celtype; ten tweede, is er een noodzaak om verschillende systemen te bouwen om deze mechanismen in vitro te modelleren.

Dit proefschrift probeert aspecten van deze vragen te beantwoorden door te beginnen met een poging om de unieke moleculaire eigenschappen te begrijpen die motorneuronen gevoelig maken voor ALS. Met dit doel voerden we RNA-sequencing uit van 79.169 losse kernen van cortices van patiënten en controles van vergelijkbare leeftijd. Bij gezonde personen ontdekten we dat de expressie van ALS-risicogenen significant verrijkt was in THY1+ laag-5, extratelencefale (L5-ET) neuron en niet in andere celtypen. Bij patiënten werden deze genetische risicofactoren, evenals genen die betrokken zijn bij eiwithomeostase en stressreacties, significant geïnduceerd in THY1+ L5-ET en een bredere verzameling extratelencefale neuron. Onderzoek van oligodendrogliale en microgliale kernen legde patiëntspecifieke genexpressieveranderingen bloot die op zijn minst gedeeltelijk een reactie waren op ziektegerelateerde veranderingen in neuron. Onze bevindingen suggereren dat de selectieve kwetsbaarheid van extratelencefale neuron gedeeltelijk verband houdt met

de intrinsieke moleculaire eigenschappen die hen gevoeliger maken voor genetische en veranderingen die worden veroorzaakt door ALS-pathologie.

In een poging om nieuwe modellen te creëren om deze mechanismen te bestuderen, bespreken we vervolgens de generatie van een nieuw protocol om motorneuronen te genereren uit menselijke pluripotente stamcellen (hPSC's). In deze studie hebben we de overexpressie van de neuraliserende transcriptiefactor Neurogenin2 (*Ngn2*) gecombineerd met kleine moleculen om hPSC's te veranderen in geïnduceerde onderste motorneuronen (liMoNes/liMN's). Met behulp van een *Hb9::GFP*-cellijn toonden we aan dat deze aanpak activatie van de spinale motorneuron (MN)-specifieke transcriptiefactor *Hb9/MNX1* induceerde, waarbij tot 95% van de cellen *Hb9::GFP* positief werd. Deze cellen verkregen en behielden expressie van bekende vroege en late MN-markers. liMN's waren vergelijkbaar met hPSC-afgeleide MN die met een conventionele methode gegenereerd waren, vertoonden spontane elektrische activiteit, brachten synaptische markers tot expressie en vormden *in vitro* contacten met spiercellen. Samengevoegde, multiplex RNA-sequencing van losse cellen uit 50 cellijnen toonde aan dat populaties van verschillende MN-subtypen reproduceerbaar gegenereerd werden. Namelijk populaties van cervicale, brachiale en spierweefsel-innerverende MN's die lijken op hun *in vivo* tegenhangers in het menselijke embryonale ruggenmerg. We concluderen dat de combinatie van kleine moleculen met overexpressie van *Ngn2* zorgt voor een hoge opbrengst, en een robuuste en reproduceerbare productie van meerdere ziekterelevante MN-subtypen. Dit is van fundamenteel belang voor het vergroten van onze kennis van motorneuronbiologie en de verstoring ervan bij ziekte.

Ten slotte hebben we een verzameling van protocollen samengesteld om hPSC's te differentiëren in verschillende hersenceltypen die kunnen worden gebruikt om de bijdrage van meerdere celtypen aan neurodegeneratie verder te onderzoeken. In dit geval richten we ons vooral op studies die de werkzaamheid van transplantatie van deze cellulaire producten hebben getest in een poging om cellen die verloren zijn gegaan door degeneratie te vervangen, maar we bieden ook een gedetailleerde en waardevolle bron van informatie om de biologie van het centrale zenuwstelsel *in vitro* te modelleren en om onderliggende mechanismen van ALS in verschillende celtypes te onderzoeken.

Het doel van dit proefschrift is om op celniveau inzicht te krijgen in de moleculaire mechanismen die verstoord zijn in de ziekte, om opties aan te bieden om deze verstoringen in menselijke modellen te bestuderen, en om te bediscussiëren hoe toekomstige experimenten met een multidisciplinaire aanpak onze kennis over de ziekte kunnen vergroten om uiteindelijk nieuwe therapieën voor behandeling of herstel te vinden.