



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).

Riassunto in italiano

Affrontare la SLA: comprendere il contributo multicellulare alla neurodegenerazione

Analisi computazionali e modelli di hiPSC in vitro come approccio multidisciplinare

La sclerosi laterale amiotrofica (SLA) è una malattia neurodegenerativa fatale caratterizzata da una progressiva perdita della funzione motoria. Sebbene sia nota per l'omonima sclerosi del midollo spinale osservata in autopsia, la SLA è il risultato della degenerazione dei motoneuroni cortico-spinali extratelencefalici (CSMNs), collegata alla graduale perdita dei sistemi cortico-spinali e alla conseguente degenerazione dei motoneuroni del midollo spinale che sfocia nella perdita del controllo muscolare e nell'insufficienza respiratoria. Non è chiaro perché alcune classi di motoneuroni siano più selettivamente colpite da questa malattia. Sebbene gli studi genetici sulla SLA familiare abbiano notevolmente aumentato la nostra comprensione di questa malattia, la stragrande maggioranza dei casi di SLA è sporadica (90%), si verifica cioè senza una storia familiare e molto spesso senza una causa genetica nota. In effetti, non è ancora noto se le mutazioni familiari e l'insorgenza sporadica possano convergere su meccanismi molecolari simili e la maniera in cui i diversi sottotipi cellulari contribuiscano a questi cambiamenti rimane oggetto di indagine. L'inaccessibilità fondamentale del tessuto cerebrale e l'incertezza che circonda i disordini innescati dalla malattia in specifici tipi di cellule pone due ostacoli principali: in primo luogo, la necessità di una migliore comprensione di quali processi molecolari vengono interrotti nei pazienti a una risoluzione sul singolo tipo cellulare; in secondo luogo, la necessità di costruire diversi modelli per studiare questi meccanismi *in vitro*.

Questo corpus di lavoro cerca di rispondere ad aspetti di queste domande iniziando con uno sforzo per comprendere le proprietà uniche molecolari che sensibilizzano i motoneuroni alla SLA. Per fare ciò, abbiamo eseguito il sequenziamento dell'RNA di 79.169 singoli nuclei estratti da cortecce di pazienti e controlli di stessa età. In individui non affetti, l'espressione di geni connessi al rischio di SLA era significativamente arricchita nei neuroni extratelencefalici THY1⁺ dello strato 5 (L5-ET) e non in altri tipi di cellule. Nei pazienti, questi fattori di rischio genetici, così come geni coinvolti nell'omeostasi proteica e nelle risposte allo stress, sono indotti in modo significativo in THY1⁺ L5-ET e in un più ampio gruppo di neuroni extratelencefalici. L'esame dei nuclei derivanti da oligodendroglia e microglia ha rivelato cambiamenti di espressione genica specifici di pazienti che sono, almeno in parte, una risposta alle alterazioni associate a cambiamenti connessi alla malattia nei neuroni. I nostri risultati suggeriscono che la vulnerabilità selettiva dei neuroni extratelencefalici è in parte

collegata alle loro proprietà molecolari intrinseche che li sensibilizzano alle alterazioni genetiche prodotte dalla patologia della SLA.

Questa tesi prosegue con un compendio di protocolli per differenziare le hPSC in diversi tipi di cellule cerebrali che potrebbero essere utilizzate per spiegare ulteriori contributi multicellulari alla neurodegenerazione. In questo caso, ci concentriamo principalmente su studi che hanno testato l'efficacia del trapianto di questi prodotti cellulari nel tentativo di ripopolare le cellule perse a causa della degenerazione, ma forniamo anche una risorsa dettagliata e preziosa per i ricercatori da cui attingere per modellare la biologia del sistema nervoso centrale sistema *in vitro* e sezionare i meccanismi interrotti dalla SLA in diversi tipi di cellule.

Nel tentativo di creare nuovi paradigmi per studiare questi meccanismi, discuteremo quindi un nuovo protocollo per differenziare motoneuroni spinali dalle cellule staminali pluripotenti umane (hPSC). In questo studio, abbiamo affiancato la sovraespressione del fattore di trascrizione neuralizzante Neurogenina-2 (Neurogenin2, *Ngn2*) con il patterning di morfogeni per differenziare le hPSC in motoneuroni somatici indotti (liMoNes/liMNs). Utilizzando una linea reporter *Hb9::GFP*, abbiamo dimostrato che questo approccio induce l'attivazione del fattore di trascrizione specifico del motoneurone spinale (MN) *Hb9/MNX1*, con fino al 95% delle cellule che diventano *Hb9::GFP+*. Queste cellule acquisiscono e mantengono l'espressione di marcatori canonici di motoneuroni precoci e maturi. I liMN somigliano a MN derivati da hPSC differenziati dai protocolli convenzionali che usano solo morfogeni, mostrano attività elettrica spontanea, esprimono marcatori sinaptici e formano contatti con cellule muscolari *in vitro*. Il sequenziamento multiplo di RNA a singola cellula in pool su 50 linee cellulari ha rivelato popolazioni riproducibili di più sottotipi MN anatomicamente distinti a livelli cervicali e brachiali, che innervano gli arti e che in parte assomigliano alla loro controparte nel midollo spinale embrionale umano *in vivo*. Concludiamo che la combinazione di morfogeni e la sovraespressione di *Ngn2* facilita la produzione robusta, riproducibile ed ad alto rendimento di più sottotipi di MN rilevanti per lo studio di malattie, che è fondamentale per promuovere la nostra conoscenza della biologia dei motoneuroni e la sua alterazioni in neurodegenerazione.

Questo lavoro mira a far luce su quali meccanismi molecolari sono interrotti nella malattia alla risoluzione di una singola cellula, offrire opzioni sugli strumenti per studiare queste interruzioni in modelli umani e discutere ulteriormente come futuri esperimenti che utilizzano approcci multidisciplinari potrebbero espandere le nostre conoscenze sulla malattia in uno sforzo verso la scoperta di nuove terapie e possibilmente una cura.