

Neuroepigenomics in Alzheimer's disease

Citation for published version (APA):

Riemens, R. J. M. (2021). *Neuroepigenomics in Alzheimer's disease: the single cell ADds*. Ipskamp. <https://doi.org/10.26481/dis.20211105rr>

Document status and date:

Published: 01/01/2021

DOI:

[10.26481/dis.20211105rr](https://doi.org/10.26481/dis.20211105rr)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Chapter 10

Summary

Chapter 1 introduced the reader to the field of neuroepigenomics in sporadic Alzheimer's disease (sAD), as well as to the use of induced pluripotent stem cell (iPSC)-based models for studying this neurodegenerative disorder. After this brief introduction, an overview of the general structure of the thesis was presented, which could be divided into two main parts focused on each of the aforementioned research lines was presented. In more detail, the studies presented in the first part of this thesis were centered on the role of epigenetic dysregulation in the etiopathophysiology of sAD. This first part, which includes **Chapters 2-5**, consisted of one perspective paper, two methodological research papers and one original research article. The work in the second part of this thesis, focused on the application and establishment of iPSC-based models for sAD, *e.g.* in view of mechanistic studies into epigenetic dysregulation. The second part, consisting of **Chapters 6-8**, presented two in-depth review articles and one exploratory pilot study.

In **Chapter 2**, a perspective paper on epigenome-wide association studies (EWAS), or more specifically methylome-wide association studies (MWAS), in sAD, was presented. Epigenetic mechanisms, which mediate the interaction between the genome and the environment, are thought to provide a mechanistic explanation in view of the etiopathogenesis of sAD. In this paper, all studies that have been performed to date targeting various (cortical) regions of the brain, as well as peripheral blood samples, derived from patients and matched non-demented controls, were briefly reviewed. Furthermore, relevant caveats in relation to these studies that challenge the interpretation of the experimental outcomes, including genomic coverage, statistical power, specificity of the epigenetic marks assessed, cell-type specificity and composition, causal inference and multi-omics, were discussed. Finally, an outlook on possible solutions that might overcome these challenges, including methodological developments and advances in related data science disciplines, was provided. Overall, what was concluded from this chapter is that although MWAS are highly relevant in the context of sAD research, it remains vital to address the aforementioned caveats in future studies in order to produce more meaningful data, which could significantly increase our understanding about the processes underlying the disease.

In view of these challenges, **Chapter 3** described a standardized protocol for oxidative bisulfite pyrosequencing that allows for an accurate discrimination between DNA methylation and hydroxymethylation, *i.e.* between 5-methylcytosine (5-mC) and 5-hydroxymethylcytosine (5-hmC) bases, in the context of cytosine-phosphate-guanine (CpG) sites. The pyrosequencing protocol described in this chapter provides a workable solution for the issue of modification-specificity as faced in neuroepigenomic studies of sAD. The approach relies on a highly selective

chemical oxidation using KRuO_4 that is applied prior to the bisulfite treatment, polymerase chain reaction (PCR) and pyrosequencing steps. Moreover, a novel spike-in DNA standard set that allows the user to accurately determine the oxidative bisulfite conversion efficiency was developed for specifically this approach. As a proof-of-principle, the protocol was conducted on both post-mortem brain tissue and cultured iPSCs, demonstrating that 5-mC and 5-hmC, as well as unmodified cytosine (5-uC) bases, could be detected in *OXT* and *DNAJB13*. Furthermore, it was confirmed that the novel (5-hmC) spike-in control could be used as an internal pyrosequencing control that does not interfere with the analysis of the accompanying sample, and *vice versa*. Such innovative approaches as presented in this chapter are crucial for moving the field of neuroepigenomics in sAD forward, as they aid in increasing the validity of the data.

Chapter 4 introduced a novel approach for DNA methylation profiling in small pools of 50 neurons, which relied on a combination of limiting dilution bisulfite pyrosequencing (LDBSP) and laser capture microdissection (LCM). This method allows one to determine CpG site methylation rates on single alleles in a multi-targeted and cell type-specific manner, hence providing a solution to the issue of cellular heterogeneity that is encountered in neuroepigenomic studies of sAD. The general working procedure of LDBSP on cells isolated from post-mortem brain tissue using LCM was described in this chapter. Furthermore, as proof-of-principle, a targeted methylation analysis of *DNAJB13*, *PGLYRP1*, *RHBDF2*, *C3*, *LMX1B* and *OXT* was performed. Interestingly, LDBSP on these pools of neurons often rendered downstream reactions with more than one DNA molecule, a scenario that rarely occurs when conducting LDBSP on a one-cell-sample or just a few cells. As such, an adapted data analysis pipeline for LDBSP was developed, allowing one to include and correct CpG methylation rates derived from multi-allele reactions. Overall, the method described in this chapter provides the user with a more accurate estimation of the DNA methylation status of each target gene in the analyzed cell pools, thereby adding further validity to the data. In addition, it was demonstrated that the efficiency of LDBSP on neurons isolated with LCM is similar to the efficiency achieved in previously published studies using this technique on other isolated cell types. It is anticipated that single cell(type) approaches as described in this chapter will be increasingly valuable for future neuroepigenomic studies in sAD.

Chapter 5 represented the first large-scale epigenetic analysis in the brainstem of sAD to date, targeting the dorsal raphe nuclei (DRN) and locus coeruleus (LC), thereby complementing the body of EWAS reviewed in **Chapter 2**. Differentially modified positions and regions in bulk tissues obtained from both brainstem nuclei were identified at the level of DNA methylation, hydroxymethylation and

unmodified cytosines by using the Illumina Infinium MethylationEPIC BeadChip array in combination with an oxidative bisulfite treatment of the isolated target DNA (similar to what was described in **Chapter 3**). Aside from a strong overlapping dysregulation in the Tenascin XB gene (*TNXB*) in both the DRN and LC, common and novel epigenetic signatures compared to previous studies targeting the sAD brain were discovered, all of which may play a pivotal role in the etiopathogenesis of sAD. A subsequent bisulfite pyrosequencing analysis in the same patient cohort confirmed the observed dysregulation of *TNXB* in both of the brainstem regions assessed. As a follow up on these discovery findings, a targeted analysis of *TNXB* was performed in an independent patient cohort, assessing methylomic signatures in single serotonergic neurons and non-serotonergic cells isolated from the DRN by means of LCM. This study therefore represented the first cell subtype-specific validation analysis performed in the brainstem to date, relying on the LCM-LDBSP approach that was described in **Chapter 4**. Strikingly, when comparing the bisulfite methylation levels of *TNXB* between sAD patients and controls in serotonergic and non-serotonergic neurons, a significant interaction between cell-type and experimental condition was identified. The sAD-associated methylation profiles were opposite in the serotonergic neurons and non-serotonergic cells, the latter of which resembled the EWAS data. As such, this study demonstrated for the first time that epigenetic signatures within the DRN can strongly depend on both the disease phenotype and the cell type analyzed. These findings therefore emphasize the importance of future cell type-specific neuroepigenomic studies in sAD, which was already briefly addressed in **Chapters 2 and 4**.

Chapter 6 presented a review paper on the potential value of iPSCs for sAD research. Since their discovery, these cells have been offering a promising avenue to fill the translational gap between pre-clinical and clinical sAD research, by allowing the establishment of patient-specific *in vitro* disease models that can be applied for fundamental research and drug discovery. It is anticipated that efforts in this field will deepen our knowledge on various underlying disease mechanisms and aid in the establishment of therapeutic interventions. All pioneering studies utilizing iPSCs from sAD patients were reviewed in this chapter, demonstrating that the iPSC-derived neural cells recapitulate neuropathological processes of the disease, although with quite a high degree of variability in terms of their presence and severity. Therefore, sources of variability related to the model in addition to those that might be explained by the heterogeneous nature of sAD were critically assessed. What followed from this chapter is that developing iPSC models for sAD remains a challenging endeavor due to the multifactorial nature of the disease, the nearly life-long disease progression and the high degree of inter-individual heterogeneity that might be reflected in cells obtained from patients. Aside from the variability associated with the disease, several methodological factors, such

as those related to iPSC generation and (neural) differentiation, further impact on this degree of variation. Thus, future efforts aimed at extensively characterizing the iPSC-derived models and sources of variability in fine detail, are necessary if one wishes to establish robust disease models for the study of sAD. Nonetheless, whilst taking into account these considerations, the developing iPSC models clearly provide an exciting avenue in sAD research.

Within the framework of developing iPSC-based models, **Chapter 7** presented an in-depth review article on directed- and direct neural differentiation protocols starting from stem cells and somatic cells, respectively. As addressed in this review, insights from basic research and developmental biology have guided the design of current protocols and numerous approaches for the derivation of regional-specific glutamatergic, dopaminergic, GABAergic, serotonergic, and cholinergic/motor neurons have become available. Approaches for the derivation of each of these disease-relevant neural subtypes were summarized, relying on either chemically defined systems using patterning factors, transcription factor-mediated reprogramming and epigenetic-based strategies. This review furthermore highlighted that although distinct approaches have shown to be successful in directing neuronal cell fate *in vitro*, their refinement and optimization, as well as the search for alternative strategies, remains necessary to help realize the full potential of the eventually derived neuronal populations. Furthermore, existing protocols are still limited in the number of neuronal subtypes whose induction is fully established, and different cultivation protocols for each subtype exist. As such, future detailed characterization of the cellular and molecular characteristics involved in guiding stem cell differentiation and somatic cell reprogramming along the neural lineage is expected to contribute to the development of highly robust protocols. Evidently, these efforts could aid in the development of highly meaningful *in vitro* disease models for disorders such as sAD.

Finally, **Chapter 8** comprised an exploratory pilot study, in which the knowledge of **Chapters 6** and **7** was combined in an effort to establish and characterize a cortical forebrain differentiation protocol from iPSCs. The overarching aim of this chapter was to use this differentiation protocol for the establishment of an *in vitro* model relevant for sAD. First, the stemness of the iPSC-line, which was used for neural differentiation, was confirmed based on the expression of pluripotency markers such as OCT4, NANOG, SSEA3, SSEA4, TRA-1-60 and TRA-1-81. Next, by the sequential application of neural patterning factors, iPSCs were differentiated to neural progenitor cells (NPCs) and subsequently to cortical neurons and glia. At each stage of the differentiation process, the expression of key-lineage transcription factors was assessed, which confirmed that the cells progressed towards a cortical forebrain fate. Successful derivation of NPCs was confirmed by the expression of

NESTIN, SOX2 and PAX6. Quantification of these markers furthermore revealed that the iPSCs differentiated towards relative homogeneous population of NPCs (>82%). Immunofluorescent examination following differentiation of the NPCs verified the presence of the neuronal markers such as MAP2AB, DCX and TUJ1, and the astrocytic marker GFAP. Additionally, the presence of cortical forebrain markers, including CTIP2 and FOXG1, were identified in the differentiated cultures. Overall, these preliminary findings confirmed that the protocol described in this chapter was successful in differentiating the iPSCs into a mixed population of cortical forebrain neurons and glia. Although further functional characterization of these neural cells remains necessary, it was postulated that the protocol applied in this chapter can be used for the establishment of a cortical *in vitro* disease model system for sAD. In order to further explore this potential, expression of TNXB and the oxytocin receptor (OXTR) in the iPSC-derived cortical cultures was assessed. As previously demonstrated in **Chapter 4** of this thesis, epigenetic and genetic dysregulation of *TNXB* have been associated with AD pathophysiology in multiple regions of the sAD brain. In addition, epigenetic deregulation of the oxytocin gene (*OXT*) and alterations in *OXT* signaling have previously also been implicated in sAD or associated disease phenotypes. Interestingly, expression of both TNXB and OXTR could be detected in the differentiated neural cells already at 14 days and maintained up until 56 days of NPC-differentiation, suggesting that these cortical forebrain cells might represent an appealing model system to study mechanistic processes related to *TNXB* and *OXT* signaling in the context of sAD. All in all, efforts as attained in this chapter are imperative if one wishes to establish disease-relevant iPSC-based models.

Chapter 11

Samenvatting

Hoofdstuk 1 introduceerde de lezer op het gebied van neuroepigenetica in relatie tot de sporadische ziekte van Alzheimer (sAD), evenals op het gebruik van geïnduceerde pluripotente stamcel (iPSC)-gebaseerde modellen voor het bestuderen van deze neurodegeneratieve aandoening. Na deze korte inleiding werd een overzicht gepresenteerd van de algemene structuur van het proefschrift, dat zou kunnen worden onderverdeeld in twee hoofddelen gericht op elk van de bovengenoemde onderzoekslijnen. In meer detail, de studies gepresenteerd in het eerste deel van dit proefschrift zijn gericht op de rol van epigenetische ontregelingen in de etiopathofysiologie van sAD. Dit eerste deel, dat de **Hoofdstukken 2-5** omvat, bestond uit een perspectief artikel, twee methodologische onderzoekartikelen en een origineel onderzoekartikel. Het werk in het tweede deel van dit proefschrift was gericht op de toepassing en totstandkoming van iPSC-gebaseerde modellen voor sAD, bijvoorbeeld met het oog op mechanistische studies naar epigenetische ontregeling. Het tweede deel, bestaande uit de **Hoofdstukken 6-8**, bevatte twee diepgaande overzichtsartikelen en een verkennende pilotstudie.

In **Hoofdstuk 2**, wordt een perspectief artikel over epigenoom-brede associatiestudies (EWAS), of meer specifiek methylome-brede associatiestudies (MWAS), in sAD gepresenteerd. Epigenetische mechanismen, die de interactie tussen het genoom en de omgeving mediëren, worden verondersteld een mechanistische verklaring te bieden met het oog op de etiopathogenese van sAD. In dit artikel werden alle onderzoeken die tot nu toe zijn uitgevoerd, gericht op verschillende (corticale) hersengebieden, evenals perifere bloedmonsters, afkomstig van patiënten en overeenkomende niet-demente controlepersonen, kort besproken. Verder werden relevante kanttekeningen met betrekking tot deze onderzoeken die de interpretatie van de onderzoeksresultaten beïnvloeden besproken, waaronder genomische dekking, statistische bewijskracht, specificiteit van de geëvalueerde epigenetische kenmerken, celtypespecificiteit en samenstelling, causale inferentie en multi-omica. Ten slotte werd een vooruitblik gegeven op mogelijke oplossingen om deze uitdagingen het hoofd te bieden, bestaande uit methodologische ontwikkelingen en vorderingen in gerelateerde datawetenschap-disciplines. In het algemeen werd uit dit hoofdstuk geconcludeerd dat, hoewel MWAS zeer relevant zijn in de context van sAD-onderzoek, het essentieel blijft om de bovengenoemde kanttekeningen in toekomstige studies aan te pakken om meer zinvolle gegevens te produceren, die het begrip van de processen die ten grondslag liggen aan de ziekte aanzienlijk zouden kunnen vergroten.

In relatie tot bovengenoemde uitdagingen, beschreef **Hoofdstuk 3** een gestandaardiseerd protocol voor oxidatieve bisulfiet pyrosequentie bepaling waarmee een nauwkeurig onderscheid kan worden gemaakt tussen DNA-methylatie en hydroxymethylatie, dat wil zeggen tussen 5-methylcytosine (5-

mC) en 5-hydroxymethylcytosine (5-hmC) basen, in de context van cytosine-fosfaat-guanine (CpG) posities. Het pyrosequentie bepaling protocol dat in dit hoofdstuk wordt beschreven, biedt een werkbare oplossing voor het probleem van modificatiespecificiteit waarmee neuroepigenetische onderzoeken naar sAD worden geconfronteerd. De aanpak is gebaseerd op een zeer selectieve chemische oxidatie met behulp van KRuO₄ die wordt toegepast voorafgaand aan de bisulfiet behandeling, polymerasekettingreactie (PCR) en pyrosequentie bepaling stappen. Bovendien werd specifiek voor deze methode een nieuwe spike-in DNA-standaard set ontwikkeld waarmee de gebruiker nauwkeurig de oxidatieve bisulfiet conversie-efficiëntie kan bepalen. Om het principe aan te tonen werd het protocol uitgevoerd op zowel post-mortem hersenweefsel als iPSCs, waarmee werd aangetoond dat 5-mC en 5-hmC, evenals niet gemodificeerde cytosine (5-uC) basen, kunnen worden gedetecteerd in *OXT* en *DNAJB13*. Bovendien werd bevestigd dat de nieuwe (5-hmC) spike-in controle zou kunnen worden gebruikt als een interne pyrosequentie bepaling-controle die de analyse van het doelmonster niet verstoort, en andersom. Dergelijke innovatieve benaderingen zoals gepresenteerd in dit hoofdstuk zijn cruciaal om het veld van neuroepigenetica in sAD vooruit te helpen, omdat deze de validiteit van de onderzoeksresultaten vergroten.

Hoofdstuk 4 introduceerde een nieuwe methode voor DNA-methylatie profilering in kleine clusters van 50 neuronen, die gebaseerd was op een combinatie van limiting dilution bisulfite pyrosequencing (LDBSP) en laser capture microdissectie (LCM). Met deze methode kan men de methylatie graad van CpG posities op afzonderlijke allelen en op een meervoudig-gerichte en celtype-specifieke manier bepalen, waardoor er een oplossing wordt geboden voor het probleem van cellulaire heterogeniteit dat wordt aangetroffen in neuroepigenetisch onderzoek naar sAD. De algemene werkwijze van LDBSP op cellen geïsoleerd uit post-mortem hersenweefsel met behulp van LCM werd in dit hoofdstuk beschreven. Bovendien werd om het principe aan te tonen een gerichte methylatie analyse van *DNAJB13*, *PGLYRP1*, *RHBDF2*, *C3*, *LMX1B* en *OXT* uitgevoerd. Interessant is dat LDBSP op deze clusters van neuronen vaak afgeleide reacties vertoonde met meer dan één DNA-molecuul, een scenario dat zelden voorkomt bij het uitvoeren van LDBSP op een eencellig monster of slechts een paar cellen. Als zodanig werd een aangepaste methode voor de analyse van de onderzoeksresultaten voor LDBSP ontwikkeld, die het mogelijk maakt om de methylatie graad van CpG posities die zijn verkregen van multi-allelreacties op te nemen en te corrigeren. Over het algemeen biedt de methode die in dit hoofdstuk wordt beschreven de gebruiker een nauwkeurigere schatting van de DNA-methylatie status van elk doel gen in de geanalyseerde cel clusters, waardoor de validiteit van de onderzoeksresultaten toenemen. Bovendien werd aangetoond dat de efficiëntie van LDBSP op neuronen geïsoleerd met LCM vergelijkbaar is met de efficiëntie

die werd bereikt in eerder gepubliceerde onderzoeken met deze techniek op andere geïsoleerde celtypen. Verwacht wordt dat analyses van een individuele cel(type), zoals beschreven in dit hoofdstuk, steeds waardevoller zullen worden voor toekomstige neuroepigenetische studies naar sAD.

Hoofdstuk 5 vertegenwoordigde de eerste grootschalige epigenetische analyse in de hersenstam van sAD tot nu toe, gericht op de dorsale raphe nuclei (DRN) en locus coeruleus (LC), en vormt daarmee een aanvulling op het geheel van EWAS besproken in **Hoofdstuk 2**. Differentiaal gemodificeerde posities en regio's in bulkweefsels verkregen uit beide hersenstamkernen werden geïdentificeerd op het niveau van DNA-methylatie, hydroxymethylatie en niet gemodificeerde cytosines door gebruik te maken van de Illumina Infinium MethylationEPIC BeadChip-array in combinatie met een oxidatieve bisulfiet behandeling van het geïsoleerde doel-DNA (vergelijkbaar met wat werd beschreven in **Hoofdstuk 3**). Naast een sterke overlappende ontregeling in het Tenascin XB gen (*TNXB*) in zowel de DRN als de LC, werden gemeenschappelijke en nieuwe epigenetische patronen ontdekt in vergelijking met eerdere onderzoeken gericht op de sAD-hersenen, die allemaal een cruciale rol kunnen spelen in de etiopathogenese van sAD. Een daaropvolgende analyse gebruikmakend van een bisulfiet pyrosequentie bepaling in hetzelfde patiënten cohort bevestigde de waargenomen ontregeling van *TNXB* in beide onderzochte hersenstamgebieden. Als vervolg op deze bevindingen werd een gerichte analyse van *TNXB* uitgevoerd in een onafhankelijk patiënten cohort, waarbij methylatie patronen werden onderzocht in enkele serotonerge neuronen en niet-serotonerge cellen geïsoleerd uit de DRN door middel van LCM. Deze studie vertegenwoordigde daarom de eerste cel subtype-specifieke validatie analyse die tot nu toe in de hersenstam is uitgevoerd, gebaseerd op de LCM-LDBSP-methode die werd beschreven in **Hoofdstuk 4**. Opvallend is dat bij het vergelijken van de bisulfiet methylatie niveaus in *TNXB* tussen sAD-patiënten en controles in serotonerge en niet-serotonerge neuronen, een significante interactie tussen celtype en experimentele conditie werd geïdentificeerd. De sAD-geassocieerde methylatieprofielen waren tegengesteld in de serotonerge neuronen en niet-serotonerge cellen, waarvan de laatste vergelijkbaar waren met de EWAS-onderzoeksresultaten. Als zodanig toonde deze studie voor het eerst aan dat epigenetische patronen binnen de DRN sterk kunnen afhangen van zowel het ziektebeeld als het geanalyseerde celtype. Deze bevindingen benadrukken daarom het belang van toekomstige celtype-specifieke neuroepigenetische studies naar sAD, wat al kort aan de orde kwam in de **Hoofdstukken 2 en 4**.

Hoofdstuk 6 presenteerde een overzichtsartikel over de potentiële waarde van iPSCs voor sAD-onderzoek. Sinds hun ontdekking bieden deze cellen een veelbelovende manier om de translationele kloof tussen preklinisch en klinisch

sAD-onderzoek te dichtten, door het opzetten van patiënt-specifieke *in vitro* ziektemodellen die kunnen worden toegepast voor fundamenteel onderzoek en ontdekking van geneesmiddelen. Verwacht wordt dat inspanningen op dit gebied onze kennis over verschillende onderliggende ziektemechanismen zullen verdiepen en zullen helpen bij het opzetten van therapeutische interventies. Alle baanbrekende onderzoeken met iPSCs van sAD-patiënten werden in dit hoofdstuk besproken, welke hebben aangetoond dat de iPSC-afgeleide neurale cellen de neuropathologische processen van de ziekte recapituleren, hoewel met een vrij hoge mate van variabiliteit in termen van hun aanwezigheid en ernst. Derhalve werden bronnen van variabiliteit gerelateerd aan het model, naast degene die zouden kunnen worden verklaard door de heterogene aard van sAD, kritisch belicht. Voortvloeiend uit dit hoofdstuk, is dat het ontwikkelen van iPSC-modellen voor sAD een uitdagende inspanning blijft vanwege de multifactoriële aard van de ziekte, de bijna levenslange ziekteprogressie en de hoge mate van interindividuele heterogeniteit die kan worden weerspiegeld in cellen die zijn verkregen van patiënten. Afgezien van de variabiliteit die met de ziekte gepaard gaat, hebben verschillende methodologische factoren, zoals die gerelateerd aan iPSC-generatie en (neurale) differentiatie, een verdere invloed op deze mate van variatie. Toekomstige inspanningen gericht op het uitgebreid karakteriseren van de iPSC-afgeleide modellen en bronnen van variabiliteit in fijn detail, zijn dus noodzakelijk als men robuuste ziektemodellen wil opzetten voor de studie van sAD. Ondanks deze overwegingen bieden de zich ontwikkelende iPSC-modellen duidelijk een opwindende weg in sAD onderzoek.

In het kader van het ontwikkelen van iPSC-gebaseerde modellen, presenteerde **Hoofdstuk 7** een diepgaand overzichtsartikel over aangestuurde en directe neurale differentiatieprotocollen, uitgaande van respectievelijk stamcellen en somatische cellen. Zoals in dit overzicht wordt besproken, hebben inzichten uit fundamenteel onderzoek en ontwikkelingsbiologie het ontwerp van huidige protocollen geleid en zijn er talloze methoden beschikbaar voor de afleiding van regionaal-specifieke glutamaterge, dopaminerge, GABAergische, serotonerge en cholinerge/motor neurononen. Methoden voor de afleiding van elk van deze ziekte gerelateerde neurale subtypes werden samengevat, gebaseerd op ofwel chemisch gedefinieerde systemen met behulp van patroonfactoren, op transcriptiefactoren-gemedieerde herprogramming en op epigenetische-gebaseerde strategieën. Dit review benadrukte verder dat hoewel verschillende methoden succesvol zijn gebleken bij het aansturen van de lotsbestemming van neuronale cellen *in vitro*, hun verfijning en optimalisatie, evenals het zoeken naar alternatieve strategieën, noodzakelijk blijven om het volledige potentieel van de uiteindelijk afgeleide neuronale populaties te helpen realiseren. Bovendien zijn de bestaande protocollen nog steeds beperkt in het aantal neuronale subtypen waarvan de inductie volledig

is vastgesteld, en er bestaan verschillende kweekprotocollen voor elk subtype. Als zodanig wordt verwacht dat toekomstige gedetailleerde karakterisering van de cellulaire en moleculaire kenmerken die betrokken zijn bij het begeleiden van stamceldifferentiatie en somatische cel herprogramming langs de neurale lijn, zal bijdragen aan de ontwikkeling van zeer robuuste protocollen. Het is evident dat deze inspanningen kunnen helpen bij de ontwikkeling van zeer zinvolle *in vitro* ziektemodellen voor aandoeningen zoals sAD.

Ten slotte omvatte **Hoofdstuk 8** een verkennende pilotstudie, waarin de kennis van **Hoofdstuk 6** en **7** werd gecombineerd in een poging om een corticale voorhersendifferentiëprotocol vanuit iPSCs op te zetten en te karakteriseren. Het overkoepelende doel van dit hoofdstuk was om dit differentiëprotocol te gebruiken voor het opzetten van een *in vitro* model dat relevant is voor sAD. Ten eerste werd de stamcel karakteristieken van de iPSC-lijn, die werd gebruikt voor neurale differentiatie, bevestigd op basis van de expressie van pluripotente markers zoals OCT4, NANOG, SSEA3, SSEA4, TRA-1-60 en TRA-1-81. Vervolgens werden iPSCs door de opeenvolgende toepassing van neurale patroonfactoren gedifferentieerd naar neurale voorlopercellen (NPCs) en vervolgens naar corticale neuronen en glia. In elke fase van het differentiëproces werd de expressie van belangrijke afstamming transcriptiefactoren beoordeeld, wat bevestigde dat de cellen vorderde naar een corticale voorhersenen lotsbestemming. Succesvolle afleiding van NPCs werd bevestigd door de expressie van NESTIN, SOX2 en PAX6. Kwantificering van deze markers onthulde verder dat de iPSCs differentieerde naar een relatief homogene populatie van NPCs (> 82%). Immunofluorescentie bepaling na differentiatie van de NPCs bevestigde de aanwezigheid van de neuronale markers zoals MAP2AB, DCX en TUJ1, en de astrocytische marker GFAP. Bovendien werd de aanwezigheid van markers van de corticale voorhersenen, waaronder CTIP2 en FOXG1, geïdentificeerd in de gedifferentieerde culturen. Over het algemeen bevestigden deze voorlopige bevindingen dat het protocol dat in dit hoofdstuk wordt beschreven, succesvol was in het differentiëren van de iPSCs in een gemengde populatie van corticale frontale neuronen en glia. Hoewel verdere functionele karakterisering van deze neurale cellen noodzakelijk blijft, werd gepostuleerd dat het protocol dat in dit hoofdstuk wordt toegepast gebruikt kan worden voor het opzetten van een corticaal *in vitro* ziektemodelsysteem voor sAD. Om dit potentieel verder te onderzoeken, werd de expressie van TNXB en de oxytocinereceptor (OXTR) in de iPSC-afgeleide corticale culturen vastgesteld. Zoals eerder aangetoond in **Hoofdstuk 4** van dit proefschrift, zijn epigenetische en genetische ontregeling van TNXB geassocieerd met AD pathofysiologie in meerdere regio's van de sAD hersenen. Bovendien was epigenetische dysregulatie van het oxytocine-gen (*OXT*) en veranderingen in *OXT*-signalering eerder ook betrokken bij sAD of geassocieerde ziektefenotypes. Interessant is

dat expressie van zowel TNXB als OXTR al na 14 dagen in de gedifferentieerde neurale cellen kon worden gedetecteerd en werd gehandhaafd tot 56 dagen na NPC-differentiatie, wat suggereert dat deze corticale voorhersenencellen een aantrekkelijk modelsysteem zouden kunnen zijn om mechanistische processen gerelateerd aan TNXB en OXT-signalering te bestuderen in de context van sAD. Al met al zijn de inspanningen die in dit hoofdstuk werden verricht noodzakelijk als men ziektegerelateerde iPSC-gebaseerde modellen wil ontwikkelen.

Chapter 12

Zusammenfassung

Kapitel 1 führte den Leser in das Gebiet der Neuroepigenomik bei sporadischer Alzheimer-Krankheit (sAD) sowie in die Verwendung von auf induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC) basierenden Modellen zur Untersuchung dieser neurodegenerativen Störung ein. Nach dieser kurzen Einführung wurde ein Überblick über die allgemeine Struktur der Arbeit gegeben, der in zwei Hauptteile unterteilt werden konnte, die sich auf jede der oben genannten Forschungslinien konzentrierten. Ausführlicher, konzentrierten sich die im ersten Teil dieser Arbeit vorgestellten Studien auf die Rolle der epigenetischen Dysregulation in der Ätiopathophysiologie von sAD. Dieser erste Teil, der die **Kapitel 2 bis 5** enthält, bestand aus einem Perspektivpapier, zwei methodischen Forschungspapieren und einem Original-Forschungsartikel. Die Arbeit im zweiten Teil dieser Arbeit konzentrierte sich auf die Anwendung und Etablierung von iPSC-basierten Modellen für sAD, zum Beispiel im Hinblick auf mechanistische Studien zur epigenetischen Dysregulation. Der zweite Teil, bestehend aus den **Kapiteln 6-8**, enthielt zwei ausführliche Übersichtsartikel und eine explorative Pilotstudie.

In **Kapitel 2**, wurde ein Perspektivpapier zu epigenomweiten Assoziationsstudien (EWAS) oder genauer zu methylomweiten Assoziationsstudien (MWAS) in sAD vorgestellt. Es wird angenommen, dass epigenetische Mechanismen, die die Wechselwirkung zwischen Genom und Umwelt vermitteln, eine mechanistische Erklärung im Hinblick auf die Ätiopathogenese von sAD liefern. In diesem Artikel wurden alle bisher durchgeführten Studien, die auf verschiedene (kortikale) Regionen des Gehirns abzielten, sowie periphere Blutproben, die von Patienten stammen und mit nicht dementen Kontrollen übereinstimmen, kurz besprochen. Darüber hinaus wurden relevante Vorbehalte in Bezug auf diese Studien diskutiert, die die Interpretation der experimentellen Ergebnisse in Frage stellen, einschließlich der genomischen Abdeckung, der statistischen Aussagekraft, der Spezifität der bewerteten epigenetischen Markierungen, der Spezifität und Zusammensetzung des Zelltyps, der kausalen Inferenz und der Multi-Omics. Schließlich wurde ein Ausblick auf mögliche Lösungen gegeben, die diese Herausforderungen bewältigen könnten, einschließlich methodischer Entwicklungen und Fortschritte in verwandten datenwissenschaftlichen Disziplinen. Insgesamt wurde aus diesem Kapitel der Schluss gezogen, dass MWAS zwar im Kontext der sAD-Forschung von hoher Relevanz sind, es jedoch weiterhin wichtig ist, die oben genannten Vorbehalte in zukünftigen Studien zu berücksichtigen, um aussagekräftigere Daten zu erhalten, die unser Verständnis der Prozesse die der Krankheit zugrunde liegen erheblich verbessern könnten.

In Anbetracht dieser Herausforderungen wurde in **Kapitel 3** ein standardisiertes Protokoll für die oxidative Bisulfit Pyrosequenzierung beschrieben, das eine genaue Unterscheidung zwischen DNA-Methylierung und -Hydroxymethylierung ermöglicht,

das heißt zwischen 5-Methylcytosin (5-mC) und 5-Hydroxymethylcytosin (5-hmC)-Basen in der Kontext von Cytosin-Phosphat-Guanin (CpG)-Stellen. Das in diesem Kapitel beschriebene Pyrosequenzierungsprotokoll bietet eine praktikable Lösung für das Problem der Modifikationsspezifität, mit dem neuroepigenomische Studien von sAD konfrontiert sind. Der Ansatz beruht auf einer hochselektiven chemischen Oxidation unter Verwendung von KRuO_4 , die vor der Bisulfitbehandlung, der Polymerasekettenreaktion (PCR) und den Pyrosequenzierungsschritten angewendet wird. Darüber hinaus wurde für diese Methode ein neuartiger Spike-In-DNA-Standardatz entwickelt, mit dem der Benutzer die Effizienz der oxidativen Bisulfitumwandlung genau bestimmen kann. Als Beweis des Prinzips wurde das Protokoll sowohl an post mortem Hirngewebe als auch an iPSCs durchgeführt, was zeigte, dass 5-mC und 5-hmC sowie unmodifizierte Cytosin (5-uC)-Basen in *OXT* und *DNAJB13* nachgewiesen werden konnte. Darüber hinaus wurde bestätigt, dass die neuartige (5-hmC) Spike-In-Kontrolle als interne Pyrosequenzierungskontrolle verwendet werden kann, die die Analyse der Zielprobe nicht beeinträchtigt, und umgekehrt. Solche innovativen Ansätze, wie sie in diesem Kapitel vorgestellt werden, sind entscheidend, um das Gebiet der Neuroepigenomik in sAD voranzubringen, da sie dazu beitragen die Gültigkeit der Daten zu erhöhen.

In **Kapitel 4** wurde eine neuartigere Methode für die Erstellung von DNA-Methylierungsprofilen in kleinen Kolonien von 50 Neuronen vorgestellt, die auf einer Kombination aus Grenzverdünnungs-Bisulfit-Pyrosequenzierung (LDBSP) und Laser-Capture-Mikrodissektion (LCM) beruhte. Diese Methode ermöglicht es, die Methylierungsraten der CpG-Stelle auf einzelnen Allelen auf eine vielfach zielgerichtete und zelltypspezifische Weise zu bestimmen, wodurch eine Lösung für das Problem der zellulären Heterogenität bereitgestellt wird, die in neuroepigenomischen Studien von sAD auftritt. In diesem Kapitel wurde das allgemeine Arbeitsverfahren von LDBSP an Zellen beschrieben, die mit LCM aus post mortem Hirngewebe isoliert wurden. Darüber hinaus wurde als Beweis des Prinzips eine gezielte Methylierungsanalyse der *DNAJB13*, *PGLYRP1*, *RHBDF2*, *C3*, *LMX1B* und *OXT* durchgeführt. Interessanterweise führte LDBSP in diesen Neuronekolonien häufig zu nachgeschalteten Reaktionen mit mehr als einem DNA-Molekül, ein Szenario, das selten auftritt, wenn LDBSP an einer Einzelprobe oder nur wenigen Zellen durchgeführt wird. Als solches wurde eine angepasste Datenanalyse-Pipeline für LDBSP entwickelt, die es ermöglicht, CpG-Methylierungsraten, die aus Multi-Allel-Reaktionen abgeleitet wurden, einzuschließen und zu korrigieren. Insgesamt bietet die in diesem Kapitel beschriebene Methode dem Benutzer eine genauere Schätzung des DNA-Methylierungsstatus jedes Zielgens in den analysierten Zellpools, wodurch die Daten weiter validiert werden. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Effizienz

von LDBSP bei mit LCM isolierten Neuronen ähnlich der Effizienz ist, die in zuvor veröffentlichten Studien unter Verwendung dieser Technik bei anderen isolierten Zelltypen erzielt wurde. Es wird erwartet, dass Einzelzell(typ)ansätze, wie sie in diesem Kapitel beschrieben werden, für zukünftige neuroepigenomische Studien in sAD zunehmend wertvoll sein werden.

Kapitel 5 stellte die erste groß angelegte epigenetische Analyse im Hirnstamm von sAD dar, die auf die dorsalen Raphekerne (DRN) und den Locus coeruleus (LC) abzielte und damit die in **Kapitel 2** besprochenen EWAS-Literaturergänzungen. Aus beiden Hirnstammkernen erhaltene Massengewebe wurden Differential modifizierte Positionen und Regionen identifiziert auf der Ebene der DNA-Methylierung, -Hydroxymethylierung und unmodifizierten Cytosine unter Verwendung des Illumina Infinium MethylationEPIC BeadChip-Arrays in Kombination mit einer oxidativen Bisulfit-Behandlung der isolierten Ziel-DNA (ähnlich wie in **Kapitel 3** beschrieben). Abgesehen von einer stark überlappenden Dysregulation im Tenascin XB-Gen (*TNXB*), sowohl im DRN als auch im LC, wurden gemeinsame und neuartige epigenetische Signaturen im Vergleich zu früheren Studien zum sAD-Gehirn entdeckt, die alle eine entscheidende Rolle bei der Ätiopathogenese von sAD spielen können. Eine anschließende Bisulfit-Pyrosequenzierungsanalyse in derselben Patientenkohorte bestätigte die beobachtete Dysregulation von *TNXB* in beiden untersuchten Hirnstammregionen. Im Anschluss an diese Entdeckungsergebnisse wurde eine gezielte Analyse von *TNXB* in einer unabhängigen Patientenkohorte durchgeführt, wobei die methylomissen Signaturen in einzelnen serotonergen Neuronen und nicht serotonergen Zellen bewertet wurden, die mittels LCM aus dem DRN isoliert wurden. Diese Studie stellte daher die erste zellsubtypspezifische Validierungsanalyse dar, die bisher im Hirnstamm durchgeführt wurde und sich auf den in **Kapitel 4** beschriebenen LCM-LDBSP-Ansatz stützte. Bemerkenswerterweise beim Vergleich der Bisulfitmethylierungsniveaus von *TNXB* zwischen sAD-Patienten und Kontrollen bei Serotonergen und nicht serotonergen Neuronen wurde eine signifikante Wechselwirkung zwischen Zelltyp und experimentellem Zustand identifiziert. Die sAD-assoziierten Methylierungsprofile waren in den serotonergen Neuronen und nicht serotonergen Zellen entgegengesetzt, wobei letztere den EWAS-Daten ähnelten. Als solche zeigte diese Studie zum ersten Mal, dass epigenetische Signaturen innerhalb des DRN sowohl vom Krankheitsbild als auch vom analysierten Zelltyp stark abhängen können. Diese Ergebnisse unterstreichen daher die Bedeutung zukünftiger zelltypspezifischer neuroepigenomischer Studien bei sAD, auf die bereits in den **Kapiteln 2** und **4** kurz eingegangen wurde.

In **Kapitel 6** wurde ein Übersichtsartikel über den potenziellen Wert von iPSCs für die sAD-Forschung vorgestellt. Seit ihrer Entdeckung bieten diese Zellen einen vielversprechenden Weg, um die Translationslücke zwischen

präklinischer und klinischer sAD-Forschung zu schließen, indem sie die Erstellung patientenspezifischer In-vitro-Krankheitsmodelle ermöglichen, die für die Grundlagenforschung und die Wirkstoffentdeckung angewendet werden können. Es wird erwartet, dass die Bemühungen auf diesem Gebiet unser Wissen über verschiedene zugrundeliegende Krankheitsmechanismen vertiefen und bei der Etablierung therapeutischer Interventionen helfen werden. Alle wegweisenden Studien unter Verwendung von iPSCs von sAD-Patienten wurden in diesem Kapitel überprüft, die zeigen, dass die von iPSC abgeleiteten Nervenzellen neuropathologische Prozesse der Krankheit rekapitulieren, wenn auch mit einem recht hohen Grad an Variabilität hinsichtlich ihres Vorhandenseins und ihrer Schwere. Daher wurden Variabilitätsquellen in Bezug auf das Modell zusätzlich zu denen, die durch die heterogene Natur von sAD erklärt werden könnten, kritisch diskutiert. Aus diesem Kapitel geht hervor, dass die Entwicklung von iPSC-Modellen für sAD ein herausforderndes Unterfangen bleibt aufgrund der multifaktoriellen Natur der Krankheit, des nahezu lebenslangen Fortschreitens der Krankheit und des hohen Grads an interindividueller Heterogenität, die sich in Zellen von Patienten widerspiegeln könnte. Abgesehen von der mit der Krankheit verbundenen Variabilität wirken sich verschiedene methodische Faktoren, wie die mit der iPSC-Erzeugung und der (neuronalen) Differenzierung verbundenen, weiter auf diesen Variationsgrad aus. Daher sind zukünftige Anstrengungen erforderlich, um die von iPSC abgeleiteten Modelle und Variabilitätsquellen detailliert zu charakterisieren, wenn robuste Krankheitsmodelle für die Untersuchung von sAD erstellt werden sollen. Unter Berücksichtigung dieser Überlegungen bieten die sich entwickelnden iPSC-Modelle jedoch eindeutig einen spannenden Ansatz in der sAD-Forschung.

Im Verhältnis zu der Entwicklung von iPSC-basierten Modellen wurde in **Kapitel 7** ein ausführlicher Übersichtsartikel zu Protokollen zur gerichteten und direkten neuronalen Differenzierung vorgestellt ausgehend von beziehungsweise Stammzellen und somatischen Zellen. Wie in dieser Rezension diskutiert, haben Erkenntnisse aus der Grundlagenforschung und der Entwicklungsbiologie das Design aktueller Protokolle geleitet, und es sind zahlreiche Ansätze zur Ableitung regionalspezifischer glutamaterger, dopaminerger, GABAerger, serotonerger und cholinерger/motor Neuronen verfügbar geworden. Ansätze zur Ableitung jedes dieser krankheitsrelevanten neuronalen Subtypen wurden zusammengefasst, wobei entweder chemisch definierte Systeme unter Verwendung von Masterfaktoren, Transkriptionsfaktor-vermittelte Reprogrammierung und epigenetische Strategien zugrunde gelegt wurden. In dieser Übersicht wurde ferner hervorgehoben, dass sich zwar unterschiedliche Ansätze als erfolgreich erwiesen haben, um das Schicksal neuronaler Zellen *in vitro* zu steuern, ihre Verfeinerung und Optimierung sowie die Suche nach alternativen Strategien jedoch weiterhin erforderlich sind,

um das volle Potenzial der letztendlich abgeleiteten neuronalen Populationen auszuschöpfen. Darüber hinaus sind bestehende Protokolle in der Anzahl der neuronalen Subtypen, deren Induktion vollständig etabliert ist, immer noch begrenzt, und es existieren unterschiedliche Kultivierungsprotokolle für jeden Subtyp. Daher wird erwartet, dass die zukünftige detaillierte Charakterisierung der zellulären und molekularen Eigenschaften, die bei der Steuerung der Stammzelldifferenzierung und der Reprogrammierung somatischer Zellen entlang der neuralen Linie eine Rolle spielen, zur Entwicklung hoch robuster Protokolle beiträgt. Offensichtlich könnten diese Bemühungen zur Entwicklung hoch aussagekräftiger *In-vitro*-Krankheitsmodelle für Erkrankungen wie sAD beitragen.

Schließlich umfasste **Kapitel 8** eine explorative Pilotstudie, in der die Kenntnisse der **Kapitel 6** und **7** kombiniert wurden, um ein Differenzierungsprotokoll für das kortikale Vorderhirn von iPSCs zu etablieren und zu charakterisieren. Das übergeordnete Ziel dieses Kapitels war es, dieses Differenzierungsprotokoll zur Erstellung eines für sAD relevanten *In-vitro*-Modells zu verwenden. Zunächst wurde der Stamm der iPSC-Linie, die zur neuronalen Differenzierung verwendet wurde, anhand der Expression von Pluripotenzmarkern wie OCT4, NANOG, SSEA3, SSEA4, TRA-1-60 und TRA-1-81 bestätigt. Als nächstes wurden durch die sequentielle Anwendung neuronaler Strukturierungsfaktoren iPSCs zu neuronalen Vorläuferzellen (NPCs) und anschließend zu kortikalen Neuronen und Glia differenziert. In jeder Phase des Differenzierungsprozesses wurde die Expression von Transkriptionsfaktoren der Schlüssellinie bewertet, was bestätigte, dass die Zellen in Richtung eines Schicksals des kortikalen Vorderhirns voranschritten. Die erfolgreiche Ableitung von NPCs wurde durch die Expression von NESTIN, SOX2 und PAX6 bestätigt. Die Quantifizierung dieser Marker ergab weiterhin, dass sich die iPSCs in Richtung einer relativ homogenen Population von NPCs (>82%) differenzierten. Die Immunfluoreszenzuntersuchung nach Differenzierung der NPCs bestätigte das Vorhandensein der neuronalen Marker wie MAP2AB, DCX und TUJ1 sowie des Astrozytenmarkers GFAP. Zusätzlich wurde das Vorhandensein von kortikalen Vorderhirnmarkern, einschließlich CTIP2 und FOXP1, in den differenzierten Kulturen identifiziert. Insgesamt bestätigten diese vorläufigen Ergebnisse, dass das in diesem Kapitel beschriebene Protokoll die iPSCs erfolgreich in eine gemischte Population von kortikalen Vorderhirnneuronen und Glia differenzierte. Obwohl eine weitere funktionelle Charakterisierung dieser neuronalen Zellen weiterhin erforderlich ist, wurde postuliert, dass das in diesem Kapitel angewandte Protokoll zur Einrichtung eines kortikalen *In-vitro*-Krankheitsmodellsystems für sAD verwendet werden kann. Um dieses Potenzial weiter zu untersuchen, wurde die Expression von TNXB und des Oxytocinrezeptors (OXTR) in den von iPSC abgeleiteten kortikalen Kulturen bewertet. Wie bereits in **Kapitel 4** dieser Arbeit gezeigt, wurde die epigenetische und genetische Dysregulation von

TNXB in mehreren Regionen des sAD-Gehirns mit der AD-Pathophysiologie in Verbindung gebracht. Darüber hinaus wurden die epigenetische Deregulierung des Oxytocin-Gens (*OXT*) und Veränderungen der OXT-Signalübertragung zuvor auch mit sAD- oder assoziierten Krankheitsphänotypen in Verbindung gebracht. Interessanterweise konnte die Expression von TNXB und OXTR bereits nach 14 Tagen in den differenzierten Nervenzellen nachgewiesen und bis zu 56 Tage nach NPC-Differenzierung aufrechterhalten werden, was darauf hindeutet, dass diese kortikalen Vorderhirnzellen ein ansprechendes Modellsystem zur Untersuchung mechanistischer Prozesse im Zusammenhang mit TNXB und OXT-Signalisierung im Kontext von sAD darstellen könnten. Alles in allem sind die in diesem Kapitel unternommenen Anstrengungen unerlässlich, wenn krankheitsrelevante iPSC-basierte Modelle erstellt werden sollen.