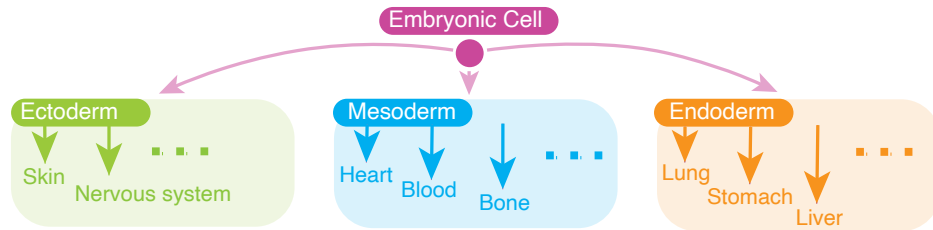


## SUMMARY



**Figure 1: The three cell types that occur during gastrulation.**

Human life starts from a single fertilized egg which develops into around 30 trillion cells that make up our body. The egg in the beginning is only a single cell with the potential to divide and change in appearance, function, and composition. These changes are necessary to develop into a complete human, where cells of the heart are very different from cells in the lung or brain. It has been estimated that we have around 200 different cell types in our bodies. Cells at an early stage after fertilization still have the potential to become any cell of the body, and we call them **embryonic cells**. The path from the embryonic cell to a fully specialized cell contains many intermediate stages. We can imagine this path as our way to find a career. As a child, we can still go on to become anything we like, but throughout school and university, we make decisions that further narrow down our field of specialization. With every decision we make, we come one step closer to a specialized field and at the same time it becomes less likely to change career path. For example, one of the first and most crucial decision events in development is **gastrulation** (see Fig. 1). At this point, three different cell types emerge from the embryonic cells. This would be similar to making a choice of university studies. This choice will, in most cases, influence the rest of our lives. At this point, the cell can choose between either of the three cell types: endoderm, mesoderm and ectoderm. This choice will narrow down the future career choices: For example, mesoderm will become the heart, blood cells, or bone tissue; Ectoderm will become the nervous system or skin; Endoderm will become the liver, stomach or lungs. In this summary, I want to guide you further through the journey of the embryonic cell.

### embryonic cells:

Cells of the embryo that have the potential to become any cell of the body.

### gastrulation:

The point where three important cell types arise: endoderm, mesoderm and ectoderm.

To really understand how a single cell makes decisions to become a specialized cell type, we have to look into the inside of the cell. We have to figure out where this information is stored and how it is used. Every cell in our body contains the same DNA, which is conserved throughout the cell's life time. It carries information about the building blocks of our bodies. More precisely, it consists of many genes encoded into the DNA. Every gene contains different information, for example about the eye color, hair color or height. It also contains genes that specify cell types. Thus, for each cell type different

### Information flow in a cell:

DNA → RNA → protein

genes have to become active. In order to do that, the information that the cell currently needs, is passed down from the DNA to the RNA. Every cell in our body has different RNA molecules. The last information transfer is then, from RNA to protein. It is assumed that the DNA contains around 20.000 genes that code for a protein, and our cells can have as many as 500.000 different proteins. Proteins are the most important components in the cell because they have a wide range of functions. Proteins are like the employees in a company, each one of them has a different job to do and for the company to work everyone must do their job. We can see the inside of an embryonic cell in development like a start-up company. It has to make a lot of changes to its structure and employees until it becomes a well-established firm. With the help of all the employees in the company, the company will in the end make a decision for the next stage. One important kind of protein, in this regard, is called **transcription factor** (TFs). TFs decide which genes will be active and which will remain unused in a cell. They control the protein composition in the cell and can be viewed as the managers in the company. They can hire and fire the people in the company. TFs which can control a high number of genes are called **master TFs** and would therefore be directors of the company. Master TFs in particular often give the cell its identity, meaning that different sets of master TFs are at play in distinct cell types. So, each company has their own group of directors and together they decide on the company's brand. TFs can also control each other and work in parallel. In this way, they form a network called a **gene regulatory network**. In this scenario, you can imagine the management department having to hire or restructure themselves. If several directors are arguing for a position, then the winning group of directors can decide the new company brand.

In order to know which proteins are active inside the cell, they have to be measured. Preferably, we would like to measure all the proteins in a cell to understand exactly what is going on, but that is not yet possible. What is possible, is to measure the RNA molecules in a single cell with a method called **single-cell RNA sequencing** (scRNA-seq). The largest data set produced so far with this method contained 1.3 million brain cells. As proteins are produced from RNA, we can get an estimate of the number of proteins in a cell by measuring the number of RNAs. scRNA-seq has given unprecedented insights into the definition of a cell type and the development of an embryonic cell. Cell types are now defined based on the number of RNAs and many new cell types were discovered in the past decades in this way.

**transcription factors:**

A protein that can control the activity of some genes.

**master TFs:**

TFs that can control the activity of many genes.

**gene regulatory network:**

A network of proteins that activate and suppress each other.

**single-cell RNA sequencing:**

A method to measure the entire RNA in every single cell.

*Chapter 1* of this thesis reviews cell identity in more detail and explains the changes that occur during the development of a cell. It outlines many single-cell techniques currently used to measure DNA, RNA, proteins, and chemical modifications in every single cell. Lastly, it introduces mathematical models for cell development to better understand the mechanisms and causal relationships between genes.

*Chapter 2* derives a method named phiclust to evaluate the purity of a cell type in scRNA-seq data. As we can measure all RNA molecules in a cell, it is important to evaluate when two cells are of the same type. Every cell has different RNA molecules due to random

fluctuations and processes unrelated to cell identity. Our new method can decide if the differences in RNA molecules between cells are different from random fluctuations. If the differences are larger, the cells are of different types. We used phiclust on scRNA-seq data of a developing kidney and discovered previously overlooked cell types. In this way, phiclust can help classify and identify the many cell types in our body.

During development, cells are influenced by many factors that can change the cells' decision. Just like for us, when we decide on a career path, it matters what environmental influences we were exposed to. The same happens for cells: Their decision depends on the decisions of other cells in their environment. Naturally, an embryonic cell is inside the womb of the mother. Studying cells in the natural context is called **in vivo**. For ethical reasons, it is impossible to study human development *in vivo*. Additionally, many processes happen simultaneously *in vivo* that we can not control and we also do not know their influence. Thus, we decided to look at **in vitro** systems. *In vitro* refers to studies outside the normal biological context in a controlled lab environment. To study embryonic cells outside the body, they must be extracted and cultured in a dish. Once they are stable *in vitro*, we call them embryonic stem cells. Embryonic stem cells still maintain their potential to become any cell type of the body but have been extracted from their original environment. Also for ethical reasons, biologists often use **induced pluripotent stem cells** (iPSCs). These cells are taken from mature cells of the body, for example, the skin. Then, they are reverse-engineered to the characteristics of a stem cell and regain the potential to become any cell type of the body. In summary: *embryonic cells in vivo are embryonic stem cell in vitro*.

*Chapter 3* studies the influence of the master TF ETV2 in blood vessel cells *in vitro*. Cells that form the vessels in our body are called **endothelial cells**. In general, their function is to create a barrier between a liquid, for example, blood, and the surrounding tissue. In particular, blood vessel-forming endothelial cells are important for the proper functioning of the heart. To understand the decision process of an endothelial cell, iPSCs were put into a dish and stimulated by specific chemical cues to become endothelial cells. But as described above, there are intermediate stages in the journey of the embryonic cell, which have to be respected *in vitro*. Using the career path metaphor, this means that first, it has to choose one of three basic career paths that cells have. For an endothelial cell this is mesoderm. In order to become a blood vessel, it has to specialize, like during master studies, on **cardiac** mesoderm (related to the heart). After its master studies, it can now choose the job of an endothelial cell. Surprisingly, we found that in the experiments, two cell types arise: endothelial cells and heart muscle cells which are responsible for the contractions in the heart. This means that after the master studies the cells could still choose between two different jobs. Using scRNA-seq, we showed that the decision depends on the master TF ETV2. If there is less ETV2 the iPSCs will become heart muscle cells and if there is more ETV2 they will become endothelial cells. Here, we can see how important master TFs are in the decision of the cell. As a master TF, ETV2 is able to manage the activity of other genes. So, if enough

**in vivo:**

A process where cells are in their natural biological context.

**in vitro:**

A process where cells are outside their biological context in a dish.

**induced pluripotent stem cells:** Mature cells reverse-engineered to stem cells.

**endothelial cells:**

Cells that form vessels in the body.

**cardiac:**

Related to the heart.

ETV2 is in the cell, then it will activate genes of the endothelial cell identity and in this way re-brand the cell. After re-branding, ETV2 is no longer needed and will be fired from the director position. This is an example of a gene regulatory network and how it changes as the cell makes choices.

As mentioned above, environmental factors can influence a cell's decision. One way in which this happens is by communication with each other. Cells communicate for example via specific proteins named **ligands**. This type of protein has the ability to leave the cell and wander off to the next cell. Once it arrives at another cell it changes the gene regulatory network of the receiving cell. In other words, this messaging protein, can influence the decisions of the managers in another company. In the first half of this thesis, the focus was on changes in the internal compositions of the cells. In the second half, we will extend this by investigating the influence of cellular communication on the cell's composition. We will study cell types combined in vitro that naturally would occur together in vivo to understand how they influence each other.

*Chapter 4* compares the influence of developmental origin to cellular communication in endothelial cells. This chapter is a continuation of *Chapter 3*, where heart muscle and endothelial cells were derived. In vivo, the human heart comprises multiple cell types, including heart muscle cells, blood vessel cells (endothelial cells), and connective tissue. So, these three cell types were put together in a dish in vitro to create a heart tissue environment. But endothelial cells not only form blood vessels but can for example also form lymph vessels that transport lymph instead of blood in the body. We wanted to understand how endothelial cells decide which type of vessel to become: Are they either influenced by the communication with neighboring cells or influenced by the cell's developmental origin (previous career choices)? For this reason, a second experiment was added where endothelial cells specialized in their master studies on **paraxial** mesoderm instead of cardiac mesoderm. Endothelial cells stemming from paraxial mesoderm usually form lymphatic vessels rather than blood vessels. Then, both endothelial cells, from either background, were put into the same heart tissue environment. With scRNA-seq, we saw that the RNA profiles of both endothelial cells were very similar after integration into the heart tissue environment. This result shows that cellular communication is more important than the developmental background for endothelial cells. It also shows in general that environmental influences have a high impact on the decisions of cells.

**ligands:**

Proteins that are used by cells to communicate.

**paraxial:**

Cells situated alongside an axis.

**extraembryonic endoderm cells:**

Cells surrounding the outside of the embryo.

In a second example in *Chapter 5*, we show how cellular communication can cause the formation of a neural tube in vitro. We investigated cellular communication in a well-known in vitro model system, namely gastruloids. This system is a model for gastrulation which is the moment of choice between the three university studies of the cell (see Fig. 1): endoderm, ectoderm and mesoderm. We used mouse embryonic stem cells to reproduce this important decision event. The embryonic stem cells are able to form all three cell types by themselves in a dish. But we know from in vivo studies that the embryo is surrounded by a layer of cells called **extraembryonic endoderm cells** (XEN). When embryonic stem cells were combined with XEN cells in vitro, the XEN cells formed an outer layer around

the stem cells, just like in vivo. Even more striking was that the stem cells started forming structures that looked like a tube. These structures have not been observed without the addition of XEN cells. Thus, they must be a direct result of the communication between the two types of cells. With scRNA-seq and imaging, we characterized these structures. We found that they evolve from ectoderm, which is responsible for creating the nervous system. These findings indicate the involvement of XEN cells in the formation of neural tube-like structures. Additionally, we observed that also the mouse embryonic stem cells cause changes in the RNA of XEN cells. This experiment shows that communication between cells is already very important in the early stages of a cell's path.

In the previous chapters, we have characterized elements involved in a cell's decisions with scRNA-seq and imaging.

**dynamical systems:**  
Equations that evolve through time.

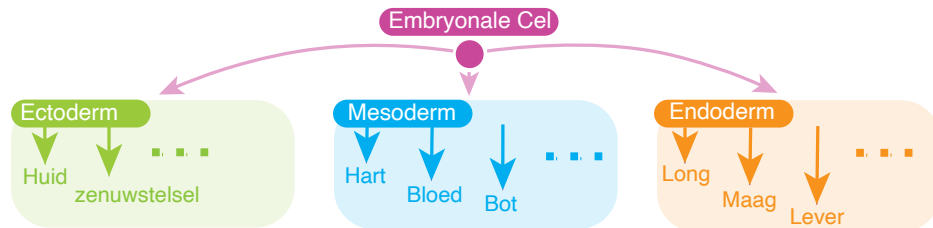
However, to understand the causal relationships in a gene regulatory network we want to formulate mathematical models. Therefore, we set out to use this data to inform mathematical equations about gene interactions during development in *Chapter 6*. These equations describe the time evolution of each gene in the gene regulatory network and are called **dynamical systems**. In a dynamical system, parameters determine the strength of interactions between genes or molecules. We employed physics-informed deep neural networks (PINNs) to determine these parameters with measured data. A neural network is a machine learning technique usually used successfully for pattern recognition. PINNs combine machine learning with physical laws. In this way, we can learn patterns from the data while conforming to predefined mathematical equations. We covered two relevant experimental scenarios: One where cells communicate and measurements of single cells are available. This data can, for example, be generated by imaging proteins through time. In the other scenario, cells do not communicate, and only snapshot data is obtainable. This model could then incorporate, for instance, scRNA-seq measurements. This analysis provides a starting point for acquiring mechanistic insights into the development of an embryonic cell by utilizing different data sets.

I hope this summary has allowed you to get a glimpse of the very complex journey of an embryonic cell. We showed how to define cell identity based on scRNA-seq data, and took a closer look at the influence of master TFs. Then, we added cellular communication to the experiments and found that it crucially influences a cell's developmental path. Lastly, we wanted to combine all this information into a mathematical model that allows us to understand the mechanisms involved in the cell's decisions. There is still much left to study before we can fully understand how a cell makes its decisions.

May the embryonic cell always make the right choice!



## SAMENVATTING



Figuur 2: 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 celtypes 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. 2). Op dat moment ontstaan drie verschillende celtypes 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 celtypes 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 directeurs 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 directeurs 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 directeurs om een positie twisten, dan kan de winnende groep directeurs 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 TFs:**  
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 **endothelcellen** 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 endothelcellen belangrijk voor de goede werking van het hart. Om het besluitvormingsproces van een endothelcel 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. 2): 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 schaalpje. 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!