

Abstract

Human induced pluripotent stem cell (hiPSC)-derived neural stem cells (hiPSC-NSC) represent a valuable source of neural cell lineages for research, drug testing and regenerative therapies in the central nervous system (CNS). Gene modification of NSCs prior to their injection could help monitor their behavior after transplantation. In this study, we have tested the validity of genome editing technology based on zinc finger nucleases (ZFN) to generate stable reporter-expressing human iPSC-NSC line and to determine whether cells generated in this multistep process maintain their genome integrity. To this end, construct containing GFP reporter driven by EF1- α promoter was successfully integrated into a safe harbor gene locus (AAVS1) of hiPSC-NSCs. After clonal selection and identification of mono- or bi-allelic clones, detailed analysis was done. They stably expressed the reporter gene over prolonged expansion *in vitro* and preserved the NSC characteristics of the parental NSC line. Molecular karyotyping revealed duplication of the long arm of the chromosome 1 (du(1)q) in late passage parental and gene-edited iPSC-NSCs, which was not observed in the parental hiPSC line and early-passage hiPSC-NSCs. More detailed analysis of bi-allelic ZFN-NSC clone carrying du(1)q showed overexpression of several genes located on this genomic area, such as MDM4, LRRN2, PIK3C2B, and AKT3 which were previously associated with glioma. The EdU-incorporation assay revealed that the proliferation rate of NSCs carrying duplication was significantly higher compared to cells without duplication and inhibitor studies demonstrated that PI3-kinase and AKT signaling pathways are responsible for this phenomenon. Transplantation of ZFN-NSCs with and without du(1)q into the striatum of immunodeficient rats showed that both transplanted cell populations exhibited similar survival and differentiation potential at 2 and 8 weeks after transplantation. However, cells with du(1)q retained their higher proliferation rate *in vivo* especially in the first weeks after transplantation. These analyses demonstrate that human iPSC-NSCs possess the strong propensity for a selective gain of Chr 1q and that gene editing using ZFN does not affect this behavior. Although upregulation of pro-survival genes located on 1q may beneficially affect the transplanted NSCs survival, this chromosomal aberration may also represent an increased tumorigenic risk, especially in a long-term, because this chromosomal defect has been previously associated with pediatric brain tumors with the poor clinical outcome. Which of these potential outcomes will most likely occur *in vivo* in a long-term needs to be investigated in future studies.

Zusammenfassung

Neurale Stammzellen (NSCs), die aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSCs) generiert wurden, sind eine wertvolle Quelle neuraler Zelllinien für die Nutzung in der wissenschaftlichen Forschung, der Medikamententestung und der regenerativen Therapie des zentralen Nervensystems (CNS). Genetische Modifizierungen der NSCs vor ihrem Transplantationseinsatz, können helfen ihr Verhalten nach der Transplantation zu verfolgen. In dieser Arbeit haben wir die Validität von Genom verändernden Technologien, welche auf der Zinkfingernuklease (ZFN) basieren, getestet, um eine stabile Reporterzelllinie humaner iPSC-NSCs zu generieren und um zu untersuchen, ob diese im mehrstufigen Prozess entstandenen Zellen ihre genomische Integrität behalten. Zu diesem Zweck wurde ein Konstrukt, welches einen GFP-Reporter enthält, der durch einen EF1- α -Promotor gesteuert wird, erfolgreich in einen sogenannten „safe harbor“ Genlokus (AAVS1) der hiPSC-NSCs integriert. Nach klonaler Selektion und Identifikation mono- und bialleler Klone wurden detaillierte Analysen durchgeführt. *In vitro* exprimierten sie die Reportergene über einen längeren Expansionszeitraum stabil und bewahrten die NSC-Charakteristika ihrer parentalen NSC-Linie. Molekulare Karyotypisierung ergab eine Verdopplung des langen Arms des Chromosoms 1 (du(1)q) in späten Passagen der parentalen und der genetisch veränderten iPSC-NSCs, welche in der parentalen hiPSC-Linie und in den frühen Passagen der hiPSC-NSCs nicht zu beobachten war. Eine detailliertere Analyse eines bi-allelen ZFN-NSC Klons, welcher das du(1)q trug, ergab eine Überexpression von mehreren in diesem Bereich lokalisierten Genen, wie zum Beispiel MDM4, LRRN2, PIK3C2B, und AKT3, welche zuvor mit Gliomen assoziiert wurden. Der EdU-Inkorporationsassay zeigte, dass die Proliferationsrate der NSCs, welche Verdopplungen trugen, signifikant höher war im Vergleich zu Zellen ohne Verdopplung. Experimente mit Inhibitoren ergaben, dass PI3-kinase und AKT Signalwege für dieses Phänomen verantwortlich waren. Die Transplantation von ZFN-NSCs mit und ohne du(1)q in das Striatum immundefizienter Ratten ergab, dass 2 und 8 Wochen nach Transplantation beide Zellpopulationen ein ähnliches Überlebens- und Differenzierungspotential besaßen. Allerdings bewahrten Zellen mit du(1)q ihre hohe Proliferationsrate *in vivo*, insbesondere während der ersten Woche nach Transplantation. Diese Analysen legen dar, dass humane iPSC-NSCs stark zu einem selektiven Zuwachs des Chr 1q neigen und dass genetische Veränderungen mittels ZFN dieses Verhalten nicht beeinflussen. Obwohl die Hochregulierung von „pro-survival“ Genen auf 1q sich vorteilhaft auf das Überleben der NSCs auswirkt, können diese chromosomalen Abweichungen ein erhöhtes Tumorrisiko darstellen, insbesondere auf lange Sicht, da diese chromosomalen Defekte bereits mit pädiatrischen Hirntumoren mit schlechtem klinischen Ausgang in Verbindung gebracht wurden. Welche dieser Möglichkeiten langfristig tatsächlich *in vivo* eintreten wird, müssen zukünftige Studien zeigen.