

Zusammenfassung

Neurale Stamm- und Vorläuferzellen sind die Hauptakteure der neuralen Entwicklung und tragen zur Aufrechterhaltung der Gehirnplastizität im Laufe des Lebens bei (Bond et al., 2015). Darüber hinaus ist das Potenzial von neurale Stamm- und Vorläuferzellen, sich in reife Nervenzellen zu differenzieren und somit verloren gegangene oder dysfunktionale Gewebe zu ersetzen, einer der vielversprechendsten therapeutischen Ansätze zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen oder Hirnverletzungen. Bildgebende Verfahren, die eine Verfolgung der Differenzierungsvorgänge unter nicht-invasiven Bedingungen ermöglichen, fehlen oder sind auf eine bestimmte neurale Entwicklungslinie beschränkt (Ahn et al., 2014; Tennstaedt et al., 2015a). Es besteht ein ernsthafter Bedarf an bildgebenden Verfahren, die es erlauben, das Differenzierungsvermögen von transplantierten Zellen und die damit verbundene therapeutische Wirksamkeit stammzellbasierter Ansätze zu bewerten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Differenzierungsvermögen von neuronalen Vorläuferzellen (NPCs), die aus induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC) abgeleitet wurden, mittels Biolumineszenz- und Fluoreszenz-Bildgebung unter definierten *in vitro* Bedingungen sowie unter spontanen *in vivo* Bedingungen im Mäusegehirn verfolgt. Darüber hinaus wurde ein erweiterter Ansatz zur Biolumineszenz-Bildgebung entwickelt, der auf der Verwendung von zwei unterschiedlichen Luziferasen beruht und dadurch die simultane Detektion zweier verschiedener Zellpopulationen innerhalb eines Versuchsdurchlaufs ermöglicht.

Für die Verfolgung der Differenzierungsvorgänge wurden lentivirale Vektoren entwickelt, die je einen Biolumineszenz- und einen Fluoreszenzbildgebungsreporter unter der Kontrolle von zellspezifischen Promotoren exprimieren, die die jeweiligen neuronalen Entwicklungslinien repräsentieren. Die transgenen NPCs wurden unter selektiven Kulturbedingungen in neuronale, astrogliale und oligodendrogliale Zellen differenziert. Eine Zelllinien-spezifische Hochregulation der Promotor-Aktivität und der entsprechenden Bildgebungsreporter konnte beobachtet werden, beginnend mit Neuronen-spezifischen Zellmarkern und gefolgt von Glia-spezifischen Zellmarkern.

Für die Verfolgung des Differenzierungsvermögens unter *in vivo* Bedingungen wurden die transgenen NPCs in die Gehirne von immundefizienten Mäusen implantiert und das Überleben der Zellen sowie deren Differenzierungsvermögen über einen Zeitraum von 12 Wochen beobachtet. Die nicht-invasive Langzeitbeobachtung der Zellen wurde durch histologische sowie durch neurophysiologische Verfahren ergänzt um das Schicksal der Zellen hinsichtlich ihres Migrationsvermögens und ihrer Funktionalität ganzheitlich zu erfassen. Die umfangreiche Analyse ergab, dass die transplantierten Zellen bevorzugt in Astrozyten differenzieren und nur

ein kleiner Teil in neuronale Zellen. Das Migrationsvermögen der transplantierten Zellen war in den meisten Fällen auf kurze Distanzen beschränkt und nur für ein Tier konnten Migrationsströme in entfernt gelegene kortikale Regionen festgestellt werden.

Für den erweiterten Biolumineszenz-Bildgebungsansatz konnten die zwei verschiedenen Emissionsmaxima durch die Anwendung von spektralen Entmischungsalgorithmen sowohl unter *in vitro* als auch unter *in vivo* Bedingungen klar getrennt werden. Darüber hinaus wurde ein gewebeähnliches Phantom entwickelt, das wichtige Komponenten der Lichtstreuung und -absorption simuliert.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ich die Stärke der optischen Bildgebung zur Untersuchung des Differenzierungsverhaltens unter verschiedenen Bedingungen demonstrieren. Die hier entwickelte Bildgebungsplattform kann letztendlich verwendet werden, um das Differenzierungsverhalten der transplantierten Zellen innerhalb neurodegenerativer Krankheitsmodelle zu untersuchen und die Optimierung stammzellbasierte Therapieansätze zur Wiederherstellung neuronaler Schaltkreise und der damit verbundenen Plastizität des Gehirns voranzutreiben.

Abstract

Neural stem cells (NSCs) and progenitor cells (NPCs) are the key players in neural development and brain maturation and contribute to brain plasticity throughout life (Bond *et al.*, 2015). Moreover, the potential of NSCs/NPCs to differentiate into mature neural cells and thus to replace lost or dysfunctional tissue is one of the most promising therapeutic options to treat various neurodegenerative diseases or brain injuries. Imaging modalities which allow the tracking of NSC/NPC differentiation longitudinally and non-invasively *in vivo* are lacking or restricted to one specific lineage (Ahn *et al.*, 2014; Tennstaedt *et al.*, 2015a). There is a strong need for imaging modalities which allow the evaluation of the differentiation capacities of the engrafted cells and thus the therapeutic outcome of stem cell-based approaches.

Within this thesis, the lineage commitment of NPCs derived from induced pluripotent stem cells (iPSC) was monitored via optical imaging under defined *in vitro* conditions and under spontaneous *in vivo* conditions in the mouse brain. In addition, a multicolor bioluminescence imaging approach was developed for the simultaneous detection of two potential cell types within one imaging session.

For the monitoring of the lineage commitment under various conditions, lentiviral vector constructs were designed including bioluminescence (BLI) and fluorescence imaging (FLI) reporters downstream expressed of constitutive or cell-specific promoters representing different developmental stages of the cells. Transgenic NPCs were generated and differentiated into neuronal, astroglial, and oligodendroglial cells under selective culture conditions. A lineage dependent upregulation of promoter-activity and the corresponding imaging reporters was observed starting with neuronal cell markers followed by glial markers.

For the monitoring of the lineage commitment upon cell transplantation, NPCs were engrafted into the cortex of immunodeficient mice and survival, proliferation, as well as differentiation capacities were followed via longitudinal BLI over twelve weeks. The longitudinal non-invasive monitoring was complemented by immunohistochemistry for fate validation, light-sheet fluorescence microscopy for spatial expansion, and electrophysiology for the functionality of the stem cell grafts. The comprehensive analysis revealed that engrafted NPCs preferentially differentiate into astrocytes and only a minor fraction was differentiating into neuronal cells. Nevertheless, this small fraction was proved as functional cells with characteristic firing patterns. Migration capacities of the engrafted cells were mainly restricted to short distances and for only one animal migration towards distant cortical regions was observed.

For the multicolor BLI approach, two different firefly luciferase (FLuc) mutants with shifted emission maxima were generated and transiently integrated into human cells. Through the application of spectral unmixing algorithms, a clear separation of the two luciferases was

achieved under both, *in vitro* and *in vivo* conditions. Furthermore, a tissue-like phantom mimicking important components responsible for light scattering and absorption was designed. Within this thesis, I was demonstrating the strength of optical imaging approaches to study neural lineage commitment under various conditions. The here assessed imaging platform can be used to study the neural lineage commitment of engrafted NSCs/NPCs upon neurodegeneration and to optimized stem cell-based approaches for the recovery of neuronal circuits and brain plasticity.