

*Dipl. Neurowissenschaftler Markus Aswendt*

Dissertation: Imaging beyond structure – novel noninvasive tools for neuroimaging of stem cell function and differentiation -

## **Zusammenfassung**

Der Schlaganfall stellt die weltweit zweithäufigste Todesursache dar. Allerdings sind die klinisch etablierten Maßnahmen sehr begrenzt. Im experimentellen Tiermodell wird seit ca. 15 Jahren verstärkt an einer neuen Therapiemethode geforscht: der Transplantation von Stammzellen. Der konventionelle Weg für die Untersuchung der Therapiewirksamkeit sind invasive Methoden, z.B. die histologische Färbung an Hirnschnitten. Die Magnetresonanztomographie (MRT), eine nicht-invasive Bildgebungsmethode, ermöglicht die Lokalisation und Verfolgung der transplantierten Zellen am lebenden Tier. Hierfür werden die Stammzellen mit Kontrastmitteln markiert, die eine eindeutige Zuordnung der Stammzellen im Gewebeverband erlauben. Bisher ist es jedoch noch nicht gelungen, die intra-individuellen Zusammenhänge zwischen Zellvitalität, Zellschicksal und dem therapeutischen Effekt mittels bildgebender Verfahren darzustellen und nachzuweisen.

Ziel dieser Dissertation ist es, neue Methoden der nicht-invasiven Bildgebung für das experimentelle Tiermodell zu etablieren, die über den bisherigen Stand der Forschung hinausgehen und es erlauben,, Zellfunktionen darzustellen und Differenzierungsvorgänge zu verfolgen.

Das erste Teilprojekt stellt ein neuartiges Kontrastmittel vor, welches chemisch modifiziert wurde, mit dem Ziel, dass es nur durch ein Enzym in GABAergen Neuronen aktiviert und damit im MRT sichtbar gemacht werden kann. Die Glutamatdecarboxylase (GAD) erkennt das Kontrastmittel anhand von Glutamatgruppen als Substrat und spaltet  $\text{CO}_2$  ab. Dadurch verändern sich sowohl die Struktur des Kontrastmittels als auch seine physikalischen Eigenschaften – die Relaxivität wird erhöht. Gewebelysate und ein GAD-Inhibitor dienten zur Überprüfung der spezifischen Aktivierung des Kontrastmittels. Ein neu etabliertes Zellmodell ermöglichte die Generierung von GABAergen Neuronen aus embryonalen Stammzellen in der Zellkultur. In systematischen Untersuchungen wurde für diese Zellen die Markierungstechnik mit Kontrastmittel auf Effizienz und Zellvitalität optimiert. Im Ergebnis konnte mittels der MRT nachgewiesen werden, dass das neue GAD-sensitive Kontrastmittel eine Unterscheidung von Stammzellen und ausdifferenzierten GABAergen Neuronen in vitro und in vivo ermöglicht.

Eine zweite nicht-invasive Methode, die Biolumineszenz-Bildgebung wurde für die Stammzelltransplantation im Maushirn optimiert. Biolumineszenz beschreibt die Aussendung von Licht durch die Aktivität von Enzymen, die z.B. aus dem Glühwürmchen *Photinus Pyralis* isoliert wurden. Solche Luziferasen lassen sich in Säugetierzellen überexprimieren und dienen aufgrund ihrer Abhängigkeit von zellulären Energieträgern (ATP) als Viabilitätsmarker. Als Referenzmodell für Biolumineszenz im Nagerhirn wurden transgene Mäuse verwendet, die Luziferase unter Kontrolle des neuronalen Doublecortin-Promotors exprimieren. Mit diesen Mäusen konnten das Standardprotokoll für die Biolumineszenzbildgebung für die neuronale Anwendung optimiert werden. Hierzu wurden die Konzentration des Luziferasesubstrats, der Applikationsweg und die Effekte verschiedener Anästhetika verglichen. Weiterhin wurden Luziferasen verschiedener Spezies für die neuronale Anwendung getestet. Diese Experimente wiesen die höchste Sensitivität für die Luziferase Luc2 nach. Anhand einer selbst etablierten neuralen Stammzelllinie (aus murinen embryonalen Stammzellen), ließ sich das Potential des optimierten Protokolls in Verbindung mit der Luc2 Luziferase nachweisen. Mit bis dahin nicht erreichter Sensitivität konnten transduzierte neurale Stammzellen nach Transplantation mittels Biolumineszenz dargestellt werden.

Im letzten hier vorgestellten Projekt wurde die optische Bildgebung um die Möglichkeit der Darstellung von Differenzierungsvorgängen erweitert. Die neurale Stammzelllinie wurde dafür doppelt lentiviral transduziert: 1. für die konstitutive Expression der *Renilla* Luziferase und dem grünen Fluoreszenzprotein copGFP und 2. für die Expression der Luc2 Luziferase und dem roten Fluoreszenzproteins mCherry unter Kontrolle des humanen GFAP-Promotors. Das saure Gliafaserprotein GFAP wird in den neuralen Stammzellen in vitro nur nach Induktion der glialen Differenzierung exprimiert. Dadurch wird auch der transgene humane GFAP-Promoter aktiviert. Dieser bimodale optische Ansatz ermöglichte erstmals den Verlauf einer glialen Differenzierung anhand des Expressionsmusters optischer Reporter zu verfolgen. Zusammenfassend stellt diese Dissertation das Potential nicht-invasiver Bildgebungsmethoden dar, um über die reine Strukturauflösung hinaus, auch zellspezifische Funktionen zu visualisieren. Diese können in Zukunft dafür genutzt werden den therapeutischen Effekt von Stammzelltransplantationen auf zelluläre Funktionen in vivo zurückzuführen.

Dipl. Neurowissenschaftler Markus Aswendt

PhD thesis: Imaging beyond structure – novel noninvasive tools for neuroimaging of stem cell function and differentiation -

## **ABSTRACT**

Stroke is one of the leading causes of death and permanent disability worldwide. However, the clinically approved therapies are strictly limited. One promising novel approach is the transplantation of stem cells to enhance recovery. Prior to a successful clinical translation, experimental models are necessary to reveal the underlying biological mechanisms. Noninvasive imaging, particularly magnetic resonance imaging, evolved as a novel tool to study stem cell location and migration in the living animal over time. Contrast agents are used to label cells prior to transplantation and allow the discrimination from the host tissue. One remaining drawback is the limitation on structural information. The question remains, how to elucidate additional cell properties - like viability and fate. This dissertation includes novel neuroimaging techniques: contrast agents responsive to a specific cellular function and optical reporters of cell viability and cell differentiation. The first project includes the development of a molecular probe, bioengineered to detect selectively the expression of glutamic acid decarboxylase. This enzyme is unambiguously expressed in the brain by GABAergic neurons. The novel contrast agent serves as a substrate for the enzyme and permits the discrimination of GABAergic neurons from immature cells based on the decreased  $T_1$  relaxation rate. Optical cell tracking with bioluminescence has been investigated in the second project. Luciferases, e.g. isolated from the firefly *Photinus Pyralis*, can be expressed in mammalian cells and permit a cell viability-dependent readout. A transgenic mouse model of luciferase expression restricted to doublecortin-positive neurons served as a reference for optical neuroimaging and allowed bioluminescence protocol optimization under stable conditions. Luciferase substrate concentrations, injection routes and anesthesia effects were investigated. As a major result, an optimized protocol with 2-fold higher sensitivity was established. A mouse neural stem cell line was generated and transduced with 4 different luciferases for a quantitative comparison after transplantation into the mouse brain. Firefly luciferase Luc2 was selected because of its superior bioluminescence in the brain. Cell grafts were imaged with surpassing sensitivity by applying the empirically optimized protocol.

Based on this evaluation, neural stem cells were genetically modified to express a set of distinct optical reporters under control of either a constitutive promoter or cell-specific promoter. Glial differentiation has been monitored by the induced expression of firefly luciferase and the fluorescent protein mCherry controlled by the GFAP promoter.