

Reprogramming of Neural Stem Cells

Master Thesis

Program of study Molecular Biology with emphasis on Biomedicine and Biochemistry

Submitted by

Ulrich Pfisterer
from **Freudenstadt**

Lund, 25th of July, 2010

Studies accomplished at the

Wallenberg Neuroscience Center, Lund, Sweden

Department of Medical Sciences, Neurobiology Unit

Prof. Anders Björklund

Supervisor: Johan Jakobsson, PhD

1. Summary

The loss of midbrain dopaminergic (mDA) neurons in the substantia nigra pars compacta (SNc) is one of the cardinal symptoms of the progressive, age-related neurodegenerative illness Parkinson's disease. This leads to an impairment of the innervation of the striatum due to reduced dopamine (DA) levels and gives rise to motor and behaviour disturbances. The development of mDA neurons is initiated when neural stem cells undergo patterning towards a ventral cell fate and these ventral precursor cells subsequently develop into immature mDA neurons while exiting the cell cycle. Once the maturation is completed, mDA neurons express characteristic markers such as tyrosine hydroxylase (TH) - the rate-limiting enzyme in DA synthesis. This developmental course comprises four stages that are designated by cell-extrinsic signalling components as well as transcription factors expressed within the developing cell. Stem cell-based therapies for Parkinson's disease (PD) aim to restore degenerated mDA neurons in the substantia nigra pars compacta (SNc). In the course of this thesis it will be shown that the reporter neural stem cell line NSE14-GFP can be grafted into the striatum of neonatal rats of PD while the reporter gene is not turned off by a majority of the cells. Nevertheless, it was found that this cell line yielded cells of glia-like morphology upon transplantation which however were negative for TH. Lentiviral overexpression of ten TFs, involved in midbrain dopaminergic (mDA) neuron development, could be established in two neural stem cell lines. Differentiation of NSE14 and NS10.5VM cells after overexpression yielded neurons positive for betaIII tubulin but not TH. Overexpression of ten TFs simultaneously as well as Lmx1a alone, was not sufficient to induce downstream signalling partners such as Wnt1 and Shh. It was assumed that the chromatin status of these cells might not allow for the TFs to access their targets on DNA level. Treatment of NS10.5VM cells with the small-molecule compound and histone deacetylase inhibitor (HDAC) valproic acid (VPA) led to significant changes in cell morphology. In addition, VPA treatment of NS10.5VM cells enhanced overexpression of all ten TFs. However, the two small-molecule compounds VPA and 5'-AzaC alone or in combination as well as in the presence of lentiviral transgene delivery did not drive NS10.5VM cells towards a TH⁺ phenotype. On top of that, VPA treatment alone and in combination with 5'-AzaC did not yield any betaIII⁺ neurons after in vitro differentiation. However, 5'-AzaC treatment yielded betaIII⁺ neurons but at a reduced level when compared to non treated cells or cells only transduced with LV DA-mix.

Zusammenfassung

Zu den Hauptsymptomen der Parkinson'schen Krankheit (PK) zählt der fortschreitende Verlust dopamin-produzierender Neuronen im Mittelhirn (mDA), genauer in der Substantia nigra pars compacta (SNc). Der Mangel an Neurotransmitter Dopamin (DA) beeinträchtigt die Innervierung des Striatums, was unter anderem zu motorischen Störungen führt. Die Ausbildung von mDA Neuronen gliedert sich in vier Stadien und beginnt mit der regionalen Spezifizierung von Neuronalen Stammzellen (NS Zellen) zu Vorläuferzellen, die sich ventral im sich entwickelnden Mesencephalon und späteren Mittelhirn anlagern. Im weiteren Verlauf treten diese Vorläuferzellen aus dem Zellzyklus aus, ein Vorgang der in der Entstehung unreifer DA Neuronen resultiert. Einen Tag später in der embryonalen Entwicklung, sind die mDA Neuronen vollständig gereift und unter anderem durch die Expression von Tyrosin Hydroxylase (TH) charakterisiert - einem Schlüsselenzym der Dopaminbiosynthese. Grundsätzlich sind die vier Entwicklungsstadien der mDA Neuronen sowohl vom Vorhandensein zell-extrinsischer Signale als auch von Transkriptionsfaktoren (TFs) gekennzeichnet. Zellersatztherapie für PK basierend auf Stammzellen zielt darauf ab, die degenerierten mDA Neuronen der SNc durch funktionsfähige Neuronen zu ersetzen. Im Rahmen dieser Arbeit gelang es zu zeigen, dass es möglich ist die Transplantation der Reporterzelllinie NSE14-GFP in das Striatum neugeborener Ratten zu transplantieren, ohne dass dabei die Aktivität des Reportergens bei der Mehrheit der Zellen verloren ging. Jedoch wiesen die transplantierten Zellen Glia-ähnliche Morphologie auf. Aus diesem Grund wurden zehn TFs, die an der Entwicklung von mDA Neuronen beteiligt sind, in zwei NS Zelllinien überexprimiert. Überexpression aller zehn TFs und *Lmx1a* allein sowie gleichzeitige Differenzierung *in vitro* ergab jedoch sowohl keine Entwicklung eines TH⁺ mDA Phänotyps wie auch keine Induktion von *Wnt1* oder *Shh*, die an der Signaltransduktion einiger der TFs beteiligt sind. Die Behandlung von NS10.5VM Zellen mit Valproischer Säure (VPS) führte zu einer veränderten Zellmorphologie sowie zu erhöhter Transgenexpression. *In vitro* Differenzierung in Anwesenheit von VPS allein, sowie in Kombination mit 5'-Azacytidin (5'-AzaC) bei gleichzeitiger Überexpression der zehn TFs führte sowohl nicht zur Induktion eines TH⁺ Phänotyps als auch nicht zur Ausbildung *betalll*⁺Neuronen, ausgehend von NS10.5VM Zellen. Zwar konnten nach 5'-AzaC Behandlung *betalll*⁺ Neuronen gezählt werden, jedoch war deren Anzahl niedriger als in unbehandelten oder lediglich mit LV DA-mix transduzierten Zellen.