

Diss. ETH No. 14441

# Studying CNS Development Using The Cerebellum As A Model System

A dissertation submitted to the  
EIDGENOESSISCHE TECHNISCHE HOCHSCHULE (ETH) ZUERICH

for the degree of  
Doctor of Natural Science

presented by  
**Gila Stump**

dipl.sc.nat.

Swiss Federal Institute of Technology (ETH), Zürich, Switzerland

Born November 8, 1973 in Teufen / AR, Switzerland

Citizen of Switzerland

Accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. Ueli Suter, examiner  
Prof. Dr. Hans Eppenberger, coexaminer  
Dr. Verdon Taylor, coexaminer

2001

## SUMMARY

---

### **Thesis-Project I: Generation of Cerebellar Purkinje Cells and Granule Cells from Progenitors *in vitro***

Mechanisms that regulate the temporal and spatial formation of neurons and glia in the central nervous system (CNS) are poorly understood. Considerable effort is being invested into understanding the differentiation of multipotent CNS progenitor cells *in vitro* in order to gain insights into the formation and maintenance of neurons of the adult brain. We have focused on the cerebellum as an ideal model system to address the formation of defined populations of neurons and glial cells in the CNS. Here we describe a 2-dimensional cell culture system to maintain cerebellar progenitor cells in an undifferentiated state, and the induction of mature cerebellar neuron and glial cell differentiation *in vitro*. The cerebellar progenitor cells maintain their proliferative and differentiation capacity over many weeks *in vitro*. Furthermore, we show that a subpopulation of the cultured cerebellar neuroepithelial cells behave like stem cells and that the culture substrate plays a significant role in differentiation. We also show by expression of neurotransmitter receptors that the granule cells attain a high degree of terminal differentiation. Due to the adhesive nature of the culture, the cells are freely available to manipulation of the cell culture medium and substrate. We believe the cerebellar neuroepithelial cell culture system represents an excellent model to analyze factors that potentially regulate neurogenesis and determine CNS cell fate.

---

## **Thesis-Project II: Notch1 and the Ligands Delta and Serrate-Related are Expressed in Distinct Cell Populations in the Postnatal Brain**

Notch1 signaling has been shown to play a pivotal role in the regulation of vertebrate neurogenesis. Recent experiments suggest that Notch signaling may also be involved in the regulation of later stages of differentiation particularly in postmitotic neurons of the brain. In order to address the putative role of Notch signaling in the developing CNS, we have examined the expression patterns of Notch1, Notch3 and components of the proposed Notch signaling cascade. *In situ* mRNA hybridization revealed distinct patterns of Notch and ligand expression in the postnatal and adult brain. Notch1 is associated with cells in the subventricular zone, the dentate gyrus and the rostromigratory stream, all regions of continued neurogenesis in the postnatal brain. In addition, Notch1 is expressed at low levels throughout the cortex and olfactory bulb at postnatal day 4 and shows striking expression in the cerebellar Purkinje cell layer. In the adult, Notch1 expression in the cortex is reduced but is maintained at elevated levels in the olfactory bulb and the cerebellar Purkinje cell layer. The ligands for Notch1 including Delta-like1 and 3 and the Serrate-related Jagged1 and Jagged2 proteins show distinct expression patterns in the developing and adult brain that overlap that of Notch1. The cellular distribution of Notch1 and its putative ligands suggest distinct roles for Notch1 signaling in specific subsets of cells in the postnatal brain. In addition the downstream targets of the Notch signaling cascade Hes1, Hes3 and Hes5 also show distinct patterns of expression. Hes5 coincides with the majority of Notch expression and can be detected in the cerebral cortex, cerebellum and putative germinal zones. Hes3 on the other hand shows a restricted expression in cerebellar Purkinje cells. In addition, we examined the expression patterns of intrinsic Notch regulatory proteins Numb and Numbl like in the postnatal brain. The expression of Notch1 and ligands in the subventricular zone and in the sub-granule layer of the dentate gyrus suggest that Notch1 may regulate neurogenesis from putative stem cells in the postnatal brain and play role in differentiated cells of the adult brain.

### **Thesis-Project III: Calbindin-Cre Transgenic Mice as a Tool to Analyze Gene Function in the CNS**

Analysis of gene function in the nervous system by targeted inactivation in ES cells can be problematic, particularly if the gene in question plays a vital role in other tissues. Hence, the ability to ablate genes specifically from particular cell types in a regulated manner assist in the evaluation of gene function. The Cre lox system of gene ablation has proven to be a powerful tool to address function *in vivo*. Therefore, we have generated mice that express Cre-recombinase from the Calbindin D28k promoter in an attempt to be able to ablate gene specifically from postmitotic Purkinje cells *in vivo*. The cerebellum and particularly Purkinje cells are an excellent system to address development of the mammalian CNS including cell fate determination, differentiation, migration and cell-cell interactions. We show that some of the Calbindin-Cre transgenic line generated exhibit recombinase activity in the cerebellar Purkinje cells as expected. In addition, a number of lines show widespread or restricted expression patterns of Cre-recombinase due to potential integration effects of the transgene promoter. These lines will be valuable for addressing gene function *in vivo*.

## ZUSAMMENFASSUNG

---

### Kurze Einführung

Unser Labor untersucht die Entwicklung des Zentralen Nervensystems (ZNS) auf zellulärer und molekularer Ebene. Dabei konzentrieren wir uns auf das Cerebellum als Modellsystem. Unter diesen Voraussetzungen hat diese Arbeit zum Ziel, Werkzeuge für die Analyse von Entwicklungsvorgängen im Kleinhirn zu etablieren und zu beschreiben. Das Cerebellum ist im Vergleich zum Cortex eine verhältnismässig einfache Struktur. Es besteht aus nur fünf verschiedenen Neuronentypen, wovon die Purkinjezellen und die Körnerzellen die wichtigsten sind. Sowohl die Struktur, als auch die Entwicklung des Kleinhirns sind gut dokumentiert. Für verschiedene Entwicklungsstadien von Körner- und Purkinjezellen sind molekulare Marker beschrieben, welche die Analyse von Differenzierungsvorgängen erleichtern. Die Kleinhirnanlage ist schon sehr früh in der Embryonalentwicklung erkennbar und kann in einem frühen Entwicklungsstadium isoliert werden. Zudem ist das Kleinhirn keine lebensnotwendige Struktur. Dies hat den Vorteil, dass Funktionsanalysen von Genen mittels zielgerichteter Mutagenese nicht durch sekundäre Effekte zum Tod des Versuchstieres führen, selbst wenn die Mutation zum Tod der betroffenen Zellen führen würde. Dies erleichtert die Analyse von Genen, die während der Entwicklung eine Rolle spielen, enorm.

Im Gegensatz zum peripheren Nervensystem (PNS) ist die Regenerationsfähigkeit im Zentralen Nervensystem (ZNS) stark limitiert. Stammzellen sind aufgrund ihrer Plastizität zur Zeit die besten Kandidaten, Nervenzellen im alternden oder kranken Gehirn zu ersetzen. Über die letzten Jahre wurden bemerkenswerte Fortschritte

bezüglich des Verständnisses dieser Zellen erzielt. Neurale Stammzellen sind grob als multipotente Zellen, die sich selbst erneuern, die aber auch Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten bilden können, definiert. Im adulten Gehirn kann die Umgebung der Stammzellen nur sehr schlecht manipuliert werden. Aus diesem Grund werden Studien mit Stammzellen häufig *in vitro* durchgeführt. Reaktionen der Zellen auf Änderungen des Kulturmediums oder des Substrats geben Aufschluss über das Potenzial der Zellen und über die Beeinflussbarkeit der Zelldifferenzierung durch Faktoren im Medium. So können Signalsysteme ermittelt werden, welche für die Differenzierung der Zellen notwendig sind. Es hat sich gezeigt, dass aus Stammzellen *in vitro* auch Zelltypen generiert werden können, welche *in vivo* am Herkunftsort der Zellen nicht vorkommen. Dies ist aus medizinischer Sicht sehr interessant, macht aber klar, dass solche Daten in Bezug auf die Erforschung der Entwicklung im Organismus durch *in vivo* Experimente bestätigt werden müssen. Zudem können Fragestellungen, zum Beispiel bezüglich Dendritenbildung oder Axonprojektion, *in vitro* nur schlecht bearbeitet werden, da diese Prozesse auf eine intakte 3-dimensionale Struktur angewiesen sind.

In den Projekten I und III (Kapitel 2 und 4) dieser Dissertation werden Werkzeuge bereitgestellt, welche das Studium der Kleinhirnentwicklung auf zellulärer und molekularer Ebene, *in vitro* und *in vivo* ermöglichen sollen. Dies sind Fragestellungen mit denen sich die Grundlagenwissenschaft beschäftigt. Erkenntnisse über normale Entwicklungsabläufe bilden jedoch die Grundlage, abnormale Vorgänge im Krankheitsfall besser zu verstehen.

Projekt II (Kapitel 3) beschreibt die Expressionsmuster von Komponenten der Notch Signalkaskade. Beschreibende Experimente dieser Art bilden die Grundlage für die Interpretation von Phänomenen, welche bei *in vitro* oder *in vivo* Versuchen beobachtet werden.

### **Projekt I: Etablierung eines Kultursystems für neuroepitheliale Stammzellen der Kleinhirnanlage**

In diesem Projekt wird ein 2-dimensionales Zellkultursystem für Vorläuferzellen aus der Kleinhirnanlage etabliert. Dabei können diese Zellen in undifferenziertem Zustand expandiert und die Differenzierung zu neuronalen und glialen Zellen des ZNS durch Veränderung der Kulturbedingungen induziert werden. *In vitro* behalten die

undifferenzierten Vorläuferzellen ihre Fähigkeit zu proliferieren und zu differenzieren über mehrere Wochen und Passagen. Mit diesem Kultursystem sind wir in der Lage aus undifferenzierten Progenitorzellen spezifische Neuronentypen des Kleinhirns, wie Purkinjezellen, Körnerzellen und Astrozyten zu generieren. Die Körnerzellen exprimieren den Neurotransmitterrezeptor GABA $\alpha$ 6, was beweist, dass sich diese Neuronen in einem terminal differenzierten Zustand befinden. Zudem zeigen wir durch klonale Analyse, dass eine Subpopulation der undifferenzierten Zellen Stammzellcharakter aufweist und dass das Kultursubstrat einen wichtigen Beitrag zur Differenzierung leistet. Im Gegensatz zu Kultursystemen, bei welchen die Stammzellen als Aggregate in Suspension gehalten werden, sind hier sämtliche Zellen für Faktoren im Medium und für Substrate frei zugänglich. Wir glauben, dass dieses Kultursystem ein sehr gutes Modell für die Analyse von Faktoren ist, welche die Determinierung und Differenzierung von Stammzellen in der Neurogenese regulieren.

### **Projekt II: Komponenten der Notch Signalkaskade sind in unterschiedlichen Zellpopulationen des postnatalen Gehirns exprimiert**

Während der Entwicklung eines Organismus wird immer wieder entschieden, welchen Weg eine Zelle einschlagen muss. Ein solcher Prozess findet auch in Keimzonen statt, wo aus einer Population von identischen Stammzellen einige zur Differenzierung ausgewählt werden. Dieses Auswahlverfahren findet über einen Prozess lateraler Inhibition statt, in welchem das Notch Signalsystem eine zentrale Rolle spielt. Die Signaltransduktion via Notch1 ist wichtig für die Regulation der Neurogenese in Vertebraten. Neuere Resultate von *in vitro* Experimenten schreiben dieser Signalkaskade aber auch Aufgaben im Bereich der terminalen Differenzierung von Neuronen, wie zum Beispiel der Dendritenbildung zu. Aufgrund dieser Daten haben wir die Expressionsmuster der Rezeptoren Notch1 und Notch3, sowie der Liganden Delta-like1, Delta-like3, Jagged1 und Jagged2 im postnatalen Gehirn mittels mRNA *in situ* Hybridisierung erörtert. Notch1 wird von Zellen in der subventrikulären Zone, im Dentate Gyrus, sowie in Zellen, die rostral in Richtung bulbus olfactorius wandern (rostromigratory stream) exprimiert. Dies sind alles Strukturen, in welchen nach der Geburt noch Neurogenese stattfindet. In vier Tage alten Mäusen konnten wir Notch1 mRNA auch in Zellen des Cortex, des bulbus olfactorius und der Purkinjezellschicht im

Cerebellum nachweisen. Im adulten Cortex wird dann die Notch1 Expression herunter reguliert, im bulbus olfactorius und in der Purkinjzellschicht bleibt die Expression aber gleichermassen erhalten. Die Liganden Delta-like1 und 3, sowie Jagged1 und 2 zeigen unterschiedliche Expressionsmuster, die mit dem Muster von Notch1 überlappen. Aufgrund der zellulären Verteilung von Notch1 und seinen Liganden kann vermutet werden, dass die Aktivierung der Notch Signalkaskade in verschiedenen Zellen unterschiedliche genetische Programme reguliert. Um die Aktivität der Notchkaskade besser abschätzen zu können, haben wir die Expressionsmuster von Hes1, Hes3 und Hes5 studiert. Aktiviert ein Ligand den Notchrezeptor, wird die Expression dieser Transkriptionsfaktoren durch die intrazelluläre Domäne von Notch1 induziert. Dabei überlappt das Expressionsmuster von Hes5 mehrheitlich mit demjenigen von Notch1 und konnte im Cortex, im Cerebellum und in den Zonen adulter Neurogenese nachgewiesen werden. Das Transkript von Hes3 wurde nur in den Purkinjzellen detektiert und Hes1 mRNA ist im Gehirn nicht in nachweisbarer Menge vorhanden. Neben den Hes Transkriptionsfaktoren, welche das Notchsignal in eine zelluläre Antwort umwandeln, haben wir die Expression der intrazellulären Notch-Inhibitoren Numb und Numblike studiert. Auch diese zeigen überlappende Expressionsmuster mit Notch1. Die verschiedenen Expressionsmuster von Notch1 und 3 und ihren potenziellen Liganden in der subventrikulären Zone und der subgranulären Schicht im Dentate Gyrus lassen auf eine Rolle in der Regulation der Neurogenese im postnatalen Gehirn schliessen. Die Expression im Cortex und in den Purkinjzellen deuten auf eine Funktion von Notch1 in postmitotischen Neuronen hin.

### **Projekt III: Transgene Mäuse exprimieren Cre-Rekombinase in postmitotischen Neuronen.**

Mittels knock-out Technologie lassen sich Funktionen von Genen *in vivo* analysieren. Direkte Geninaktivierung in embryonalen Stammzellen kann aber problematisch sein, wenn das betrachtete Gen eine lebenswichtige Rolle in einem anderen Gewebe spielt. Mittels dem Cre-lox System ist es möglich Gene lokal und zeitlich spezifisch auszuschalten. Dies erleichtert die Analyse der Genfunktion.

Mit dem Ziel, Gene aus postmitotischen Purkinjzellen zu eliminieren, haben wir transgene Mäuse hergestellt, welche die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines



Promotorfragments des Calbindin D28k Gens exprimieren. Für dieses Promotorfragment wurde früher gezeigt, dass es in den Purkinjezellen transgener Mäuse zu einer Expression eines Reportergens führt.

In diesem Projekt beschreiben wir das Expressionsmuster der Cre-Rekombinase mit Hilfe des Reportergens LacZ. Wie erwartet, weisen die Tiere einiger transgener Mauslinien eine Cre Aktivität in den Purkinjezellen auf. In einigen Linien wurden auch Rekombinationsvorgänge in postmitotischen Neuronen anderer Hirnstrukturen nachgewiesen. Die verschiedenen Cre Expressionsmuster sind vermutlich auf Positionseffekte bei der Transgenintegration zurückzuführen.

Die verschiedenen transgenen Mauslinien werden die Analyse von Genfunktionen in Purkinjezellen und in anderen postmitotischen Neuronen ermöglichen und so einen Beitrag zum Verständnis der Kleinhirn- und ZNS-Entwicklung leisten.

### **Schlussfolgerungen und Ausblick**

Die Reparatur des beschädigten oder kranken Gehirns ist ein wichtiges und ehrgeiziges Ziel. Über die letzten Jahre haben Experimente mit embryonalen und adulten Stammzellen gezeigt, dass Stammzellen viele der Anforderungen erfüllen, die für eine Regeneration des Nervensystems nötig sind. Schon seit mehreren Jahren ist es möglich, Neuronen aus Stammzellen zu generieren. Doch die Differenzierung in spezifische Neuronentypen konnte erst vor kurzem, anhand der Produktion von dopaminergen Nervenzellen, gezeigt werden. Hier beschreiben wir die Etablierung eines Zellkultursystems, in welchem aus multipotenten, neuralen Vorläuferzellen der Kleinhirnanlage, Purkinjezellen und Körnerzellen produziert werden können. Doch um das Nervensystem erfolgreich zu reparieren, reicht es nicht, verschiedene Zelltypen zu generieren. Die Zellen müssen einerseits nach der Implantation überleben und sich andererseits richtig in das bereits bestehende, neurale Netzwerk einfügen. Aus diesem Grund ist es notwendig, Prozesse der terminalen Differenzierung in postmitotischen, bereits determinierten Zellen zu studieren. Die dabei betrachteten Prozesse sind von der dreidimensionalen Struktur des Nervensystems abhängig und können somit *in vitro* nur bedingt analysiert werden. Mittels konditionaler knock-out Technologie kann die Funktion von Genen in bestimmten Zellen, zu bestimmten Zeitpunkten *in vivo* untersucht werden. Aus diesem Grund haben wir transgene Mäuse hergestellt, welche

die Cre-Rekombinase in postmitotischen Neuronen exprimieren. Mit Hilfe dieser Calbindin-Cre Mäuse kann die Genfunktion in Purkinjezellen, aber auch in postmitotischen Neuronen anderer Hirnstrukturen analysiert werden. Um die Funktion von Notch1 in Purkinjezellen zu untersuchen haben wir Mäuse, bei welchen das erste kodierende Exon von Notch1 mit loxP Sequenzen flankiert ist, mit den Calbindin-Cre Tieren gekreuzt. Zudem haben wir die Expressionsmuster verschiedener Komponenten der Notch Signalkaskade beschrieben, was die Analyse der doppeltransgenen Tiere erleichtern soll.