

**Modulation of cell death
in cultured cerebellar granule neurons
by cytokines and growth factors**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZUERICH
for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
Ariane Myriam de Luca
Dipl. Biol. University of Neuchâtel
born 14.9.1962
citizen of Neuchâtel (CH)

Accepted on the recommendation of :

Prof. Dr. J.-C. Perriard, examiner
Prof. Dr. A. Fontana and Prof. Dr. U. Suter, co-examiners

1 Zusammenfassung

Die Entwicklung des Zentralnervensystems beinhaltet die Entstehung verschiedener neuronalen Zelltypen. Dieser Prozess wird zumindest teilweise von sezernierten Faktoren gesteuert, deren Expression genetisch festgelegt ist. Diese Faktoren, beispielweise Zytokine oder Wachstumsfaktoren, haben Auswirkungen auf Zellwachstum, Differenzierung, synaptische Plastizität und Ueberleben der Zellen. Der neuronale Zelltod, an dessen Regulation die Zytokine und Wachstumsfaktoren wesentlich beteiligt sind, spielt eine entscheidende Rolle während der neuronalen Entwicklung. Das Absterben von Neuronen nach der Entwicklung des Nervensystems dagegen ist eine pathologische Erscheinung. Beobachtungen in Tiermodellen weisen auf die Bedeutung von beiden Apoptose and/oder Nekrose in chronischen neurodegenerativen Erkrankungen so wie in akuten Gehirnschädigungen hin, bei denen eine erhöhte Zytokin- und Wachstumsfaktorexpression im betroffenen Gewebe und in den Körperflüssigkeiten gemessen werden kann.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, den Einfluss verschiedener Zytokine and Wachstumsfaktoren auf den Zelltod von differenzierten Neuronen und deren unreifen Vorläuferzellen zu charakterisieren. Dazu wurden zwei *in vitro* Modellen verwendet, mit deren Hilfe die verschiedenen Arten des neuronalen Zelltodes, Apoptose, der programmierte Zelltod, und exzitotoxischer Nekrose, ein passiver degenerativer Prozess, untersucht werden können. Apoptose wurde durch eine tiefe extrazelluläre Kaliumkonzentration (5 mM) sowohl in Kulturen differenzierter Neuronen als auch in Kulturen deren Vorläuferzellen induziert. Dazu dienten Primärkulturen postnataler zerebellärer Neuronen von sieben Tagen alten Ratten, deren Kulturkomposition, Anforderungen an Kulturbedingungen und *in vitro* Differenzierungsverlauf gut bekannt sind. Diese sind zu diesem Zeitpunkt noch undifferenziert und somit hochempfindlich für Apoptose induzierende Signal, können aber in Kultur differenziert werden.

Es wurde festgestellt, dass tumor-necrosis factor- α (TNF- α), leukemia inhibitory factor (LIF), ciliary neurotrophic factor (CNTF), interleukin-10 (IL-10) und interleukin-13 (IL-13) das Ueberleben unreifer Neuronen verlängern, während transforming-growth factor- β (TGF- β) und brain-derived neurotrophic factor (BDNF) deren apoptotischen Tod

beschleunigen. Die Wirkungen dieser Zytokine and Wachstumsfaktoren sind spezifisch für unreife neuronale Vorläuferzellen in dieser bestimmten Entwicklungsstufe, bei *in vitro* differenzierten Neuronen haben sie keinen solchen Einfluss. Auf den durch exzitotoxische Konzentrationen an Glutamat induzierten nekrotischen Zelltod konnte in differenzierten Neuronen ein Einfluss dieser Zytokine und Wachstumsfaktoren ebenfalls nicht gefunden werden. Der antiapoptotische Effekt von TNF- α , LIF, CNTF, IL-10 und IL-13 beruht wieder auf einer Erhöhung der Bcl-2 Expression, noch antagonisieren diese Zytokine die proapoptotische Wirkung von TGF- β and BDNF.

Differenzierte und unreife zerebelläre Neuronen sezernieren TGF- β , dessen biologische Aktivität allerdings unklar bleibt. So konnte keine Korrelation zwischen der Sezernierungskinetik der TGF- β und dem Überleben der Neuronen *in vitro* gefunden werden. Auch neutralisierende anti-TGF- β Antikörper waren nicht in der Lage, Apoptose zu verhindern.

Diese Resultate deuten auf eine reifungsabhängige Regulation des Überlebens von zerebellären Neuronen durch Zytokine und Wachstumsfaktoren, die in einem bestimmten zeitlichen Muster während der Entwicklung des Säugtiergehirns exprimiert sind, hin.

2 Summary

The variety of cell phenotypes found in the nervous system arises, in part, through the action of epigenetic differentiation signals. Secreted signals such as cytokines and growth factors have broad effects on cell proliferation, differentiation and survival, and on synaptic plasticity. The recognition of these factors as mediators in the development and pathology of the nervous system was based in their involvement in programmed cell death. Neuronal cell loss during development is the expression of a physiological program, while neuron degeneration in adult tissues is the sign of a pathological state. Observations in experimental animals have implied both apoptosis, a controlled differentiative process, and/or necrosis, a passive cell degeneration, in chronic neurodegenerative disorders and in acute insults of the CNS, wherein increased tissue expression and circulating concentrations of cytokines and growth factors can be measured.

The present work was aimed at investigating cytokines and growth factors for their ability to modulate neuronal death *in vitro*, in the two defined types of cell death, excitotoxic necrosis and apoptosis induced by potassium deprivation in either a *in vitro* differentiated or an immature phenotype. Primary cultures of postnatal cerebellar granule neurons offer a well-studied model in terms of culture composition, *in vitro* trophic requirements and maturation. Since programmed cell death of cerebellar granule neurons *in vivo* is most prominent during the second and third week postnatally, neuroblasts harvested at postnatal day 7 for *in vitro* studies represent an immature neuronal precursor population that is highly susceptible to apoptosis.

We found that tumor-necrosis factor- α (TNF- α), leukemia inhibitory factor (LIF), ciliary neurotrophic factor (CNTF), interleukin-10 (IL-10) and interleukin-13 (IL-13) prolong survival of immature granule neurons, whereas transforming-growth factor- β (TGF- β) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) accelerated cell death. The actions of these cytokines and growth factors are specific for immature granule neurons at this specific stage of development. No such effects are observed when the same neurons are first allowed to differentiate *in vitro* and then induced to undergo apoptosis. When testing the cytokines and growth factors for their capacity to alter glutamate receptor-mediated excitotoxicity of differentiated cerebellar granule neurons, no significant effect is observed either. The antiapoptotic effect of TNF- α , LIF, CNTF, IL-10 and IL-13 does not involve

modulation of bcl-2 protein expression and these cytokines do not antagonize the action of the proapoptotic growth factors TGF- β and BDNF. Differentiated and immature granule neurons secrete latent, but not biologically active, TGF- β . However, no correlation can be drawn between the secretion kinetics and the neuron viability *in vitro*. Moreover, apoptosis of the immature neurons is not due to an activation by the cells of latent TGF- β , since neutralizing antibodies against TGF- β fail to prevent apoptosis and even to enhance survival.

These data appear to define a maturation-dependent modulation of cerebellar granule neuron survival by cytokines and growth factors that are expressed in a developmental pattern in the mammalian brain.