

Diss ETH No. 17279

**Analysis of the Role of the Y-box Binding Protein CsdA in PNS Proliferation
and Differentiation**

and

Generation of a Pmp22-CreERT2 Transgenic Mouse

A dissertation submitted to the
ETH Zurich

for the degree of Doctor of Science

presented by

François Castagner, M. Sc.

Master es Sciences Université du Québec

born April 28, 1976

citizen of Canada

Accepted on the recommendation of

Prof. Ueli suter, Examiner

Prof. Sabine Werner, co-examiner

Dr. João Bettencourt Relvas, co-examiner

2007

1 Summary

Csda/ZONAB/dbpA is a regulatory protein that belongs to the Y-box binding family of dual action regulators, known to bind both DNA and RNA. It was shown that *Csda* represses the transcription of the *ErbB2* gene and induces the transcription of the *CycD1* and *PCNA* gene in MDCK cells (Balda and Matter, 2000; Sourisseau *et al.*, 2006). In the same cells, *Csda* also binds to Cdk4 and controls its subcellular localization and will, by this mean, inhibit the proliferation of confluent MDCK layers (Balda *et al.*, 2003). In addition, *Csda* binds to and inhibits the translation of *Protamine* mRNA in spermatid cells, and thus inhibits their final differentiation (Giorgini *et al.*, 2001; Giorgini *et al.*, 2002). Yet, the knowledge about this multifunctional protein remains fragmentary and its role in the nervous system is unknown. The aim of this project was to gain insights into the role of *Csda* in the developing nervous system with a particular focus on Schwann cell proliferation and differentiation control.

To achieve this aim, we are generating a conditional *Csda* KO mouse by flanking exon 1 with *loxP* sites. The targeting construct was cloned and electroporated and chimeric mice were obtained and are now being bred.

The *Csda* expression pattern was also assessed in the embryonic nervous system. *Csda* expression was found in undifferentiated emigrating neural crest cells, in the Sox2-expressing neuroepithelial cells and in the dorsal root ganglia sensory neurons of the mouse embryo. *In vitro* neural crest cells also express *Csda* when they are undifferentiated and when they are *in vitro* differentiated into neurons. In contrast, cultured neural crest cells differentiated in smooth muscle cells or immature Schwann cells loose expression of *Csda*.

At later stages, *Csda* expression seems to come back in Schwann cells as expression of *Csda* could be detected in the Schwann cells of the sciatic nerves 2 days after birth when these cells are not fully differentiated and proliferating. *Csda* protein levels in sciatic nerves then decline as the Schwann cells undergo differentiation, and the protein is barely detectable in the adult. Interestingly, *Csda* is upregulated in the Schwann cells of the distal peripheral nerve after an injury when Schwann cells dedifferentiate and proliferate again.

Loss-of-function and gain-of-function experiments in secondary Schwann cell cultures using RNA interference and overexpressing adenovirus vectors were also performed. No effect on Schwann cell proliferation and differentiation could be observed.

In order to be able to analyze the impact of the *Csda* deletion in the peripheral nervous system, a tool to allow recombination of *loxP* sites specifically in the peripheral nervous system has been developed. We therefore generated and characterized a transgenic mouse that expresses the tamoxifen-inducible Cre recombinase (CreERT2) under the control of the *Pmp22* promoter to allow CreERT2 expression in the Schwann cells and the peripheral nervous system sensory neurons.

2 Résumé

Csda/ZONAB/dbpA est une protéine régulatrice de la famille des facteurs Y-box pouvant lier à la fois l'ADN et l'ARN. Il a été démontré que Csda réprime la transcription du gène *ErbB2* et active la transcription de cyclin D1 et PCNA. Csda peut aussi lier l'ARN messager du gène de la protamine et réprimer sa traduction dans les spermatozoïdes, inhibant ainsi leur différenciation finale. Une fonction supplémentaire dans le contrôle de la localisation subcellulaire de Cdk4 a aussi été décrite dans la lignée cellulaire épithéliale MDCK. Les connaissances à propos de cette protéine restent fragmentaires et un rôle potentiel dans le système nerveux n'a pas été décrit et reste donc à définir. Le but de ce projet est de faire la lumière sur le rôle de cette protéine dans le système nerveux lors de son développement, avec une attention particulière aux cellules de Schwann et au contrôle de leur prolifération et de leur différenciation.

Pour parvenir à ces fins, des travaux sont actuellement en cours pour pouvoir inactiver ce gène spécifiquement dans le tissu désiré et au moment jugé opportun. Le premier exon du gène Csda a été flanqué de sites *LoxP* et des souris chimériques ont été obtenues et sont actuellement en période d'accouplement.

Le profil d'expression de Csda a également été établi dans le système nerveux embryonnaire. L'expression de Csda a été observée dans les cellules neuroépithéliales exprimant Sox2 ainsi que dans les cellules de la crête neurale non différenciées. Les neurones sensoriels dérivés des cellules de la crête neurale expriment également Csda *in vivo* et *in vitro*. L'expression de Csda semble être fortement réduite quand les cellules de la crête neurale se différencient en cellules précurseur de cellules de Schwann.

Il semble toutefois que l'expression de Csda dans les cellules de Schwann réapparaît à des stades plus avancés du développement, car Csda est exprimé dans les cellules de Schwann périnatales alors qu'elles prolifèrent encore. Les niveaux d'expression diminuent toutefois lors de la formation de la gaine de myéline. Mais si le nerf sciatique est endommagé et les cellules de Schwann se dé-différencient et ré-intègrent le cycle cellulaire, l'expression de Csda est induite à nouveau.

Les niveaux d'expression de *Csda* ont été modulés à l'aide de vecteurs adénoviraux pour tenter d'établir la fonction de cette protéine dans des cellules de Schwann en culture. Aucun effet sur la prolifération ou sur les niveaux d'expression de gènes candidats, incluant cyclin D1 et P0 n'a pu être observé dans des cellules surexprimant *Csda*, ni dans des cellules où l'expression de *Csda* a été inhibée à l'aide de l'interférence par ARN.

Afin de pouvoir analyser l'impact de la délétion de *Csda* dans le système nerveux périphérique, un outil a été généré pour permettre l'induction de la recombinaison de sites *loxP* spécifiquement dans le système nerveux périphérique. Une souris transgénique exprimant une forme de la recombinaise Cre inducible par le tamoxifène (CreERT2) spécifiquement dans le système nerveux périphérique a été construite et le profil de recombinaison a été établi. Pour permettre une expression de la recombinaise dans le système nerveux périphérique, le promoteur du gène *Pmp22* a été utilisé. Cette souris permet la recombinaison dans les cellules de Schwann et les neurones du système nerveux périphérique suite à l'injection de tamoxifène.