



Doctoral Thesis

Probing and manipulating regional progenitor heterogeneity in the postnatal subventricular zone

Author(s):

Fischer, Bruno

Publication Date:

2015

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010387138> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH N° 22474

**PROBING AND MANIPULATING REGIONAL
PROGENITOR HETEROGENEITY IN THE
POSTNATAL SUBVENTRICULAR ZONE**

a thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES OF ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by
BRUNO FISCHER
M.Sc. in Human Biology, University of Zurich
born on 27.01.1985
citizen of Untervaz GR

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Martin E. Schwab, examiner
PD Dr. Olivier Raineteau, co-examiner
Prof. Dr. Ueli Suter, co-examiner

2015

Summary

The brain is a surprisingly plastic organ that constantly undergoes internal structural as well as functional changes. Initially, the development of the nervous system comprises the generation of neurons and glial cells ensuing the elaboration of complex circuits. Subsequent postnatal experiences further modify these initial structures in an activity dependent manner and therefore allow adapting to a steadily changing environment. Although these anatomical and physiological changes are most pronounced in early life stages called critical periods, they still occur throughout adulthood. Admittedly, these modifications are more strikingly in synapse plasticity but nonetheless are also present in circuit plasticity and even postnatal neurogenesis, where new neurons are born constantly after birth. However, when these environmental changes occur too abrupt for the brain to react appropriately, as it is the case for neurodegenerative disorders including abnormalities such as strokes or head injuries or more progressively worsening diseases like Alzheimer or Parkinson, the brain's physiological regeneration plasticity faces its limitations. Therefore, the brain's rather unique helplessness paired with its systemic importance strongly requires intense research to favor functional improvement following these devastating disorders.

Not long ago, adult neurogenesis in the mammalian central nervous system was deemed impossible. Recent inquests however proved the existence of neural stem cells and the constant formation of new neurons in postnatal mammals including humans, even in old age. However, postnatal and adult neural stem cells are confined to two highly specialized regions, the hippocampal dentate gyrus and the subventricular zone lining the lateral ventricles. In the latter case, representing the larger germinal zone, newborn cells undergo several rounds of proliferation before they migrate along a defined path towards the olfactory bulb, where they terminally differentiate into a variety of neuronal subtypes and functionally integrate into pre-existing networks. Recent evidence suggests that distinct cellular subtypes emerge from particular subventricular zone microdomains exhibiting region-specific features that define the neural stem cell's competence to acquire a specific fate.

Thus, the present thesis aimed at investigating in detail the heterogeneous nature of the postnatal subventricular zone and further probed neural stem cell competence by microdomain specific modulation of intrinsic transcription factors as well as extrinsic signaling cues. **Chapter 1** summarizes and discusses the current knowledge on how the remarkable diversity of cell types arises during embryonic brain development and highlights to what extent prenatal regional neural stem cell heterogeneity is continued to postnatal stages, before it debates about neural stem cell competence restriction over time and comments on ways to manipulate it. **Chapter 2** aims at investigating more in depth this postnatal germinal niche heterogeneity. Following microdissection of distinct subventricular zone microdomains, neural stem cells and their immediate progeny, the transient amplifying progenitors, were isolated according to their cell type specific marker expression profile. Subsequent whole genome transcriptome analysis revealed major differences among neural stem cells as well as in between transit amplifying progenitors derived from distinct microdomains. Noteworthy, intrinsic transcription factors as well as extrinsic signaling molecules were identified as major players in sustaining this variety. **Chapter 3** demonstrates intrinsic Class I bHLH transcription factors (i.e. E-proteins) to be overexpressed within germinal forebrain regions and thus investigates more in detail their significance within the complex regulatory network that controls postnatal subventricular zone neurogenesis. Indeed, *in vivo* overexpression of a dominant-negative form of the E-protein member E47 suggested the bHLH transcriptional network to act prominently in regulating postnatal forebrain neurogenesis. Gain-of-function and loss-of-function experiments using *in vivo* electroporation in neonatal pups further consolidated the importance of E-proteins in orchestrating neurogenesis progression, whereas enhanced E-protein expression resulted in accelerated NSC/progenitor differentiation. **Chapter 4** examines more closely the role of dorsally enriched Wnt/ β -catenin signaling in regulating neural stem cell fates derived from this distinct germinal niche microdomain. It transpires that glutamatergic neuronal and oligodendroglial precursors derive from the dorsal subventricular zone wall under the control of Wnt/ β -catenin, since genetic and pharmacological *in vivo* modulation of Wnt/ β -catenin changed their fate, as assessed by an alteration in early lineage marker expression of dorsally derived progenitors. More precisely, gain-of-function attempts on Wnt/ β -catenin resulted in an increased differentiation of dorsally resided neural stem cells towards glutamatergic neuronal or oligodendroglial fates, at the expense of GABAergic precursors, whereas loss-of-function experiments led to opposite effects. Finally, **Chapter 5** summarizes the

findings obtained during the course of this thesis and, based on the same, provides a concise outlook on possible lines of research to be followed. Further, it discusses the necessity of single cell based applications to comprehensively elucidate the inter- as well as intra-regional differences within the postnatal subventricular zone, as it was already successfully applied to dissect heterogeneity of many other tissues before. On one hand side, findings presented in this thesis suggest neural stem cells to be more diverse than previously anticipated, adding to the complexity of neurogenesis progression in the mammalian forebrain. On the other hand, they demonstrate that neural stem cell competence restriction is not immutable, but can be readily manipulated by means of intrinsic transcription factors or extrinsic signaling cues, further implying a still persistent inherent plasticity of the postnatal and adult central nervous system. Altogether, these results contribute to a better understanding of the postnatal subventricular zone neurogenic niche and may help to develop novel therapeutical approaches to treat neurodegenerative diseases.

"In the adult centers, the nerve paths are something fixed, ended, and immutable. Everything may die, nothing may be regenerated..."

...It is for the science of the future to change, if possible, this harsh decree."

Santiago Ramón y Cajal, 1928

Zusammenfassung

Das Gehirn ist ein überraschend plastisches Organ, das sich konstant internen strukturellen sowie auch funktionellen Änderungen unterzieht. Neuronen und Gliazellen bilden während der Embryonalentwicklung das äusserst komplexe zentrale Nervensystem. Spätere postnatale Erfahrungen können diese ursprüngliche Struktur aktivitätsabhängig beeinflussen. Dies erlaubt dem Organismus sich an eine verändernde Umwelt anzupassen. Auch wenn solche anatomischen und physiologischen Neuerungen in sogenannten kritischen Perioden kurz nach der Geburt eher wahrscheinlich sind, treten sie in einem gewissen Masse auch im Erwachsenenalter auf. Dort bildet die synaptische Plastizität die prägnanteste Form dieser Modifikationen. Jedoch können solche Änderungen auch von der Schaltkreisebene oder vom Bereich der postnatalen Neurogenese, wo auch nach der Geburt noch konstant neue Neuronen generiert werden, herrühren. Nichtsdestotrotz erreicht die physiologische Regenerationsskapazität des Gehirns seine Grenzen, wenn Umwelteinflüsse zu abrupt auftreten. So ist es zum Beispiel der Fall bei akuten neurodegenerativen Störungen, wie Schlaganfällen oder Kopfverletzungen sowie auch bei sich stufenweise verschlechternden Krankheitsbildern wie Alzheimer oder Parkinson. Die einzigartige Hilflosigkeit des Gehirns gepaart mit seiner systemischen Bedeutung verlangt deshalb nach intensiver Forschung im Bereich der zellulären Regeneration um solchen verheerenden Erkrankungen entgegenzuwirken.

Vor nicht allzulanger Zeit wurde adulte Neurogenese als unmöglich erachtet. Neuere Untersuchungen belegen jedoch die Existenz von neuronalen Stammzellen und die konstante Reproduktion von neuen Neuronen in postnatalen Säugetieren, einschliesslich des Menschen, bis ins hohe Alter. Allerdings sind postnatale und adulte neuronale Stammzellen auf den hippocampalen gyrus dentatus und die subventrikuläre Zone entlang der lateralen Ventrikel begrenzt, zwei äusserst spezialisierte Hirnareale, wobei Letztere die grössere der beiden Stammzellnischen repräsentiert. Nach einigen Proliferationsrunden migrieren neugeborene Zellen entlang des rostralen Migrationsstroms zum bulbus olfactorius, dem Riechkolben im zentralen Nervensys-

tem, wo sie zu verschiedenen Subtypen ausdifferenzieren und sich funktionell in ein bereits bestehendes Netzwerk integrieren. Jüngste Untersuchungen haben ergeben, dass verschiedene Zelltypen von unterschiedlichen Regionen der subventrikulären Zone entstammen. Dies wiederum deutet darauf hin, dass verschiedene Domänen regionen-spezifische Eigenschaften besitzen, welche die Wahrscheinlichkeit neuronaler Stammzellen zu einem spezifischen Subtyp heranzureifen, beeinflusst.

Die vorliegende Dissertation untersuchte die Heterogenität der postnatalen subventrikulären Zone und prüfte zudem inwiefern die Kompetenz neuronaler Stammzellen beeinflusst werden kann, wenn einerseits intrinsische Transkriptionsfaktoren und andererseits extrinsische Signalkaskaden regionen-spezifisch moduliert werden. **Kapitel 1** fasst das derzeitige Wissen über die erstaunliche Diversität von Zelltypen zusammen, die während der embryonalen Hirnentwicklung entstehen, und diskutiert in welchem Ausmass die regionale Stammzellheterogenität, wie sie im prenatalen Organismus beobachtet wird, in postnatalen Stadien weiterbesteht. Anschliessend wird über die Einschränkung der Kompetenz mit zunehmendem Alter debattiert, wobei mögliche Ansätze kommentiert werden um diesen Umstand zu ändern. **Kapitel 2** beschäftigt sich detaillierter mit der postnatalen Heterogenität der subventrikulären Stammzellnische. Nach Isolation der einzelnen Subregionen wurden die neuronalen Stammzellen und ihre direkten Nachkommen, die proliferierenden Progenitorzellen, mit Hilfe von zellspezifischen Antigenen einer genomweiten Transkriptomanalyse unterzogen, die wesentliche Unterschiede in der Genexpression zwischen den verschiedenen Regionen offenbarte. Differenzen betrafen vorwiegend intrinsische Transkriptionsfaktoren und Elemente extrinsischer Signalkaskaden. **Kapitel 3** zeigt auf, dass intrinsische bHLH Transkriptionsfaktoren der Klasse I (i.e. E-proteine) in neurogenen Nischen überexprimiert sind, weshalb weitere Untersuchungen betreffend deren Signifikanz im komplexen Netzwerk, das die postnatale Neurogenese in der subventrikulären Zone kontrolliert, vorgenommen wurden. Überexprimierung einer dominant-negativen Form des E-proteins E47 hat gezeigt, dass bei der Regulation der postnatalen Neurogenese das Netzwerk von bHLH Transkriptionsfaktoren von äusserster Wichtigkeit zu sein scheint. Zusätzliche Funktionsgewinn- und Funktionsverlustexperimente mittels *in vivo* Elektroporation in neonatalen Mäusejungen haben die Bedeutung von E-proteinen für einen ordentlichen Neurogeneseverlauf gefestigt, wobei eine erhöhte E-proteinexpression die Beschleunigung der Stammzellendifferenzierung zur Folge hatte. **Kapitel 4** erläutert etwas näher die Rolle von dorsal angereichertem Wnt/ β -catenin in der Regulierung von Zellsubtypen, die dieser Dom-

äne entspringen. Mittels genetischer und pharmakologischer *in vivo* Modulation wurde gezeigt, dass vermehrt glutamaterge Neuronen und Oligodendrozyten aus der dorsalen Wand der lateralen Ventrikel entstehen, wenn Wnt/ β -catenin überreguliert wurde. Gleichzeitig führte dies zu einer verringerten Anzahl an GABAergen Progenitorzellen. Die Hemmung von Wnt/ β -catenin hingegen, hatte umgekehrte Effekte. Zum Schluss fasst **Kapitel 5** nochmals die wichtigsten Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit zusammen und skizziert einige weiterführende Experimente, die meines Erachtens, basierend auf den beschriebenen Ergebnissen, verfolgt werden sollten. Zudem wird die Notwendigkeit von Applikationen besprochen, die Analysen einzelner Zellen erlauben um nicht nur inter- sondern auch intra-regionalen Unterschieden der subventrikulären Zone auf den Grund zu gehen, wie sie ähnlich schon für andere Gewebetypen angewendet wurden.

Erkenntnisse, die im Rahmen dieser Doktorarbeit gewonnen wurden, suggerieren einerseits, dass neuronale Stammzellen heterogener sind als ursprünglich angenommen und andererseits demonstrieren sie, dass die eingeschränkte Kompetenz im Alter keinesfalls unveränderlich ist, sondern mit Hilfe von intrazellulären Transkriptionsfaktoren oder auch extrazellulären Signalmolekülen manipuliert werden kann, was wiederum eine gewisse verbleibende Plastizität des adulten Zentralnervensystems impliziert. Insgesamt tragen die Resultate dieser Arbeit zu einem besseren Verständnis der postnatalen subventrikulären Zone bei und helfen möglicherweise bei der Entwicklung neuer Therapien gegen Krankheiten neurodegenerativen Ursprungs.

*"Im erwachsenen Gehirn sind die Nervenbahnen
starr und unveränderlich. Alles kann sterben,
aber nichts kann regenerieren...."*

*...Es obliegt der Wissenschaft der Zukunft
diesen Umstand, wenn möglich, zu ändern."*

Santiago Ramón y Cajal, 1928