



Doctoral Thesis

Conditional ablation of Notch1 from the vertebrate central nervous system

Author(s):

Lütolf, Simone

Publication Date:

2002

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004370521> →

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 No. 14627

Conditional Ablation Of Notch1 From The Vertebrate Central Nervous System

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

for the degree of
Doctor of Natural Science

presented by
Simone Lütolf

dipl.sc.nat.
Swiss Federal Institute of Technology (ETH), Zürich, Switzerland
Born May 9, 1973 in Zürich, Switzerland
Citizen of Switzerland

Accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Ueli Suter, examiner
Prof. Dr. Martin Schwab, coexaminer
Dr. Verdon Taylor, coexaminer

2002

SUMMARY

Central nervous system (CNS) development is difficult to study because of the immense complexity of the brain. The cerebellum is an excellent model system to study CNS neurogenesis due to its well defined developmental and anatomical structure, and because of the stage-specific differentiation markers that are available (Hatten et al., 1997 and references therein; Hatten, 1995). Furthermore, the fact that major cerebellar defects are compatible with life facilitates the use of conditional gene ablation techniques to target gene manipulations to the cerebellar primordium.

Notch signaling molecules have been shown to be involved in developmental decisions in many tissues during invertebrate development through a process of lateral inhibition (Kimble and Simpson, 1997). Members of the Notch family are transmembrane EGF-domain containing receptors that interact with transmembrane ligands Delta or Serrate, which are expressed by neighboring cells. During development of the *Drosophila* peripheral sensory organ, Notch-Delta signaling selects a single precursor cell from the equivalent group of proneural cluster cells (Heitzler and Simpson, 1991; Muskavitch, 1994). This cell downregulates expression of Notch, which relieves a repression and the cell will adopt the neuronal fate and initiate neurogenesis (reviewed in (Simpson, 1990). In the mouse four Notch-related genes have been identified with wide ranging expression patterns. Three Notch genes are expressed in the developing mouse CNS, Notch1-3. However, Notch1 is the most prominently expressed in undifferentiated cells of the embryonic neural tube. Conventional gene ablation by targeted gene inactivation experiments have been performed in order to address the role of Notch1 in mouse development (Conlon et al., 1995; Swiatek et al., 1994). However, the mutation results in

a fatal phenotype at embryonic day 9.5. Notch1 starts to be expressed at around E9 in the neural tube neuroepithelial cells. Hence, limited information was derived from the Notch1-deficient mouse concerning the role of Notch1 in neurogenesis and the fate of the Notch1-deficient neuroepithelium. We have generated a conditional ablation of the Notch1 gene from the mouse neural tube neuroepithelial cells using the Cre-Lox system to address the role of Notch1 in neurogenesis and the fate of the Notch-deficient cells. Our results show that Notch1 regulates the onset of neurogenesis in the vertebrate CNS and Notch1-deficient neuroepithelial cells induce aberrant neurogenic programs. Contrary to expectations, the Notch1-deficient differentiating cells are unable to enter the neuronal lineage and undergo programmed cell death. The consequence of the mutation, in contrast to loss of Notch function mutations in *Drosophila*, is a reduction in the number of neurons in the adult CNS.

Not only the neuroepithelial cells of the midbrain/hindbrain region are under the control of Notch1, but also the adult neural stem cells isolated from the subventricular zone of the adult mouse brain. We have shown that Notch1 is important for the maintenance of adult neural stem cells and unlike previous reports where Notch1 has been claimed to promote gliogenesis (Furukawa et al., 2000; Gaiano et al., 2000), we demonstrate that Notch1 is not intrinsically required for the formation of glial cells. We hypothesise that Notch1 acts as a molecular "brake" on differentiation. Notch1 keeps the multipotent cells in an undifferentiated state and thereby controls their response to differentiation signals. To be able to force stem cells to adopt a neuronal fate rather than a glial fate by downregulating Notch1 might be a beneficial option in CNS repair.

ZUSAMMENFASSUNG

Das Zentralnervensystem (ZNS) entwickelt sich durch die kontrollierte Abfolge verschiedener komplexer Prozesse. Da der laminaire Aufbau des Cortex mit seinen zahlreichen Zelltypen sehr kompliziert ist, hat sich unser Labor entschlossen, sich auf die Entwicklung des Cerebellums (Kleinhirn) zu konzentrieren. Diese Struktur hat einige Vorteile für das Forschen an Prozessen in der Entwicklung des ZNS auf molekularer und zellulärer Ebene im Vergleich zum Cortex. Das Kleinhirn ist eine relativ einfache Struktur mit laminaem Aufbau, bestehend aus nur fünf neuronalen Zelltypen, wovon Körnerzellen und Purkinje Zellen die wichtigsten sind (Alder et al., 1996; Altman and Bayer, 1985b). Molekulare Marker, die die verschiedenen Zelltypen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien beschreiben, sind bekannt und erleichtern die Analyse von Differenzierungsvorgängen (Hatten et al., 1997; Hatten and Heintz, 1995). Hinzu kommt, dass das Kleinhirn keine lebensnotwendige Struktur ist und somit auch Gene, die in der Entwicklung eine wichtige Rolle spielen, abgeschaltet werden können, ohne dass dies zum Tode des Versuchstiers führen würde, selbst wenn sich das Kleinhirn nicht mehr entwickeln könnte.

Ein solches Molekül, das eine wichtige Rolle in der frühen Entwicklung des ZNS spielt, haben wir untersucht. Notch1 ist ein transmembraner Rezeptor, der im Neuroepithel der Kleinhirnanlage (Isthmus Region) in der frühen Embryogenese (E9) exprimiert ist. Aus Studien über die Entwicklung der Fruchtfliege *Drosophila* ist bekannt, dass Notch bei der Entscheidung darüber, wie sich multipotente Zellen mit gleichem Differenzierungspotential weiterentwickeln, involviert ist (Kimble and Simpson, 1997). Die Auswahl der Zelle, die zu einem Neuron ausdifferenziert, wird über den Prozess der

lateralen Inhibition gesteuert (Kimble and Simpson, 1997). Die auserwählte Zelle exprimiert den Liganden von Notch, Delta oder Serrate. Die benachbarte Zelle hingegen exprimiert den Rezeptor Notch und wird zu einer Epithelzelle. Die Neurogenese ist in dieser Zelle durch den Rezeptor Notch blockiert (Heitzler and Simpson, 1991; Muskavitch, 1994; reviewed in Simpson, 1990).

Bis jetzt wurden vier Notch Rezeptoren in Säugetieren gefunden, die mit den Liganden Delta oder Jagged auf benachbarten Zellen interagieren. Notch1-3 sind im zentralen Nervensystem exprimiert. Wir haben uns auf Notch1 konzentriert, da dieser Rezeptor in den multipotenten Neuroepithelzellen der Kleinhirnanlage stark exprimiert ist und somit in Vertebraten eine ähnliche Rolle in der Regulation der Neurogenese spielen könnte wie in *Drosophila* (Coffman et al., 1990; Del Amo et al., 1992; Lardelli et al., 1994; Lardelli and Lendahl, 1993; Stifani et al., 1992; Weinmaster et al., 1991). Um die Funktion von Notch1 in der Entwicklung des zentralen Nervensystems in Säugetieren zu studieren, wurden Notch1 *knock-out* Mäuse generiert (Conlon et al., 1995; Swiatek et al., 1994). Diese sterben aber schon früh in der Entwicklung (E9.5), so dass die Funktion von Notch1 während der ganzen Entwicklung des Kleinhirns nicht ausreichend studiert werden kann. Aus diesem Grund haben wir einen konditionalen *knock-out* mit Hilfe des Cre-Lox Systems gemacht, der uns ermöglicht, die Notch1 Expression spezifisch aus der Isthmus-Region ab E9 auszuschalten. Die Mäuse überleben und zeigen keinen offensichtlichen Phänotyp. Doch eine detaillierte Studie auf zellulärer Ebene hat gezeigt, dass Zellen mit fehlendem Notch1 Gen frühzeitig zu Vorläuferzellen von Neuronen (Purkinje Zellen und Körnerzellen) ausdifferenzieren und anschliessend in diesem Stadium absterben, was zu einer reduzierten Anzahl an Neuronen im ausgewachsenen Cerebellum der Maus führt. Notch1 kontrolliert also den Zeitpunkt, wann Zellen auf die Faktoren in der Umgebung, in diesem Fall neurogene Faktoren, reagieren können. Kürzlich erschienen einige Publikationen, die die Hypothese aufstellten, dass Notch1 die Zellen nicht nur in einem undifferenzierten Zustand behalten, sondern sogar Gliogenese fördern würde (Furukawa et al., 2000; Gaiano et al., 2000). Um dieser Interpretation nachzugehen, haben wir adulte neurale Stammzellen, die Notch1 exprimieren und daher vermutlich auch unter der Kontrolle von Notch1 stehen, aus der Ventrikularzone des Vorderhirns isoliert und ihr Differenzierungspotential *in vitro* überprüft. Adulte neurale Stammzellen isoliert aus unseren Notch1 *knock-out* Mäusen sind fähig, gliale Zellen zu

produzieren. Notch1 ist demnach nicht notwendig für die Produktion und das Überleben von glialen Zellen. Diese Resultate führten uns zu der Hypothese, dass vielleicht die Funktion von Notch1 auf multipotente Zellen eher mit einer molekularen "Bremse" zu vergleichen ist. Dabei bestimmt Notch1 wann eine Zelle kompetent ist, auf Differenzierungssignale in der Umgebung zu reagieren. Ist Notch1 inaktiv und erlaubt die Umgebung Neurogenese, werden die Zellen zu Neuronen. Sind jedoch gliale Signale vorhanden und Notch1 ist inaktiviert, werden die Zellen zu Glia.

Diese Resultate unterstützen unsere Hypothese, dass Notch1 in Vertebraten, im Gegensatz zur Funktion in der *Drosophila*, nicht für das Auswahlverfahren der undifferenzierten Zellen verantwortlich ist. Die Differenzierungssignale in der Umgebung entscheiden, was aus den jeweiligen Zellen geschieht, sobald Notch1 zulässt, dass die Zellen auf die extrinsischen Faktoren reagieren können.