

# Conditional ablation of Numb from the vertebrate central nervous system

**Doctoral Thesis**

**Author(s):**

Klein, Anne Laurence

**Publication date:**

2004

**Permanent link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004713115>

**Rights / license:**

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

Diss. ETH No. 15446

# **Conditional Ablation Of Numb 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  
**Anne Laurence KLEIN**

dipl.sc.nat.  
Swiss Federal Institute of Technology (ETH), Zürich, Switzerland  
Born October 6, 1976 in Luxembourg  
Citizen of Luxembourg

Prof. Dr Ueli Suter, examiner  
Prof. Dr Isabelle Mansuy, co-examiner  
Dr Verdon Taylor, co-examiner

2004

## SUMMARY

Understanding the generation of the enormous diversity of cells in the mammalian CNS represents a major challenge in developmental neurobiology. Neuroepithelial stem cells can use different mechanisms to create diversity among their progeny. They can produce two identical daughter cells, which then become different through interaction with different environmental cues. Alternatively, they can produce different daughter cells through asymmetric segregation of intrinsic cell fate determinants before mitosis (reviewed in Horvitz et al., 1992). The developing *Drosophila* CNS combines both mechanisms. Signaling through the Notch receptor as well as the asymmetric distribution of Numb were shown to be crucial for the proper development of the *Drosophila* nervous system (Hartenstein and Posakony, 1990; Rhyu et al., 1994; Spana and Doe, 1998).

The importance of understanding the basic mechanisms in early neurogenesis becomes obvious in view of possible treatments of neurological diseases, which damage CNS neurons. We therefore analyzed the function of mouse Numb in the development of the CNS. The lethality of the Numb knockout only provided limited information on Numb function in neurogenesis (Zhong et al., 2000; Zilian et al., 2001) and prompted us to analyze the function of Numb in the development of the cerebellum by conditional gene ablation. We chose the cerebellum to study CNS neurogenesis since it represents a non-vital CNS structure that is anatomically well-defined. Numb was shown to be expressed in the neuroepithelium from E8.5 onwards (Zhong et al., 1996). Furthermore, Numb expression was detected postnatally in the cerebellum, the dentate gyrus and in some defined cortical regions (Stump et al., 2002). Our analysis revealed that Numb ablation does not affect early cell fate decisions in the midbrain/hindbrain region of the neural tube and that cerebellar development occurs normally until birth. However, it became obvious that Numb-deficient granule cell precursors in the external germinal layer (EGL) are delayed in their maturation progression: they are retained in the EGL which leads to an increase in EGL thickness and in consequence, the establishment of the internal granule cell layer (IGL) is retarded. These findings were confirmed *in vitro*. The proportion of 'intermediate' granule cell precursors, expressing Math1, generated from Numb-deficient neuroepithelial cells was increased after 6d in culture and the generation of mature  $\beta$ -tubulin expressing granule cells was delayed. These results suggested that Numb regulates the transition of a mitotic progenitor to a fully differentiated granule cell in the cerebellum. In addition, the maturation of Purkinje cells is also delayed in

*Numb*-deficient mice *in vivo*. Taken together, these results suggest that, in cerebellar development, Numb is not an instructive factor of cell fate determination, but that its function only gets crucial in late neuronal maturation.

In future, several remaining questions need to be addressed. First, we must address whether the relatively weak phenotype observed upon Numb ablation in the cerebellum is due to a compensatory function of Numbl-like. Second, the biochemical mechanisms of Numb underlying the function of Numb must be addressed. The identification of additional interaction partners of Numb may enlarge the view on Numb function and clarify the network of signalling cascades involving Numb, which possibly regulates endocytic processes.

## ZUSAMMENFASSUNG

Wie die Vielfalt an verschiedenen Zelltypen des zentralen Nervensystem (ZNS) hergestellt wird ist eine der grössten Herausforderungen der Entwicklungsneurobiologie. Neuroepitheliale Stammzellen benutzen verschiedene Mechanismen um ungleiche Tochterzellen zu generieren. Auf der einen Seite teilen sich die Stammzellen und bilden identische Tochterzellen, welche sich anschliessend, aufgrund der äusseren Umgebung, zu verschiedenen Zelltypen entwickeln. Im Gegensatz hierzu können aber auch direkt mit der Zellteilung ungleiche Tochterzellen gebildet werden, indem sich vor der Mitose zellinterne Faktoren asymmetrisch verteilen (Horvitz et al., 1992). In *Drosophila* werden beide Mechanismen während der Entwicklung des ZNS kombiniert. Sowohl der transmembrane Rezeptor Notch1, als auch das zytoplasmatische Protein Numb, welches asymmetrisch in der Zelle verteilt werden kann, spielen eine wichtige Rolle bei der Zellteilung in der Entwicklung des ZNS in *Drosophila* (Hartenstein und Posakony, 1990; Rhyu et al., 1994; Spana und Doe, 1998).

Im Hinblick auf mögliche Stammzelltherapien gegen Krankheiten des ZNS, welche meist zu irreparablen Schäden der Nervenzellen führen, ist es unumgänglich die molekularen Grundmechanismen während der frühen Neurogenese zu verstehen. Wir haben aufgrunddessen die Funktion von Numb während der Entwicklung des Kleinhirns, welches wir als Modellsystem für die Entwicklung des ZNS betrachten, näher untersucht. Numb *knock-out* Mäuse sterben zu früh in der Entwicklung (E10.5), um die Funktion von Numb während der Neurogenese ausreichend studieren zu können (Zhong et al., 2000; Zilian et al., 2001). Aus diesem Grund haben wir einen konditionalen *knock-out* untersucht, in welchem die Funktion von Numb spezifisch ab Embryonaltag 9 (E9) in der Isthmus-Region abgeschaltet wird. Numb selbst wird ab E8.5 im Neuroepithelium exprimiert (Zhong et al., 1996). Desweiteren, wird Numb im postnatalen Kleinhirn, Hippocampus und in bestimmten Schichten der Grosshirnrinde exprimiert (Stump et al., 2002). Unsere Experimente haben gezeigt, dass das Kleinhirn sich ohne funktionelles Numb Protein bis zur Geburt hin normal entwickelt. Eine genauere Analyse zeigte jedoch, dass die Vorläufer der Körnerzellen des Kleinhirns, welche erst postnatal differenzieren, in ihrer Entwicklung verspätet sind. Zellkulturexperimente bestätigten diese Befunde. Die Ergebnisse lassen darauf schliessen, dass Numb den Uebergang einer mitotischen Vorläuferzelle zu einer terminal differenzierten Zelle beeinflusst. Desweiteren, konnten wir aufzeigen, dass Purkinje Zellen, welche die

zweite wichtige Nervenzellpopulation im Kleinhirn darstellt, im letzten Differenzierungsschritt verspätet sind. Unsere Ergebnisse zeigen, dass Numb nicht ausschlaggebend ist um einen bestimmten Zelltyp zu bilden, jedoch eine wichtige Rolle in der späteren neuronalen Entwicklung spielt, indem es die Vorgänge zur endgültigen 'Reifung' der Nervenzellen im Kleinhirn kontrolliert.

Weiterführende Experimente sollen noch offene Fragen klären helfen. Erstens, soll mit der Deletion von Numblike, einem homologen Protein zu Numb, untersucht werden, ob der mit der Numbdeletion beobachtete Phänotyp verstärkt wird. Zweitens gilt es, die molekularen Mechanismen aufzudecken, über welche Numb seine Funktion erwirkt. Die Identifizierung weiterer Interaktionspartner von Numb wird die Sicht auf die Funktion von Numb vergrößern und erlauben Numb in verschiedene, während der Neurogenese aktive, Signalwege, zu integrieren.