

Diss. ETH No. 14776

# Function of Notch1 signaling in oligodendrocyte development and CNS remyelination

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

for the degree of  
Doctor of Natural Science

presented by  
**Stéphane Genoud**

Diplom-Biochemist  
Université de Fribourg, Fribourg, Switzerland  
Born April 1, 1974 in Châtel-St-Denis/ FR, Switzerland  
Citizen of Switzerland

Accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. Ueli Suter, examiner  
Prof. Dr. Martin Schwab, co-examiner  
Dr. Ned Mantei, co-examiner

August 2002

# 1 SUMMARY

---

All the neurons and glial cells of the central nervous system are generated from the epithelial cells (neuroepithelium) that line the walls of the neural tube. The production of these different cell types is highly organized in space and in time. Among the last cell type to be specified, the oligodendrocytes differentiate from migratory precursor cells that arise from specific zones of neuroepithelium. A fundamental challenge of developmental neurobiology is to understand the molecular mechanisms that give rise to the differentiation of distinct populations of cells. Results from knockout animals as well as *in vitro* studies have allowed identification of several key factors regulating the complex process of oligodendrocyte differentiation and maturation. However, the full characterization of the signals and how these mechanisms are orchestrated *in vivo* remain elusive.

The goal of this work was to assess the role of Notch1 signaling in the development and function of the oligodendrocyte lineage. I used a Cre/lox system for oligodendrocyte-specific deletion of the Notch1 receptor. Through use of conditional knockout mice I showed in the first part of my thesis that Notch1 is critically important for establishing the correct temporal and spatial pattern of differentiation of oligodendrocytes in the spinal cord. Despite the loss of Notch1 in oligodendrocyte precursor cells, early development of the oligodendrocyte lineage appeared normal: In both mutant and wild-type, oligodendrocyte precursors arising in the ventral neural tube subsequently proliferated and dispersed throughout the gray and white matter of the developing spinal cord. The number of oligodendrocyte precursor cells was not altered at the ages examined. However, at embryonic day 17.5 and at postnatal day 0, a loss of Notch1 led to the appearance of an excess of immature oligodendrocytes at ectopic sites in the gray matter of mutant spinal cords. Premature oligodendrocyte differentiation was observed both in the spinal cord and in the cerebrum, indicating that Notch1 is required for the correct timing of oligodendrocyte differentiation in various regions of the central nervous system. Precociously differentiated oligodendrocytes in the gray matter were eliminated by apoptosis, although Notch1<sup>-/-</sup> oligodendrocytes could differentiate and survive *in vitro*. This suggests that some extracellular factors, present only in the white matter, are

critical for oligodendrocyte survival in vivo. These results demonstrate conclusively a crucial function of specifically Notch1 for differentiation of oligodendrocyte precursors in the spinal cord and suggest a similar function in the brain (Genoud et al., *J. Cell Biol.*, in press).

In the second part of my thesis, I showed that the lack of Notch1 expression in oligodendrocyte precursors or developing oligodendrocytes does not alter the localization of myelin within the first two weeks of spinal cord development and in adult animals. Furthermore, no myelinating oligodendrocytes were observed within the molecular layer of the cerebellum, a region which contains oligodendrocyte precursor cells but no myelinated axons. Precocious appearance of myelinating oligodendrocytes was also not detected. Finally, I addressed the functional importance of Notch1 in the process of remyelination in the central nervous system, and used a model in which continuous cuprizone (bis-cyclohexanone oxaldihydrazone) intoxication of adult mice leads to perturbation and death of mature oligodendrocytes. Although caution must be taken in generalizing these data because of the small number of mice analyzed, I failed to show a direct role for Notch1 in the regulation of central nervous system remyelination. Further studies are being carried out with the aim of better understanding the cellular changes occurring after Notch1 deletion in a lesion.

---

## 2 RÉSUMÉ

---

Toutes les cellules neuronales et gliales du système nerveux central sont générées à partir de cellules épithéliales (neuroépithélium) qui bordent les parois du tube neural. La production de ces différents types cellulaires est extrêmement bien structurée dans l'espace et dans le temps. Parmi le dernier type cellulaire à être spécifié, les oligodendrocytes se différencient à partir de cellules précurseurs migratrices qui ont pour origine des zones spécifiques du neuroépithélium. Un défi fondamental de la neurobiologie du développement consiste à comprendre les mécanismes moléculaires qui entraînent la différenciation de populations distinctes de cellules. Des résultats obtenus à partir d'animaux "knockout" ainsi que des études *in vitro* ont permis l'identification de plusieurs facteurs clés qui régulent le processus complexe de la différenciation et maturation des oligodendrocytes. Cependant, la caractérisation complète des signaux et la manière dont ces mécanismes sont orchestrés *in vivo* restent encore à découvrir.

Le but de cette étude consista à évaluer le rôle de la signalisation de Notch1 dans le développement et la fonction de la lignée oligodendrocytaire. J'ai utilisé un système Cre/lox pour la délétion spécifique du récepteur Notch1 dans les oligodendrocytes. En utilisant des souris "knockout" conditionnel, j'ai montré dans la première partie de ma thèse que Notch1 joue un rôle décisif dans le contrôle temporel et spatial de la différenciation des oligodendrocytes dans la moëlle épinière. Malgré l'absence de Notch1 dans les cellules oligodendrocytaires précurseurs, les premiers stades de développement de la lignée oligodendrocytaire se sont avérés normaux: aussi bien dans les souris mutantes que dans les souris sauvages, les cellules oligodendrocytaires précurseurs qui proviennent du tube neural ventral ont par la suite proliféré et se sont dispersés dans la matière grise et matière blanche de la moëlle épinière en développement. Le nombre de cellules oligodendrocytaires précurseurs n'a pas été modifié à tout âge examiné. Cependant, au 17.5<sup>ème</sup> jour embryonnaire ainsi qu'à la naissance, une absence de Notch1 a conduit à un excédent d'oligodendrocytes immatures de façon ectopique dans la matière grise des moëlles épinières mutantes. Une différenciation prématurée des oligodendrocytes a été observée dans la moëlle épinière et

dans le cerebrum, indiquant que Notch1 est requis pour le minutage précis de la différenciation des oligodendrocytes dans différentes régions du système nerveux central. Les oligodendrocytes prématurément différenciés dans la matière grise ont été éliminés par apoptose, bien que les oligodendrocytes n'exprimant pas Notch1 aient été capables de se différencier et de survivre in vitro. Cela suggère la présence critique de facteurs extracellulaires, et ce uniquement dans la matière blanche, afin d'assurer la survie des oligodendrocytes in vivo. Ces résultats démontrent de façon conclusive une fonction cruciale de spécifiquement Notch1 dans la différenciation des cellules oligodendrocytaires précurseurs de la moëlle épinière et suggèrent une fonction analogue de Notch1 dans le cerveau (Genoud et al., J. Cell Biol., sous presse).

Dans la seconde partie de ma thèse, j'ai montré que l'absence de Notch1 dans les cellules oligodendrocytaires précurseurs ou dans les oligodendrocytes en phase de développement n'affecte pas la localisation précise de la myélinisation durant les deux premières semaines de développement de la moëlle épinière et chez les animaux adultes. De plus, aucun oligodendrocyte en train de myéliniser n'a été détecté dans la couche moléculaire du cervelet, une région qui contient des cellules oligodendrocytaires précurseurs mais pas d'axones myélinisés. L'apparition précoce d'oligodendrocytes producteurs de myéline n'a également pas été observée dans plusieurs régions du système nerveux central. Finalement, j'ai examiné l'importance de la fonction de Notch1 dans le processus de remyélinisation du système nerveux central. Pour cela, j'ai utilisé un modèle, grâce auquel une intoxication continue de cuprizone (N,N-oxalylbis(cyclohexanone-hydrazone)) dans la souris adulte conduit à une perturbation et à la mort des oligodendrocytes mûrs producteurs de myéline. Bien que la prudence s'avère nécessaire à généraliser ces résultats dûs à un nombre restreint de souris analysées, je n'ai pu démontrer un rôle direct de Notch1 dans la régulation de la remyélinisation du système nerveux central. De plus amples études sont en train d'être poursuivies afin de mieux comprendre les changements moléculaires se produisant à la suite d'une délétion de Notch1 dans une lésion.