

Diss.ETH No. 13653

MECHANISMS OF NEURAL CREST DEVELOPMENT

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

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
Lilian Hagedorn

Diplom- Chemikerin
Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Germany
Born October 3, 1968 in Heidelberg, Germany
Citizen of Germany

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

April 2000

1. SUMMARY

The various cell types of the vertebrate peripheral nervous system (PNS) are generated from a migratory population of multipotent embryonic stem cells, the so-called neural crest (NC). A central issue of developmental biology is to understand how an initially multipotent cell becomes fate restricted and gives rise to a variety of distinct cell types at different locations (Edlund and Jessell, 1999). Transplantation and lineage-tracing experiments *in vivo* combined with the results of clonal analyses *in vitro* suggest that neural crest cells gradually undergo restrictions in their developmental potential during migration and at sites of differentiation (reviewed in Anderson et al., 1997; Le Douarin, 1986; Le Douarin and Ziller, 1993). The molecular basis of fate restriction in neural crest development is believed to involve exposure to environmental signals (reviewed in Anderson et al., 1997; Le Douarin and Ziller, 1993). However, the regulatory interactions between extracellular signals and intracellular programs that control determination and differentiation processes are only poorly understood.

In the first part of my thesis, I show that protein zero (P0) and peripheral myelin protein 22 (PMP22), both prominent components of peripheral myelin, are not only expressed in glial cells long before the onset of myelination but also mark a multipotent cell type in the early dorsal root ganglion (DRG). Comparable to neural crest stem cells (NCSC), this P0/PMP22-positive progenitor can be induced with extracellular growth factors to give rise to neurons, glia, and smooth muscle-like cells. A similar progenitor cell type can be generated from NCSC cultures in which the expression of P0 and PMP22 precedes the appearance of overt glial and neuronal differentiation markers. Single cell analysis identifies this neural crest-derived cell as a multipotent progenitor of the PNS. Strikingly, the P0/PMP22-positive progenitor displays community effects when exposed to extracellular signals. While single P0/PMP22-positive progenitors can generate smooth muscle in response to factors of the TGF β family, progenitor communities interpret TGF β signaling differently and produce autonomic neurons or undergo cell death, but will not generate smooth muscle-like cells. Interestingly, TGF β seems to act in a concentration dependent manner on cell communities in contrast to single cells: at low doses neurogenesis is induced, while apoptosis is promoted at high doses of TGF β . These data are consistent with a model in which cellular association of postmigratory multipotent progenitors might be involved in the suppression of a non-neural fate in forming peripheral ganglia. Moreover, the expression of P0 and PMP22 in multipotent postmigratory progenitors isolated from early DRGs and from NCSC cultures reveals that these molecules are not markers for committed neural crest-derived sublineages (Hagedorn, L., Suter, U., and Sommer, L. (1999). P0 and PMP22 mark a multipotent

neural crest-derived cell type that displays community effects in response to TGF- β factors. *Development* 126, 3781-3794).

In the second part of my thesis, I show that the expression of the Ets domain transcription factor Erm distinguishes satellite glia from Schwann cells beginning early in rat PNS development. In developing dorsal root ganglia (DRG), Erm is present both in presumptive satellite glia and in neurons. In contrast, Erm is not detectable at any developmental stage in Schwann cells in peripheral nerves. In addition, Erm is downregulated in DRG-derived glia adopting Schwann cell traits in culture. Thus, Erm is the first described transcription factor expressed in satellite glia but not in Schwann cells. In culture, the Neuregulin1 (NRG1) isoform GGF2 maintains Erm expression in presumptive satellite cells and reinduces Erm expression in DRG-derived glia but not in Schwann cells from sciatic nerve. These data demonstrate that there are intrinsic differences between these glial subtypes in their response to NRG1 signaling. In neural crest cultures, Erm-positive progenitor cells give rise to two distinct glial subtypes: Erm-positive, Oct-6-negative satellite glia in response to GGF2, and Erm-negative, Oct-6-positive Schwann cells in the presence of serum and the adenylate cyclase activator forskolin. Thus, Erm-positive neural crest-derived progenitor cells and presumptive satellite glia are able to acquire Schwann cell features. Given the *in vivo* expression of Erm in peripheral ganglia, this suggests that ganglionic Erm-positive cells may be precursors of Schwann cells (Hagedorn, L., Paratore, C., Brugnoli, G., Baert, J.-L., Mercader, N., Suter, U., and Sommer, L. (2000). The Ets domain transcription factor Erm distinguishes satellite glia from Schwann cells and is regulated in satellite cells by neuregulin signaling. *Developmental Biology* , 219, 44-58).

2. ZUSAMMENFASSUNG

In Wirbeltieren stammen die verschiedenen Zelltypen des peripheren Nervensystems (PNS) - Gliazellen und Neuronen - von einer Population multipotenter Vorläuferzellen, den sogenannten Neuralleiststammzellen, ab. Wie aus einer anfänglich multipotenten Vorläuferzelle eine Vielzahl unterschiedlichster Zellarten an verschiedensten Stellen im Körper entstehen kann, ist heute eine der Kernfragen der modernen Entwicklungsbiologie. Aus Daten von Transplantations- und Markierungsexperimenten *in vivo* und klonalen Analysen *in vitro* läßt sich schließen, daß die neuralen Stammzellen wahrscheinlich sukzessive ihr Potenzial auf ihrer Wanderung zu den Zielorganen oder in den Zielorganen selbst verlieren. Es wird angenommen, daß dabei auch Faktoren eine Rolle spielen, die von Geweben oder Zellen aus der näheren Umgebung der sich entwickelnden Vorläuferzellen abgegeben werden. Es ist allerdings nicht genau geklärt, wie diese extrazellulären Faktoren zellintrinsische Programme zur Zelldifferenzierung beeinflussen.

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte ich zeigen, daß P0 und PMP22, beides wichtige Strukturproteine des peripheren Myelins, bereits lange vor Beginn der Myelinisierung von Gliazellen im peripheren Nervensystem exprimiert werden. Darüberhinaus wurde in den frühen Spinalganglien ein neuer, multipotenter Vorläuferzelltyp identifiziert, der sich durch die Expression von P0 und PMP22 deutlich von den ebenfalls multipotenten Neuralleiststammzellen unterscheidet. Durch Zugabe von extrazellulären Wachstumsfaktoren können diese P0/PMP22 positiven Vorläuferzellen zu Gliazellen, Neuronen oder glatten Muskelzellen ausdifferenziert werden. Eine ganz ähnliche Vorläuferzelle kann auch *de novo* aus Primärkulturen neuraler Stammzellen generiert werden. Auch in diesen Vorläuferzellen werden P0 und PMP22 bereits sehr früh, vor anderen glialen oder neuronalen Differenzierungsmarkern, exprimiert. Einzeln und räumlich voneinander isoliert sind diese Zellen multipotent und reagieren auf die Zugabe instruktiver, extrazellulärer Wachstumsfaktoren. Im Verband allerdings scheint das Potenzial der *de novo* generierten P0/PMP22-positiven Vorläuferzellen reduziert, sie reagieren anders auf die Wachstumsfaktoren als die Einzelzellen: ein Phänomen, das man als "community effect" bezeichnet. Während P0/PMP22-doppelpositive Einzelzellen nach Zugabe von Wachstumsfaktoren aus der TGF β - Familie zu glatter Muskulatur ausdifferenzieren, interpretiert der Zellverband das TGF β - Signal völlig neu und differenziert zu autonomen Neuronen oder stirbt. Im Gegensatz zu Einzelzellen scheint TGF β auf den Zellverband dosisabhängig zu wirken: bei niedrigen TGF β Konzentrationen werden hauptsächlich Neuronen produziert, wohingegen hohe TGF β Konzentrationen Zelltod auslösen. Aus all diesen Daten läßt sich ein Modell für die frühe

Entwicklung der Spinalganglien aus multipotenten neuronalen Stammzellen ableiten, das erklärt, wie die Bildung nicht - neuraler Gewebe in den sich formenden Zellverbänden der späteren peripheren Ganglien durch "community effects" verhindert wird. Darüberhinaus zeigt die Expression von P0 und PMP22 in den oben beschriebenen, multipotenten Vorläuferzelltypen, daß diese Proteine nicht wie früher angenommen Marker für bestimmte Zelllinien des peripheren Nervensystems sind. (Hagedorn, L., Suter, U., and Sommer, L. (1999). P0 and PMP22 mark a multipotent neural crest-derived cell type that displays community effects in response to TGF- β factors. *Development* 126, 3781-3794).

Im zweiten Teil meiner Arbeit konnte ich zeigen, daß sich Satellitenzellen von Schwannschen Zellen bereits sehr früh in der Entwicklung des peripheren Nervensystems der Ratte durch die Expression des Transkriptionsfaktors Erm unterscheiden. Während Erm zu keinem Zeitpunkt in Schwannschen Zellen entlang der peripheren Nerven nachgewiesen werden kann, exprimieren sowohl Neuronen als auch Gliazellen in den sich bildenden Spinalganglien diesen ETS Domain Transkriptionsfaktor. Darüberhinaus wird die Expression von Erm in Schwann Zell - ähnlichen Gliazellen, die man in Kultur aus Satellitenzellen generieren kann, herunterreguliert. Erm ist der erste Transkriptionsfaktor, für den gezeigt werden konnte, daß er von Satellitenzellen und nicht von Schwannschen Zellen exprimiert wird. In Kultur ist die Neuregulin 1 (NRG1) Isoform GGF2 in der Lage, die Expression von Erm in aus Spinalganglien isolierten Satellitenzellen aufrecht zu erhalten bzw. zu reinduzieren. In aus peripheren Nerven isolierten, Erm-negativen Schwannschen Zellen dagegen konnte die Expression von Erm nicht mit GGF2 induziert werden. Diese Daten zeigen, daß es zellintrinsische Unterschiede zwischen diesen beiden verschiedenen Glia-Subtypen geben muß. Aus Primärkulturen neuronaler Stammzellen kann man ebenfalls zwei verschiedene Glia-Subtypen aus Erm-positiven Vorläuferzellen generieren: bei Zugabe von GGF2 Erm-positive, Oct-6-negative Satellitenzellen, bei Zugabe von Serum und Forskolin, einem Adenylat-zyklase-aktivator, Erm-negative, Oct-6-positive Schwannsche Zellen. Sowohl aus neuronalen Stammzellen generierte Erm-positive Vorläuferzellen als auch Satellitenzellen sind also in der Lage, sich zu Schwann Zell-ähnlichen Gliazellen zu entwickeln. Bedenkt man, daß Erm *in vivo* in den Spinalganglien exprimiert wird, könnte dies bedeuten, daß Erm-positive Zellen in den frühen Spinalganglien Vorläuferzellen für Schwannsche Zellen entlang der peripheren Nerven sind (Hagedorn, L., Paratore, C., Brugnoli, G., Baert, J.-L., Mercader, N., Suter, U., and Sommer, L. (2000). The Ets domain transcription factor Erm distinguishes satellite glia from Schwann cells and is regulated in satellite cells by neuregulin signaling. *Developmental Biology* , 219, 44-58).