

Diss. ETH No. 14780

# **The Cellular Function of the Two Transcription Factors Sox10 and Erm in Neural Crest Development**

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of  
Doctor of Natural Sciences

presented by  
**Christian Paratore**

Dipl. Nat. ETHZ, Switzerland

Born March 28, 1975  
Citizen of  
Dübendorf, Switzerland

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

2002

# 1. Zusammenfassung

Es ist eine Schlüsselfrage der Entwicklungsbiologie wie die zelluläre Vielfalt während der Entwicklung festgelegt wird. Die Spezifizierung multipotenter Zellen beinhaltet Einschränkungen im Entwicklungspotenzial, welches durch lokale Signale beeinflusst wird. Das periphere Nervensystem entwickelt sich aus einer Zellpopulation, welche Neuralleistenzellen genannt wird. *In vivo* und *in vitro* Experimente deuten darauf hin, dass das Entwicklungspotenzial der Neuralleistenzellen kontinuierlich eingeschränkt wird und dass ein komplexes Zusammenspiel von Signalen aus der Zellumgebung und internen Signalkaskaden Einschränkungen in den Entwicklungsmöglichkeiten und der Differenzierung der Neuralleistenzellen reguliert. Über die molekulare Grundlage, welche diesen Wechselwirkungen zugrunde liegt, weiss man noch sehr wenig.

Im ersten Teil meiner Dissertation beschreibe ich, dass intrinsische Unterschiede zwischen ‚frühen‘ Neuralleistenzellen und Vorläuferzellen aus den dorsalen Spinalganglien bestehen. Diese zwei Zelltypen reagieren unterschiedlich auf verschiedene Zellkulturbedingungen. Weiter zeige ich, dass der Transkriptionsfaktor Erm der erste bekannte Faktor bei den Säugern ist, welcher Satellitenglia von Schwannschen Zellen unterscheidet. Erm ist in den dorsalen Spinalganglien sowohl in multipotenten Vorläuferzellen, in Satellitenzellen als auch in Neuronen exprimiert. Die Erm Expression vermag der Wachstumsfaktor Neuregulin1 (NRG1) in Satellitenglia zu erhalten und in Vorläuferzellen von Spinalganglien zu re-induzieren. Schwannsche Zellen isoliert aus dem Ischiasnerv sind dazu nicht mehr in der Lage. Dieses Ergebnis zeigt, dass zwischen den verschiedenen glialen Subtypen intrinsische Unterschiede bestehen. Erm-positive multipotente Vorläuferzellen aus Primärkulturen differenzieren nach der Zugabe von NRG1 zu Satellitenzellen. Werden diese Zellen jedoch mit Serum und dem Adenylate-zyklase Aktivator Forskolin behandelt, dann differenzieren sie stattdessen zu Schwannschen Zellen. Das *in vivo* Expressionsmuster von Erm und die NRG1/Erm Signalkaskade weisen darauf hin, dass Neuralleistenzellen in den sich bildenden Spinalganglien zu Erm-positiven Satellitenglia differenzieren. Andere Neuralleistenzellen wandern aus den Spinalganglien aus und verlieren ihre Erm Expression während der Differenzierung zu Schwannschen Zellen.

Über die Funktion von Erm während der Neuralleistenenentwicklung ist bis jetzt immer noch sehr wenig bekannt. Deshalb habe ich eine dominant-negative Form von Erm in Neuralleistenzellen exprimiert um mehr über eine mögliche Funktion von Erm während der frühen Linienfestlegung herauszufinden. Dieses Experiment zeigt, dass Erm für den effizienten Erwerb der neuronalen Richtung wichtig ist, aber bei der Vermehrung und dem Überleben der Vorläuferzellen keine Rolle spielt. Die Differenzierung in die gliale Linie ist normal, während die Vermehrungsrate der Gliazellen stark reduziert ist. Das deutet darauf hin, dass Erm je nach Neuralleistelinie unterschiedliche Funktionen ausübt.

Im nächsten Teil meiner Dissertation analysiere ich das Expressionsmuster und die zelluläre Funktion des Transkriptionsfaktors Sox10. Dieser Faktor spielt eine zentrale Rolle während der Neuralleistenenentwicklung und es wurde bereits gezeigt, dass homozygot mutierte Sox10 Tiere keine Gliazellen entwickeln. Ich zeige zusätzlich, dass alle Neuralleistenzellen Sox10 Protein exprimieren und

dass die Funktion von Sox10 bereits vor der Aufspaltung der verschiedenen Zelltypen wichtig ist. Postmigratorische und undifferenzierte Vorläuferzellen in den Spinalganglien von Sox10<sup>-/-</sup> Tieren sterben durch Apoptose. Dies zeigt, dass Sox10 das Überleben von Neuralleistenzellen steuert. Diese Funktion wird durch den glialen Wachstumsfaktor NRG1 vermittelt. Zudem weist eine klonale Analyse der überlebenden Sox10<sup>-/-</sup> Zellen in gliogenem Medium darauf hin, dass die Zellen nicht fähig sind in eine gliale Richtung zu differenzieren. Sox10<sup>+/-</sup> Zellen hingegen überleben normal, wobei sie aber präferentiell in eine andere Zelltyp-Linie differenzieren. Diese Wahl wird durch unterschiedliche Zellkontexte beeinflusst. Zusammengefasst zeige ich, dass kombinatorische Signale von Sox10, extrazellulären Faktoren wie zum Beispiel NRG1 und Zell-Zell Interaktionen das Schicksal der Zellen beeinflussen.

Beim Menschen führt Sox10 Haploinsuffizienz zum Waardenburg/Hirschsprung Syndrom. Patienten, welche an dieser Krankheit des enterischen Nervensystems (ENS) leiden, weisen einen Darm auf, welcher entlang einer variablen Länge nicht von Neuronen innerviert ist. Bisher wurde die zelluläre Grundlage und der Mechanismus dieser Krankheit erst dürftig verstanden. Basierend auf den oben beschriebenen Ergebnissen vermute ich, dass Fehler bei der Wahl von verschiedenen Zelltypen zu dieser Krankheit führen. Ich zeige, dass Sox10<sup>+/-</sup> Tiere im Dickdarm keine enterischen Neuronen besitzen und dass die Sox10 Maus deshalb eines der wenigen bekannten Modellsysteme ist, welches wie beim Patienten die Krankheit bereits im heterozygoten Stadium offenbart. Zudem ist die Anzahl an Vorläuferzellen im ENS bereits sehr früh in der Entwicklung des Darms reduziert. Die Stabilität des LacZ Proteins, welches vom Sox10 Locus exprimiert wird, erlaubt uns das Schicksal der ehemals Sox10-positiven Zellen zu verfolgen. Ich zeige, dass immer noch LacZ-positive Zellen im Darm existieren, welche die Sox10 Expression jedoch bereits hinunterreguliert haben. Dies beweist, dass die Zellen nicht gestorben sind aber stattdessen in einen anderen Zelltyp differenziert sind. Viele dieser LacZ-positiven Zellen exprimieren die neuronalen Marker c-Ret und PGP9.5 und differenzieren in eine neuronale Richtung. Deshalb glaube ich, dass die Sox10 Mutation die Zellen daran hindert in einem undifferenzierten Vorläuferstadium zu bleiben und dass sie stattdessen in die neuronale Linie differenzieren. Dies führt dazu, dass distale Teile des Darms nicht innerviert werden und sich ein Megacolon ausbildet.

## 2. Summary

A key question in developmental biology is how cellular diversity is established during development. This process involves restrictions in the developmental potential of initially multipotent cells at different developmental stages and at distinct embryonic sites. The entire vertebrate peripheral nervous system is derived from a migratory, multipotent population of cells termed neural crest cells (NCC). *In vivo* and *in vitro* experiments suggest that multipotent neural crest cells gradually undergo restriction in their developmental potential (Anderson, 2001). A process, which involves a complex interplay of environmental signals and intrinsic programs regulating fate restrictions and differentiation of NCC. The interactions between extrinsic signals and intrinsic programs are still poorly understood.

In a first part of my thesis, I illustrate intrinsic differences between 'early' NCC and developmentally 'older' dorsal root ganglia (DRG) progenitors in their developmental potential in response to diverse cellular contexts. Next, I analyzed the expression pattern and the function of the Ets domain transcription factor Erm. Ets genes were shown to be involved in many developmental processes. In the DRG, Erm is expressed in multipotent progenitor cells, in presumptive satellite glia and in sensory neurons. I show that Erm is the first mammalian marker distinguishing satellite glia from Schwann cells, which are devoid of Erm expression. In addition, the growth factor neuregulin1 (NRG1) maintains Erm expression in satellite glia and furthermore, is able to reinduce Erm expression in DRG-derived progenitors but not in Schwann cells of the sciatic nerve. These data demonstrate intrinsic differences of diverse glial subtypes in response to NRG1-signaling. Further, Erm-positive multipotent progenitors isolated from NC cultures give rise to satellite glia in response to NRG1 and to Schwann cells in the presence of serum and the adenylate cyclase activator forskolin. Therefore, given the expression pattern of Erm *in vivo* and the described NRG1/Erm signaling in NCC, we hypothesize that NCSC first give rise to Erm-positive progenitors that then differentiate into Erm-positive satellite glia in the forming DRG. Erm-positive progenitors might furthermore emigrate from the DRG and subsequently differentiate into Erm-negative Schwann cell precursors along the peripheral nerves.

Next, I investigate the cellular function of Erm in NC development by forced expression of a dominant-negative form of Erm *in vitro*. These experiments reveal a requirement of Erm for efficient neuronal fate acquisition, while progenitor survival and proliferation are not affected. Additionally, glial fate acquisition and differentiation are unaltered. However, the proliferation rate is drastically diminished in glial cells, suggesting a glia-specific role in controlling cell cycle progression. This indicates a dual, lineage specific, role of Erm during NC stem cell development.

In a subsequent part of my thesis, I analyze the expression pattern and the cellular function of the high mobility group (HMG) domain transcription factor Sox10 during NC development. This transcription factor is necessary for proper development of many NC derivatives. For example, Sox10-homozygous mutant mice lack all subsets of peripheral glia. I demonstrate that all NCC express Sox10 protein and require Sox10 function before lineage segregation. Postmigratory, undifferentiated progenitors in Sox10<sup>-/-</sup> DRG display significantly

increased apoptosis suggesting a role of Sox10 in the survival of NCC. Furthermore, surviving mutant cells submitted to clonal analysis under gliogenic conditions show that Sox10 is essential for glial fate acquisition. In contrast, Sox10<sup>+/-</sup> mutant NCC survive normally, while fate specification is drastically altered. Further, I illustrate that fate decision by mutant NCC is cell-context dependent. In sum, my data indicate that combinatorial signaling by Sox10, extracellular factors such as NRG1 and cell-cell interactions are involved in fine-tuning lineage specification.

Human patients with one mutated Sox10 allele suffer from Waardenburg/Hirschsprung disease, a congenital disorder of the enteric nervous system (ENS). This indicates that haploinsufficiency of Sox10 results in several NC defects characterized by aganglionosis along the gut. The cellular basis for this phenotype is not fully understood. I speculate that failures in fate decision processes might contribute to the etiology of Hirschsprung disease. For instance, I show that Sox10<sup>+/-</sup> animals lack enteric neurons in the hindgut and therefore, are a suitable model for Hirschsprung disease. Early in development, the number of multipotent progenitors in the ENS of Sox10<sup>+/-</sup> animals is highly reduced. Additionally, fate mapping experiments using persistent lacZ expression from the Sox10 locus demonstrate that the former Sox10-positive cells are still present in the gut but have lost Sox10 expression. Instead, many of these cells express the neuronal markers c-Ret and PGP9.5. Therefore, these data show that the maintenance of the progenitor state is impaired and that the Sox10<sup>+/-</sup> enteric cells differentiate into enteric neurons. This process results in a depletion of the progenitor pool in the hindgut and in the onset of Hirschsprung disease.