



Doctoral Thesis

The effect of Wnt/ β -catenin and BMP-signaling in early neural crest stem cell development

Author(s):

Kléber, Maurice

Publication Date:

2004

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004833540> →

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. 15694

The Effect of Wnt/ β -Catenin- and BMP- Signaling in Early Neural Crest Stem Cell Development

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
Maurice Kléber

Diplom-Biochemiker
Universität Bern

Born May 8, 1973
Citizen of
Neuenburg, Bern; Switzerland

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

September 2004

1. SUMMARY

The regulation of cell diversification is a central issue in developmental biology. The neural crest is an attractive system for investigating the mechanisms underlying such cell lineage specification in higher vertebrates. Neural crest stem cells (NCSCs) are defined as multipotent, self-renewing undifferentiated cells that can give rise to one or more classes of neurons as well as nonneuronal cell types (Stemple and Anderson, 1992). The fact that neural crest cells are initially multipotent and gradually undergo restrictions in their developmental potential implies influences of environmental signals during migration and at sites of differentiation. Understanding the regulatory interactions between extracellular signals and intracellular programs that control determination and differentiation processes represent a challenging question in developmental biology. A great deal of interest has focused on the potential therapeutic applications of neural stem cells which requires however, a better understanding of fundamental biological properties of these cells.

In the first part of my thesis, I describe a new role of the signaling protein Wnt, which has recently emerged as a key factor in controlling stem cell expansion. In embryonic stem cells, haematopoietic stem cells and neural stem cells Wnts act mitotically on progenitor cells, which leads to amplification and self-renewal of the stem cell pool. To test whether Wnts are general stem cell growth factors we addressed the role of Wnt signaling in NCSCs. In contrast to previous studies, we were able to show that Wnt signaling in early NCSCs has little effect on the population size and instead regulates fate decisions. Sustained β -catenin activity in NCSCs promotes the formation of sensory neural cells *in vivo* as *in vitro* at the expense of all other neural crest derivatives. Thus, manipulation of a single signaling pathway in NCSCs is sufficient to influence the fate of virtually the entire population. Moreover, Wnt1 is able to instruct early NCSCs (eNCSCs) to adopt a sensory neuronal fate in a β -catenin-dependent manner, emphasizing a cell-type dependent role of Wnt/ β -catenin in stem cells (Lee et al., 2004).

Further, I review the context-dependent role of canonical Wnt signaling in stem cells and discuss the different biological responses of Wnts in stem cells, which I subsequently summarize in three models (Kleber and Sommer, 2004).

In the second part of my thesis, I demonstrate a new role of the bone morphogenic protein (BMP) signaling factor in early neural crest development. The BMPs mediate a diverse array of developmental processes including survival, proliferation, morphogenesis, lineage commitment, inhibition of alternate lineages, differentiation and apoptosis (Hogan, 1996b; Mehler et al., 1997). In neural crest development BMPs have been shown to induce neural

crest in combination with Wnts (Bronner-Fraser, 1998; Bronner-Fraser, 2002; Garcia-Castro et al., 2002). In NCSCs, BMPs are modulated by community effects and induce autonomic neurogenesis *in vitro* (Anderson, 1993; Anderson, 1997; Anderson, 2000; Hagedorn et al., 2000a; Shah et al., 1996; White and Anderson, 1999; White et al., 2001) as well *in vivo* (Reissmann et al., 1996; Schneider et al., 1999). We now demonstrated that *in vitro* BMPs in combination with Wnts influence early NCSCs already as they emigrate of the neural tube. The combinatorial activity of BMPs and Wnts regulate the maintenance and early lineage segregation in NCSCs. Those eNCSCs, which do not encounter BMPs, aggregate and form sensory ganglia, while those who encounter BMPs and Wnts at the same time point remain multipotent. We show for the first time maintenance of a pure neural stem cell population over prolonged time. Moreover over time, maintained NCSCs lose their response to the sensory neuron-inducing activity of Wnt. Our findings answer the debated question of when and how lineage segregation between sensory and other neural crest derivatives in NCSCs occurs and is regulated. Our data also explain why autonomic neurons are not generated when NCSCs migrate out of the neural tube and encounter BMPs (Anderson, 2000). We further demonstrate that canonical Wnt activity decreases at sites of postmigratory NCSCs *in vivo* and demonstrate *in vitro* that postmigratory NCSCs are not Wnt-responsive anymore.

2. ZUSAMMENFASSUNG

Die Regulierung der zellulären Verschiedenartigkeit beinhaltet eine zentrale Frage in der Entwicklungsbiologie. Die Neuralleiste bietet ein attraktives System um jene Mechanismen der Zelllinienspezifizierung in höheren Organismen zu untersuchen. Neuralleistenstammzellen sind als multipotente, selbsterneuernde und undifferenzierte Zellen definiert und können mehr als eine Klasse an Neuronen sowie Nicht-neuronale Zellarten generieren. Die Tatsache, dass Neuralleistenzellen anfangs multipotent sind und sukzessiv ihr Potential verlieren, lässt auf den Einfluss von Faktoren aus der näheren Umgebung schliessen, denen die Stammzellen während der Wanderung zu den Zielorganen ausgesetzt sind. Das Verständnis über extrazelluläre Faktoren, die intrazelluläre Programme zur Zelldifferenzierung beeinflussen, ist eine herausfordernde Fragestellung in der Entwicklungsbiologie. Ein breites Interesse konzentriert sich mehr auf mögliche therapeutische Anwendungen von Neuralleistenstammzellen, welches jedoch ein besseres Verständnis von den grundlegenden biologischen Eigenschaften solcher Zellen voraussetzt.

Im ersten Teil meiner Doktorarbeit beschreibe ich eine neue Rolle des Signalfaktors Wnt, welcher unlängst eine Schlüsselrolle in der Stammzellentwicklung eingenommen hat. In embryonalen, hämatopoetischen sowie Stammzellen des Zentralnervensystems stimuliert Wnt die Zellteilung der Vorläuferzellen, welches zur Ausdehnung und Selbsterneuerung des Stammzellpools führt. Um herauszufinden, ob es sich bei Wnt um einen generellen Wachstumsfaktor für Stammzellen handelt, analysierten wir die Funktion des Wnt Signals in Neuralleistenstammzellen. In früheren Studien konnten wir zeigen, dass das Wnt Signal in sogenannten frühen Neuralleistenstammzellen keinen Einfluss auf deren Vermehrung hat, sondern stattdessen entscheidend für die Entstehung bestimmter Nervenzellen ist. Die aktivierende Mutation in β -Catenin fördert die Entwicklung sensorischer Neuronen *in vivo* als auch *in vitro* auf Kosten der anderen auszubildenden Neuralleistenderivate. Auf diese Weise konnten wir zeigen, dass die Manipulation eines einzigen Signaltransduktionsweges in den Neuralleistenstammzellen ausreicht, um das Schicksal einer nahezu gesamten Zellpopulation zu beeinflussen.

Des weiteren, fasse ich in einem rückblickenden Artikel die zusammenhängende Rolle des kanonischen Wnt Signalweges in Stammzellen zusammen und zeige dessen verschiedenartige biologische Reaktionen in drei Modellen.

Im zweiten Teil meiner Doktorarbeit, demonstriere ich eine neue Rolle des Signalfaktors Bone Morphogenic Protein (BMP) in der frühen Neuralleistenentwicklung. Die BMPs steuern eine Vielzahl von Entwicklungsprozessen, wie zum Beispiel das Überleben, die Zellteilung,

die Morphogenese, die Regulierung der Zelllinien, sowie die Hemmung zur Entstehung alternativer Zelllinien, Differenzierung und Zelltod. In der Neuralleistenentwicklung konnte gezeigt werden, dass die BMPs in Kombination mit den Wnt Molekülen eine Induktion von Neuralleistenstammzellen auslösen. Hingegen generieren die Neuralleistenstammzellen, sowohl *in vivo* als auch *in vitro*, unter Einfluss der BMPs autonome Neuronen und zeigen die sogenannten community effects. Zusätzlich konnten wir jedoch mittels *in vitro* Experimenten zeigen, dass die BMPs, in Kombination mit den Wnt Molekülen, schon zum Zeitpunkt der Auswanderung aus dem Neuralrohr die Neuralleistenstammzellen beeinflussen. Dieses Zusammenspiel von BMP und Wnt reguliert so die frühe Aufspaltung von Neuralleistenstammzellen in diverse Zelllinien. Diejenigen frühen Neuralleistenstammzellen die nicht auf BMP Moleküle während der Wanderungsphase stossen, aggregieren und bilden sensorische Ganglien aus, während unter Einfluss von BMP und Wnt die frühen Neuralleistenstammzellen ihren Stammzellcharakter beibehalten. Zum ersten Mal konnten wir zeigen, wie man Neurale Stammzellen homogen und undifferenziert über längere Zeit beibehalten kann. Zudem verlieren die beibehaltenen Neuralleistenstammzellen über Zeit die Fähigkeit mit Wnt sensorische Neuronen zu bilden. Unsere Resultate geben Klarheit über die Fragen und Diskussionen zu welchem Zeitpunkt und unter welchen Umständen die Aufspaltung in die sensorischen und anderen Neuralleistenderivate stattfindet und wie sie reguliert wird. Unsere Daten klären sogar, warum keine autonomen Neuronen schon bei der Emigration der Neuralleistenstammzellen aus dem Neuralrohr, trotz BMP Präsenz, gebildet werden. Des weiteren konnten wir zeigen, dass die kanonische Wnt Aktivität in Regionen der postmigratorischen Neuralleistenstammzellen abnimmt und auch keine Reaktivität auf Wnt vorhanden ist.