

DISS. ETH No. 16574

TGF β signaling regulating neural stem cell development

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
Heiko Wurdak

Diplom-Biologe
Technische Universität Darmstadt, Germany
Born October 27, 1972, Germany
Citizen of Germany

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

2006

1. ZUSAMMENFASSUNG

Die Charakterisierung von zellulären und molekularen Mechanismen, welche die Entwicklung von Stamm- und Vorläuferzellen regulieren, ist ein zentrales Anliegen meiner Dissertation. Die Entstehung zellulärer und morphologischer Vielfalt während der Entwicklung wird durch diverse intrazelluläre und extrazelluläre Faktoren beeinflusst. Die Analyse individueller Signalwege, sowie deren komplexes Zusammenspiel in zeitlich- und räumlich konzertierten Prozessen, ist ein aktueller Schwerpunkt in der Entwicklungs- und Stammzellbiologie. Aufgrund ihres breiten Entwicklungspotentials und ihrer Manipulierbarkeit bilden Stammzellen der Neuralleiste ein geeignetes Modellsystem, um experimentelle Daten und damit neue Erkenntnisse in der Stammzellentwicklung zu gewinnen. Neuralleistenstammzellen lösen sich nach ihrer Entstehung vom Neuralrohr und wandern in verschiedene embryonale Strukturen ein. Dort beteiligen sie sich maßgeblich an der Bildung verschiedener neuraler und nicht-neuraler Zelltypen und Gewebe. Das Schicksal der Neuralleistenstammzelle kann *in vitro* durch verschiedene Signalwege beeinflusst werden, z.B. durch den TGF β Signalweg. Basierend auf konditioneller Gen-Inaktivierung im Mausmodell ist es möglich, die *in vivo* Funktion des TGF β Signalweges in der Entwicklung von Neuralleistenstammzellen und neuroepithelialer Stammzellen des Mittelhirns zu untersuchen.

Im ersten Teil meiner Dissertation beschreibe ich, wie die Neuralleisten-spezifische Ablation des TGF β Signalweges zu schweren Entwicklungsdefekten führt, die an ein DiGeorge Syndrom-Krankheitsbild erinnern (Wurdak et al., 2005). Die Hauptursache dieser vererbaren Krankheit ist eine interstitielle Mikrodeletion 22q11, die bei etwa 95 % der Betroffenen nachweisbar ist. Die aus der gestörten Entwicklung embryonaler Strukturen, vor allem des Kiemenbogensystems resultierenden Symptome sind unter anderem Spaltbildung (Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalte) in Kombination mit Herzfehlern (conotruncale Defekte) und Hypo- oder Aplasie der Nebenschilddrüse und des Thymus mit T-Zelldefekt und Immunschwäche. Wir haben herausgefunden, dass mutierte Neuralleistenzellen, die eine gezielte Inaktivierung des TGF β receptor type 2 (*Tgbr2*) Gens aufweisen, ebenso wie Wild-Typ-Neuralleistenzellen in das Kiemenbogensystem einwandern können. Dort angekommen zeigen sie allerdings Differenzierungsdefekte, welche die Bildung diverser nicht-neuraler Gewebe nachhaltig stören. Desweiteren konnten wir zeigen, dass Crkl, ein signal-leitendes Adapterprotein, in

1. ZUSAMMENFASSUNG

Neuralleistenzellen nur phosphoryliert und somit aktiviert werden kann, wenn der TGF β Signalweg aktiviert ist. Interessanterweise ist das *Crkl*-Gen ein DiGeorge-Syndrom-Kandidatengen und in der Region 22q11 lokalisiert. Insgesamt weisen unsere Resultate darauf hin, dass eine Verbindung zwischen der Modulation des TGF β Signalweges und der Ätiologie der Erkrankung besteht.

Neben dem DiGeorge Syndrom-Phänotyp weisen die *Tgfb2*-Mutanten Entwicklungsdefekte in den Augen auf (Ittner et al., 2005). Im zweiten Teil meiner Dissertation beschreibe ich die detaillierte Analyse der Augenanomalie, die wiederum nicht mit gestörter Migration von Neuralleistenzellen, dafür aber wieder auf Differenzierungsdefekte zurückzuführen ist. Wir konnten die Kontribution von Neuralleistenzellen zur Entwicklung mesenchymaler Strukturen im Auge verfolgen und zeigen, dass der TGF β Signalweg das Schicksal von postmigratorischen Neuralleistenzellen beeinflusst. Insbesondere konnten wir demonstrieren, dass TGF β -abhängige Differenzierungsprozesse mit Expression der Transkriptionsfaktoren *Foxc1* und *Pitx2* assoziiert sind. Beide Transkriptionsfaktoren sind in der Entstehung der menschlichen Augenkrankheit Axenfeld Rieger's Syndrom involviert. Deshalb liefert unser Mausmodell eine weitere molekulare Basis für experimentelle und klinische Ursachenforschung einer menschlichen Krankheit.

Zusammengefasst weisen unsere Resultate darauf hin, dass der TGF β Signalweg in Kombination mit dem zellulären Kontext, das Schicksal von Stamm- und Vorläuferzellen entscheidend beeinflussen kann (Wurdak et al., Übersichtsartikel, zur Publikation eingereicht). Diese Hypothese wird durch weitere Resultate, welche im 3. Teil dieser Dissertation beschrieben werden, gestärkt. *Tgbr2*-Mutanten zeigen eine drastische Expansion des Mittelhirns, welche auf eine so genannte Überproliferation und auf Kosten von Differenzierung neuroepithelialer Zellen, zurückzuführen ist (Wurdak et al., Manuskript zur Publikation eingereicht). Mutiertes Gewebe aus dem dorsalen Mittelhirn weist eine signifikant erhöhte Anzahl von neuralen Stammzellen in Kultur auf, die ein signifikant erhöhtes Selbsterneuerungspotential zeigen. Interessanterweise ist die erhöhte Selbsterneuerung der mutanten Neuroepithelzellen mit erhöhter Aktivität des kanonischen Wnt Signalweges assoziiert. Weiterhin kann TGF β , der von Wnt induzierten Proliferation von Neuroepithelzellen aus dem Mittelhirn, entgegenwirken. Deshalb könnte der TGF β Signalweg ein Schlüsselfaktor in der Stammzellentwicklung sein, der die Expansion von Stamzellen

1. ZUSAMMENFASSUNG

negativ reguliert und somit die Balance zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung entscheidend kontrolliert.

2. SUMMARY

My doctoral research has focused on mechanisms regulating the fate of progenitor and stem cells during vertebrate development. The generation of multiple cell types in the correct spatiotemporal manner involves complex interactions of extracellular and intracellular signals that are poorly understood. These issues can be addressed in neural stem cells of the brain, as well as in neural crest stem cells (NCSCs) that arise from the dorsal neural tube. NCSCs migrate in the growing embryo to various locations, giving rise to diverse neural and non-neural cell-types and tissues. One of the factors able to instruct NCSCs to adopt specific lineages *in vitro* is transforming growth factor β (TGF β). To elucidate the role of TGF β signaling in neural crest development *in vivo* and to address its impact on neural crest-related disease, I have used conditional inactivation of TGF β signaling in a mouse model. In addition, I have studied molecular mechanisms regulating the broad developmental potential of NCSCs in cell culture. Finally, I have investigated the role of TGF β signaling on neuroepithelial stem cells during midbrain/hindbrain development *in vivo* and *in vitro*.

In the first part of my thesis, I show that NCSC-specific ablation of TGF β signaling results in all the developmental malformations characteristic of DiGeorge syndrome (Wurdak et al., 2005). DiGeorge syndrome is a human congenital microdeletion syndrome characterized by cardiovascular, craniofacial, and thymus and parathyroid gland anomalies. The disease is attributed to disturbed formation of the pharyngeal apparatus, a transient vertebrate-specific structure. We could show that mutant neural crest cells migrate normally into the pharyngeal apparatus but are unable to acquire non-neural cell fates. Moreover, we found that TGF β signaling is required for phosphorylation of the signal adaptor protein Crkl, which is associated with development of human DiGeorge syndrome. Importantly, this finding indicates a link of TGF β signal modulation to the etiology of DiGeorge syndrome.

In addition to the DiGeorge syndrome-like phenotype, we found that neural crest-specific TGF β signal ablation resulted in severe developmental eye defects (Ittner et al., 2005). In the second part of my thesis I illustrate how malformations of anterior eye structures are again associated with impaired differentiation, but not with migration of mutant neural crest-derived progenitor cells. We have revealed distinct contributions of neural crest cells to anterior and posterior mesenchymal murine eye structures, and show that TGF β signaling in these cells is

2. SUMMARY

crucial for normal eye development. Moreover, we have demonstrated that TGF β -dependent differentiation is mediated by the transcription factors Foxc1 and Pitx2. Both transcription factors are implicated in human Axenfeld-Rieger's anomaly. Thus, our findings shed new light onto the origin of eye disorders that can give rise to glaucoma and blindness.

Taken together, our findings indicate an important role for TGF β signaling in the context-dependent regulation of progenitor and stem cell fate (Wurdak et al., invited review, manuscript submitted). This hypothesis is strengthened by the fact that *Tgfb2*-mutant embryos also display a drastic midbrain phenotype, as illustrated in part 3 of my thesis. This phenotype is due to the significant expansion of proliferating neuroepithelial cells, while differentiation is reduced (Wurdak et al., manuscript submitted). Strikingly, mutant tissue harbors an increased number of self-renewing, multipotent neural stem cells as assessed in neurosphere culture. The self-renewing proliferation of mutant neural stem cells is associated with enhanced activation of canonical Wnt signaling *in vitro* and *in vivo*. Moreover, TGF β signaling can antagonize Wnt-induced neuroepithelial cell proliferation. In summary, TGF β signaling may be a key factor negatively controlling stem cell pool expansion, and the balance of neural stem cell proliferation and differentiation during midbrain development.