

## ***Nederlandse samenvatting***

Embryonale stamcellen (ES cellen) zijn geïsoleerd uit een blastocyst embryo en kunnen alle celtypes van het volwassen lichaam vormen. Pluripotentie en zelfhernieuwing zijn de twee eigenschappen van ES cellen die ze interessant maken voor zowel fundamenteel als toegepast onderzoek: ES cellen delen ongelimiteerd in een kweekschaal en kunnen in cultuur hun ongedifferentieerd fenotype behouden gedurende een lange tijd. De omschakeling van deze cellen naar een specifiek fenotype, een mechanisme dat differentiatie genoemd wordt, kan geïnduceerd worden door toevoeging van externe stimuli aan het kweekmedium.

Omdat ES cellen afgeleid zijn van het embryo, kan differentiatie in een bepaalde richting worden gedirigeerd, gebaseerd op de moleculaire mechanismen die in het embryo gevonden werden. Daarom is ES celdifferentiatie niet alleen een werktuig om volwassen, functionele cellen te bekomen maar ook een manier om de exacte moleculaire mechanismen te begrijpen die leiden tot een bepaald celtype.

Het hoofddoel van deze thesis was om een *in vitro* systeem te ontwikkelen gebaseerd op ES celdifferentiatie, dat ons kon toelaten om de moleculaire mechanismen die nodig zijn in de vorming van mesoderm, een gebeurtenis die noodzakelijk is in de vroege ontwikkeling te bestuderen. Problemen in mesodermvorming leiden bijvoorbeeld tot de afwezigheid van hart of spieren.

Eerst en vooral moest een methode ontwikkeld worden die ons zou toelaten om ES celdifferentiatie te volgen en die veranderingen in de gedifferentieerde celpopulatie zou kunnen detecteren. In het vroege embryo kunnen de meeste van de gevormde weefsels gekarakteriseerd worden aan de hand van de expressie van een specifiek merker. Daarom hebben we een accurate kwantitatieve reverse transcriptie PCR-benadering ontwikkeld die de activiteitsniveaus van deze merker genen kan detecteren.

Door het systeem van ES celdifferentiatie te gebruiken als een *in vitro* model van het muisembryo, konden we de rol van Nodal, Wnt, Bmp en FGF in het muisembryo bevestigen, wat suggereert dat het ES celsysteem inderdaad kan gebruikt worden als een *in vitro* benadering van het muisembryo.

Door verschillende kweekmethododes te gebruiken konden we in ES celdifferentiatie aantonen dat er een evenwicht bestaat tussen agonisten (Wnt, Bmp en Nodal) en antagonist (Cer1, Lefty1, Sfrp1/5 en Dkk1) hetgeen respectievelijk resulteert in de

vorming van mesoderm en neuroectoderm, wat vergelijkbaar is met de anterior-posteriore as in het muisembryo. Daarenboven konden we een aantal nieuwe functies aantonen voor Nodal, Bmp en FGF, die niet geïdentificeerd werden in de muis door de vroege sterfte van hun homozygote mutanten. Patterning van het mesoderm bleek gecontroleerd te zijn door een evenwicht tussen Bmp4 en Nodal, wat respectievelijk leidde tot de vorming van posterieur en anterior mesoderm. Bovendien konden we ook aantonen dat Nodal als een morphogen optrad om mesoderm te differentiëren naar mesoderm of endoderm. Niet alleen Bmp4 of Nodal hadden belangrijke functies in mesoderm patterning, aangezien de patterning geïnduceerd door Nodal of Bmp4 door de inhibitie van FGF activiteit geblokkeerd werd. Deze resultaten toonden aan dat FGF dus een belangrijke rol heeft in de mesenchymale transformatie van de nieuwgevormde mesoderm cellen.

Ter conclusie konden we aantonen dat ES cellen inderdaad kunnen gebruikt worden als een *in vitro* model van het muisembryo, wat ons toeliet om nieuwe functies te ontdekken die niet konden worden blootgelegd in de *in vivo* situatie. Aan de andere kant suggereert dit werk dat wanneer we de moleculaire mechanismen uit het embryo nabootsen in ES celdifferentiatie, functionele volwassen cellen kunnen bekomen worden, wat dan direct kan toegepast worden in klinische benaderingen.

## ***English summary***

Embryonic stem (ES) cells are derived from a blastocyst embryo and can give rise to all cell types of the adult body. Pluripotency and self-renewal are the two features that makes ES cells attractive to fundamental as well as clinical research: they divide unlimitedly in a culture dish and retain their undifferentiated phenotype for extended periods of culture. Conversion of these cells to a specific phenotype, a process called differentiation, can be initiated by external stimuli added to the culture medium.

Since ES cells are derived from embryos, differentiation towards a certain fate could be induced by molecular mechanisms similar to the ones found in the embryo. Therefore, ES cell differentiation might not only be a tool to obtain mature cell types by applying the knowledge of the embryo, but also a way to understand the exact molecular mechanisms that lead to the formation of a specified cell in the embryo.

The main aim of this thesis was to develop *in vitro* assays based on ES cells that would allow us to study the molecular mechanisms that are required in the mouse for mesoderm formation, an event that is essential in early development. Defects in mesoderm generation lead to for example aberrant muscle or heart formation.

First, we had to set up a system that would allow us to monitor ES cell differentiation and that could detect alterations in the fate of differentiated cells. In the early embryo, most of the tissues formed can be marked quite specifically by the expression of a marker gene. Therefore, an accurate quantitative reverse transcriptase PCR approach was developed to detect the activity levels of these marker genes during ES cell differentiation.

By applying the ES cell differentiation system as an *in vitro* assay of the mouse embryo, we were able to confirm the roles of Nodal, Wnt, Bmp and FGF in the mouse embryo, suggesting the ES cell system indeed represented the mouse embryo in a culture dish.

By using different ES cell culture systems we could demonstrate that there was a balance between agonists (Wnt, Bmp, Nodal) and antagonists (Cer1, Lefty1, Sfrp1/5 and Dkk1) leading to the formation of mesoderm and neuroectoderm, respectively, in similarity to the anterior-posterior axis of the mouse embryo. Moreover, we identified several other roles for Nodal, Bmp4 and FGF signaling, which could not be revealed in the mouse embryo because of early lethality of their homozygous mutants. Mesoderm patterning appeared to be controlled by an equilibrium between Bmp4 and

Nodal, leading to the formation of posterior and anterior mesoderm respectively. Additionally, Nodal acted morphogenically to alter mesendoderm cells towards mesoderm or endoderm. Not only Bmp4 or Nodal had important functions during patterning of the mesoderm, as formation of mesendoderm by Nodal or posterior mesoderm by Bmp4 was impaired in absence of FGF signaling, revealing an important role for FGF in the epithelial to mesenchymal transition of newly formed mesoderm cells.

In conclusion, we were able to demonstrate that ES cells can indeed be used as an *in vitro* model of the mouse embryo, allowing the discovery of new functions that could not be identified in the *in vivo* situation. Alternatively, this work suggests that when the molecular signaling of the embryo is mimicked in ES cell differentiation, specific cell types can be obtained, directing this idea towards clinical approaches.