

Ectopic expression of the neural cell adhesion molecule L1 in differentiated CNS glial cells of adult mice

Doctoral Thesis

Author(s):

Mohajeri, M. Hasan

Publication date:

1993

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000935456>

Rights / license:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

15. März 1994

Diss. ETH Nr. 10435

**Ectopic expression of the neural cell adhesion molecule L1 in
differentiated CNS glial cells of adult mice**

ABHANDLUNG

Zur Erlangung des Titels

DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN

der

EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZÜRICH

vorgelegt von

M. Hasan Mohajeri

Dipl. Biochemiker, Universität Zürich

geboren am 22.12. 1963

in Daragaz, Iran

Angenommen auf Antrag von:

Prof. Dr. M. Schachner, Referent

Prof. Dr. U. Suter, Korreferent

1993

M. Schachner
10.3.94

1. Summary

In this work the generation of transgenic mice producing the neural cell adhesion molecule L1 specifically in their differentiated astrocytes is reported. The control elements of the glial fibrillary acidic protein (GFAP) gene were used to direct the transgenic expression into the astrocytes. Three different transgenic lines expressing different levels of transgene-derived mRNA and L1 protein were established. The ectopic L1 expression in these lines was examined by Northern blot analysis, *in situ* hybridization and immunostaining. Northern blot analysis revealed the expected mRNA length of about 4.2 kb. The distribution of L1 mRNA was shown by *in situ* hybridization to resemble that of GFAP mRNA in transgenic animals. Comparison of L1 and GFAP immunostaining showed an identical pattern of immunoreactive cells. Immunostaining of living astrocytes from transgenic animals with anti-L1 antibodies localized the transgenic expression on the cell surface, whereas the astrocytes from wild type animals were L1-immunonegative. *In situ* hybridization and quantitative Western blot analysis demonstrated an up-regulation of L1 expression at the mRNA and protein levels after lesioning of the optic nerve, which can be explained by the activation of astrocytes. The number of astrocytes which express L1 and the strength of the L1 *in situ*-hybridization signal was similar in different animals of the same transgenic line, but varied among different transgenic lines. This variability in transgene expression levels in different lines is related to a number of factors including different integration sites in the genome. Taken together, these data demonstrate a cell-type specific ectopic expression of L1 in astrocytes.

Cryostat sections of lesioned and unlesioned optic nerves and astrocyte monolayers prepared from transgenic animals were more potent in promoting neurite outgrowth when compared to wild type nerves or astrocytes, respectively. The neurite outgrowth-promoting activity correlated to the level of the transgenically expressed L1 in normal nerves. After a lesion the expression level of the L1 protein in line 3426 was about 25% higher than in the line 3427 and the maximal neurite outgrowth promoting activity for both lines was four fold greater than in the wild type. This finding indicates a saturation of neurite outgrowth-

promoting activity of the transgenic CNS or a steady state between myelin-associated inhibitory molecules and neurite outgrowth-promoting activity of transgenic tissue. The neurite outgrowth-promoting activity on transgenic optic nerves is L1 dependent since it can be inhibited by L1 antibodies.

These observations attribute a significant role to L1 in the promotion of neurite outgrowth on glia and myelinated substrates derived from transgenic animals. The enhancement of neurite outgrowth on glial cells that do not normally express L1 *in vivo* indicates that glial cells of the adult mammalian central nervous system can be made more conducive to neurite outgrowth. Our observations make it likely that the inhibitory action of these molecules can be overcome by the neurite outgrowth promoting properties of ectopically expressed L1. It is noteworthy in this respect that expression of L1 by astrocytes is able to compensate for the inhibitory effect of another cell type, namely that of oligodendrocytes. Thus, it appears as if permissive and non-permissive cues need not be localized on the same cell for neurite outgrowth to occur, but can be partitioned among different cell types.

The transgenic mouse lines appear to be a useful tool for analyzing the potential of neurite outgrowth promoting recognition molecules in overcoming inhibitory influences of glial cells in the central nervous system of adult mammals. Furthermore these animals will offer some experimental possibilities for analyzing the mechanisms underlying the lack of regeneration in the differentiated mammalian central nervous system.

2. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wird die Erzeugung von transgenen Mäusen, die das neuronale Zelladhäsionsmolekül L1 spezifisch in ihren ausdifferenzierten Astrozyten exprimieren, beschrieben. Ein GFAP-genomischer Klon der Maus wurde für die astrozytenspezifische Expression benutzt. Drei transgene Linien wurden etabliert, die sich in ihrer L1 Expressionsstärke auf der mRNA- und Proteinebene unterschieden. Die ektopische L1 Expression dieser Linien wurde durch Northern Blot Analyse, *in situ* Hybridisierung und Immunofärbung untersucht. Die erwartete 4.2 kb mRNA-Bande wurde in Northern Blot Analyse detektiert. Die L1 *in situ* Hybridisierung von transgenen Tieren wies eine ähnliche Verteilung der L1 und GFAP mRNA positiven Zellen auf. Identisch war auch die Verteilung von L1 und GFAP immunoreaktiven Zellen in transgenen Tieren. Die Immunofärbung von lebenden Astrozyten transgener Tiere wies eindeutig auf die Expression von L1 auf der Zelloberfläche hin. Die Zellen von Wildtyp-Tieren zeigten keine L1 Immunreaktivität. *In situ* Hybridisierung und quantitative Western Blot Analyse demonstrierten bei transgenen Tieren eine Hochregulation von L1 Expression auf der mRNA- und Proteinebene nach der Läsion von optischen Nerven. Dies kann mit der Aktivierung von Astrozyten nach der Läsion erklärt werden. Die Anzahl von L1 exprimierenden Zellen und die Stärke des L1 *in situ* Signals waren identisch in den Tieren der selben transgenen Linie. Es gab aber Unterschiede diesbezüglich zwischen den verschiedenen Linien. Diese Variabilität in der transgenen Expressionsstärke zwischen den Linien könnte von verschiedenen Faktoren, z.B. von dem Integrationsort des Konstrukts im Genom, abhängig sein. Alle diese Daten bestätigen eine zelltyp-spezifische, ektopische Expression von L1 in Astrozyten.

Cryostatschnitte von lädierten und unlädierten optischen Nerven und Astrozytenkulturen aus transgenen Tieren waren mehr befähigt, das Wachstum von Neuriten zu fördern, als diejenigen der Wildtyp-Tiere. Diese neuritenwachstumsfördernde Aktivität korrelierte mit der Höhe des transgen exprimierten L1. Obwohl nach der Läsion die Expressionshöhe des L1 Proteins in der Linie 3426 um etwa 25% höher war als in der Linie 3427, wurde für beide Linien eine maximale neuritenwachstumsfördernde

Aktivität (Vierfaches des Wildtyps) gemessen. Dies deutet auf eine Sättigung dieser Aktivität im zentralen Nervensystem (ZNS) der transgenen Tiere hin oder auf einen Gleichgewichtszustand zwischen den Glia-assoziierten inhibitorischen Molekülen und der neuritenwachstumsfördernden Eigenschaft des transgenen Gewebes. Diese Eigenschaft des transgenen Gewebes ist L1 abhängig, weil L1 Antikörper diese Aktivität inhibieren, während andere Antikörper keinen Einfluss ausüben.

Diese Beobachtungen schreiben dem ektopisch exprimierenden L1 eine signifikante Rolle in der Förderung des Neuritenwachstums auf Gliazellen und myelinisiertem Gewebe von transgenen Tieren zu. Dies zeigt auch, dass Gliazellen und Gewebe von adulten Säugern, die sonst *in vivo* kein L1 exprimieren, zu erhöhter Neuritenwachstumsförderung veranlasst werden können. Die Resultate dieser Arbeit zeigen weiter, dass die inhibitorische Aktivität des ZNS von adulten Säugern durch die neuritenwachstumsfördernde Wirkung von ektopisch exprimiertem L1 überspielt werden kann. In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu betonen, dass die Expression von L1 in Astrozyten die inhibitorischen Einflüsse auch von einem anderen ZNS Gliazelltyp, nämlich den Oligodendrozyten, kompensieren kann. Es scheint also, dass für die Beeinflussung des Neuritenwachstums die permissiven und nicht-permissiven Faktoren nicht auf dem gleichen Zelltyp lokalisiert sein müssen.

Die transgenen Tiere scheinen somit ein gutes Modell für die Untersuchung des neuritenwachstumsfördernden Potentials von Zellerkennungsmolekülen als Gegenspieler zu inhibitorischen Einflüssen von Gliazellen des ZNS von adulten Säugern zu sein. Diese transgenen Tiere werden Möglichkeiten eröffnen zur Untersuchung der Mechanismen, die fehlenden regenerativen Prozessen im ausdifferenzierten ZNS von Säugertieren zu Grunde liegen.