

Diss. ETH No. 10808

Isolation and Characterization of New Oligodendrocyte and Myelin Genes by Differential Screening of a cDNA Library

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY
ZURICH

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
NICOLE SCHAEAREN-WIEMERS
Dipl. Natw. ETH
born 23. June 1962
citizen of Guggisberg (BE) and Basle

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. H.M. Eppenberger, examiner
Prof. Dr. M.E. Schwab, co-examiner

1994



CatE

ETHICS ETH-BIB



00100002460782

Abstract

Oligodendrocytes are the macroglial cells of the central nervous system (CNS) which produce the myelin sheaths around axons. In the spinal cord these cells are derived from a distinct population of ventrally located glial precursors which start to differentiate first in the ventral horn of the cervical segments at embryonic day 15. Myelin formation starts at birth in the ventral and dorsal funiculi and proceeds with precise timing in specific fiber tracts. This fact suggests the existence of specific regulatory mechanisms for oligodendrocyte differentiation and the expression of myelin-specific genes. These mechanisms are far from being known at present. But important roles have been shown of several growth and neurotrophic factors, of the transcription factor SCIP and of certain second messengers. The myelin forming cell in the peripheral nervous system (PNS) is the Schwann cell. Its precursors are derived from the neural crest and start to differentiate in the sciatic nerve at E14-15.

Myelinogenesis is a complex process involving coordinate expression of myelination-related proteins such as myelin basic protein (MBP), proteolipid protein (PLP), myelin associated glycoprotein (MAG), 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNP), myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG), oligodendrocyte-myelin glycoprotein (OMgp) and myelin oligodendrocyte specific protein (MOSP) as well as several enzymes for the synthesis of myelin specific lipids like galactocerebrosides (GC) and sulfatides. MOG, OMgp and MOSP are only expressed by oligodendrocytes, while the other proteins are also expressed by Schwann cells. In addition, oligodendrocytes express proteins which inhibit neurite outgrowth and are involved in the inability of nerve fibers to regenerate after lesion in the CNS.

To understand more about oligodendrocyte differentiation and myelin formation, we embarked on the isolation of new oligodendrocyte-specific genes. We differentially screened a postnatal rat spinal cord cDNA library for clones that hybridized with a probe derived from normal spinal cord but did not hybridize with a probe derived from spinal cord which was free of oligodendrocytes. We succeeded in the isolation of several genes expressed by oligodendrocytes. Four genes are exclusively expressed by oligodendrocytes; three of these are not related to known genes, whereas one encodes the myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG). Four other genes are expressed by oligodendrocytes as well as by Schwann cells. Those genes are either related to known genes or were previously isolated but not known to be specifically expressed by myelinating cells. One gene codes for apolipoprotein D which is thought to be involved in lipid metabolism. A second cDNA sequence is the Ceramide-UDP galactosyltransferase, an enzyme which is involved in glycosylation of ceramide to galactocerebroside, a myelin-specific glycolipid. The third gene encodes a small protein with four putative transmembrane domains which is related to a T-lymphocyte-specific membrane protein, MAL. The functional role of this protein might be similar to that of other four transmembrane domain myelin proteins, like PLP and peripheral myelin protein 22 (PMP-22). The fourth gene encodes the rat homologue of the stearyl-CoA-desaturase 2 gene (SCD2). It is specifically expressed in the nervous system and involved in the synthesis and regulation of long chain unsaturated fatty acids, which are essential for

myelination. Finally, we found that a member of the β tubulin family is highly expressed in oligodendrocytes as well as neurons.

The identification of several new proteins which may play a role in oligodendrocyte and Schwann cell differentiation, in myelin synthesis and sheath formation will lead to new insight into this complex mechanism. The sequence homology of some of the isolated cDNAs to genes outside of the nervous system might provide an indication for the function of their corresponding protein in a myelinating cell.

Kurzfassung

Oligodendrocyten bilden die isolierende Myelinscheide um die Nervenzellfortsätze im Zentralnervensystem (ZNS). Sie stammen von Vorläuferzellen ab, welche sich im Rückenmark am 15. Tag in der Embryonalentwicklung im ventralen Horn des zervikalen Segmentes zu differenzieren beginnen. Die Myelinbildung beginnt bei Geburt im Vorder- und Hinterstrang und erfasst verschiedene Nervenbahnen zu genau definierten Zeitpunkten. Dieser kontrollierter Vorgang ist Ausdruck von spezifischen Regulationsmechanismen, welche die Oligodendrocytendifferenzierung und die Expression von Myelin-spezifischen Genen regulieren. Diese Mechanismen sind noch weitgehend unverstanden, aber es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Wachstumsfaktoren, der Transkriptionsfaktor SCIP und gewisse Zweitboten-Systeme eine wichtige Rolle dabei spielen. Die myelinbildenden Zellen im peripheren Nervensystem (PNS) sind die Schwannschen Zellen. Ihre Vorläuferzellen stammen von der Neuralleiste ab und beginnen sich im Nerv ischiadicus zwischen dem 14. und 15. Tag der Embryonalentwicklung zu differenzieren.

Die Myelinbildung ist ein komplexer Vorgang, der einhergeht mit einer koordinierten Expression von bestimmten Myelinproteinen wie MBP, PLP, MAG, CNP, MOG, OMgp und MOSP sowie von Enzymen, welche bestimmte myelinspezifische Fettsäuren synthetisieren (z.B. Galactocerebroside (GC) und Sulfatid). MOG, OMgp und MOSP sind Myelinproteine, welche nur von Oligodendrocyten hergestellt werden; dagegen werden die anderen Myelinproteine auch von Schwannschen Zellen exprimiert. Die Oligodendrocyten exprimieren zusätzlich noch Proteine, welche das Nervenwachstum hemmen. Diese Wachstumsinhibitoren tragen zur schlechten Regeneration von Nervenfasern nach einer Läsion im ZNS bei.

Um das Verständnis der Oligodendrocytendifferenzierung und der Myelinbildung zu erweitern, haben wir uns entschlossen, neue Oligodendrocyten-spezifische Gene zu isolieren. Wir haben in einer Rückenmark-cDNA Bank differenziell nach Klonen gesucht, die mit einer Probe von normalem Rückenmark hybridisieren, aber nicht mit einer Probe, welche von Oligodendrocyten-freiem Rückenmark stammte. Auf diese Weise konnten wir mehrere von Oligodendrocyten exprimierte Gene identifizieren. Vier dieser Gene werden nur von Oligodendrocyten exprimiert; drei von ihnen zeigten keine Homologie zu anderen Genen auf; eines war das Gen für MOG. Vier andere Gene werden von Oligodendrocyten und Schwannschen Zellen exprimiert. Diese Gene sind entweder verwandt mit bekannten Genen oder wurden schon früher isoliert, aber es war nicht bekannt, dass sie von myelinisierenden Zellen exprimiert werden. Ein Gen kodiert für Apolipoprotein D (Apo D), welches wahrscheinlich eine Rolle im Fettsäuremetabolismus und -transport spielt. Eine zweite cDNA Sequenz ist identisch zu der kürzlich isolierten Ceramid UDP-Galactosyltransferase, ein Enzym, welches die Glycosylierung von Ceramid zu Galactocerebroside (eine myelinspezifische Fettsäure) katalysiert. Das dritte Gen kodiert für ein kleines Protein, welches vier transmembrane Domänen hat und mit einem Protein verwandt ist, das aus menschlichen T-Lymphocyten isoliert worden ist (MAL). Die Funktion dieses Proteines könnte ähnlich zu anderen Myelinproteinen mit vier transmembranen Domänen sein, wie zum Beispiel PLP und das periphere Myelinprotein PMP-22. Das vierte Gen kodiert für die Stearyl-CoA-Desaturase 2 (SCD2), welche in Maus schon kloniert wurde. Dieses Enzym ist spezifisch

im Nervensystem exprimiert und reguliert die Synthese von langkettigen, ungesättigten Fettsäuren, welche für die Myelinisierung essentiell sind. Zusätzlich haben wir ein Gen identifiziert, welches ein Subtyp der β Tubulin-Gen Familie ist. Dieses Gen ist in Oligodendrocyten und in Neuronen des ZNS stark exprimiert.

Die Identifizierung von neuen Proteinen, welche eine Rolle in der Myelinsynthese und Herstellung der Myelinscheide spielen, können dazu beitragen, uns einen neuen Einblick in diesen komplexen Vorgang geben. Sequenzen, die Homologien mit Genen ausserhalb des Nervensystems aufweisen, können uns Hinweise auf mögliche Funktionen in einer myelinisierende Zelle geben.