

DISS. ETH No. 11324

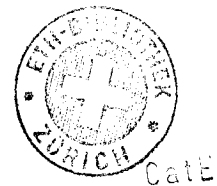
**F11/contactin: extracellular and
intracellular connections**

A DISSERTATION SUBMITTED TO THE
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY

FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF NATURAL SCIENCES

PRESENTED BY

LUCA D'ALESSANDRI
DIPL. NATW. ETH
BORN 17TH NOVEMBER 1965
CITIZEN OF CALPIOGNA, TICINO



ACCEPTED ON THE RECOMMENDATION OF
PROF. DR. K. H. WINTERHALTER, EXAMINER
PROF. DR. P. SONDEREGGER, COEXAMINER
DR. L. VAUGHAN, COEXAMINER

1995

Summary

The neural immunoglobulin-like cell adhesion molecule F11/contactin and the extracellular matrix glycoprotein tenascin-C are prominent molecules in the developing nervous system which interact in *in vitro* assays (Zisch et al., J. Cell Biol. 119, 203-213). To determine their potential role in neural development, the distribution of tenascin-C and F11/contactin was examined in the developing chick retina. The onset of both tenascin-C and F11/contactin expression coincides with the appearance of ganglion cell dendrites and neurites from bipolar and amacrine cells in the inner plexiform layer (IPL) at E8, and the extension of bipolar and horizontal cell processes in the outer plexiform layer (OPL) at E9. F11/contactin expression is coordinately upregulated with the tenascin-C isoforms 190 and 200 kD between E8 and E17, while little, if any, of the 220 kD isoform, which does not bind F11/contactin, is detected. *In situ* hybridization reveals that tenascin-C and F11/contactin mRNAs are synthesized by different neuronal cell types. Tenascin-C RNA probes hybridize to amacrine and displaced amacrine neurons, and horizontal neurons. In cultured retinal cells, tenascin-C is also present on process-bearing neurofilament-positive cells. F11/contactin mRNA is detected in bipolar cells or their precursors from E8-9, and later in horizontal and ganglion neurons. The highest levels and greatest overlap in the synaptic IPL and OPL are reached at E17, when the stratification of the retina is nearly complete. These results are consistent with a putative role for F11/contactin-tenascin-C interactions in the establishment of synaptic layers in the retina.

To gain further insights into the F11/contactin-tenascin interaction, we decided to look at the potential signal transduction mechanism of F11/contactin. To address this question, we compared kinase activities in detergent-resistant immune-complexes of F11/contactin and the related, but transmembrane Ng-CAM in embryonic chick brain cells. We show that the cytoplasmic, non-receptor *src*-family tyrosine kinase *fyn* specifically complexes with F11/contactin, but not with Ng-CAM. Although both *fyn* and the related *src* kinase are abundant in embryonic chick brain, only *fyn* associates with F11/contactin. Antibody-mediated cross-linking of F11/contactin on embryonic chick neuronal cells leads to an increase

of the fyn-activity co-precipitated with F11/contactin, and elevated phosphorylation of an additional 75/80 kD component within the F11/contactin-immune-complex. To demonstrate the physical link between F11/contactin and fyn, we combined co-capping experiments with immunofluorescence microscopy on HeLa cells transfected with F11/contactin. Binding of ligands, *i.e.* F11/contactin-specific antibody or tenascin-R to the surface of transfectants, causes capping of F11/contactin and a concomitant change in the distribution of the intracellular kinase fyn. Together with our biochemical data, these results strongly suggest that F11/contactin-tenascin mediated neuronal signalling occurs via a pathway involving fyn.

Zusammenfassung

Das neuronale Immunglobulin-ähnliche Zelladhensionsmolekül F11/contactin und das extrazelluläre Matrix Glycoprotein Tenascin-C sind wichtige Moleküle des zentralen Nerven Systems, die in *in vitro* Untersuchungen miteinander interagieren (Zisch et al., J. Cell Biol. 119, 203-213). Um ihre mögliche Rolle im neuronalen Entwicklung zu bestimmen, wurde die Verteilung von Tenascin-C und F11/contactin in der sich entwickelnden Retina untersucht. Die beginnende Expression von Tenascin-C und F11/contactin stimmt mit dem Erscheinung von Dendriten aus Ganglionzellen und Neuriten aus Bipolar- und Amacrinzellen in der inneren plexiformen Schicht (IPL) ab E8 und mit der Extension von Auswüchsen aus Bipolar- und Horizontalzellen in der äusseren plexiformen Schicht (OPL) ab E9 überein. Die koordinierte Expression von F11/contactin und Tenascin-C Isoformen 190 und 200 kD ist zwischen E8 und E17 aufreguliert. Die Tenascin-C Isoform 220 kD kann indessen nicht, oder nur geringfügig nachgewiesen werden. *In situ* Hybridisation Untersuchungen zeigt, dass Tenascin-C und F11/contactin mRNS von verschiedenen Neuronen synthetisiert werden. Tenascin-C RNS Sonden hybridisieren mit Amacrin-, "displaced" Amacrin- und Horizontalzellen. Tenascin-C ist auch in Retinalzell-kultur auf auswuchstragende neurofilament-positiven Zellen vorhanden. F11/contactin mRNS ist in Bipolarzellen oder in ihren Vorläuferzellen am E8-9, und später in Horizontal- und Ganglionzellen zu finden. Die höchste Menge und grösste Ueberlappung in der synaptischen IPL und OPL sind am E17 erreicht, wenn die Retinalschichtung fast abgeschlossen ist. Diese Resultate deuten auf eine mögliche Rolle der F11/contactin-Tenascin-C Interaktion im Aufbau der synaptischen Schichtung der Retina.

Um weitere Einblicke in die F11/contactin-tenascin Interaktion zu erhalten, haben wir uns entschieden, nach der möglichen Signalübertragung von F11/contactin zu suchen. Um diese Fragestellung anzugehen, haben wir die Kinasen Aktivitäten mittels detergent-resistenten Immunkomplexen von F11/contactin und vom verwandten aber transmembranären Ng-CAM aus embryonalen Gehirnzellen verglichen. Wir zeigen, dass die cytoplasmatische, nicht-Receptor src-Familie Tyrosine Kinase fyn spezifisch mit F11/contactin nicht aber mit Ng-CAM komplexiert. Obwohl fyn und die verwandte

src-Kinase reichlich im embryonalen Hühnerhirn vorhanden sind, assoziiert nur fyn mit F11/contactin. Antikörpervermitteltes "cross-linking" von F11/contactin auf embryonalen Hühnerneuronen führt zur Zunahme der fyn-Aktivität im immungefällten F11/contactin und zur Erhöhung der Phosphorylierung einer zusätzlichen 75/80 kD Komponente im F11/contactin Immunkomplex. Um die physikalische Verbindung zwischen fyn und F11/contactin nachzuweisen, haben wir "co-capping" Experimente mit Immunfluoreszenzmikroskopie auf mit F11/contactin transfektierten HeLa Zellen kombiniert. Die Bindung von Liganden, wie spezifische Antikörper gegen F11/contactin oder tenascin-R, an der Oberfläche von transfektierten HeLa Zellen verursacht das "capping" von F11/contactin und eine begleitende Verteilungsänderung der intracellulären Kinase fyn. Diese Resultate, zusammen mit den biochemischen Daten sind starke Hinweise für eine durch fyn vermittelte F11/contactin-tenascin neuronale Signalübertragung.