

Diss. ETH N° 13375

# Mechanisms of neuronal apoptosis and axon growth

---

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of  
Doctor of Natural Science

presented by

**Valeria Gagliardini**

Dipl. Biochemical Research  
born in Milano the 25 July 1966  
citizen of Italy

accepted on the recommendation of

**Prof. Martin E. Schwab,**            **examiner**

**Prof. Ueli Suter,**                **co-examiner**

1999

## THESIS SUMMARY

In chapter 2 a new function for the axon guidance molecule Semaphorin III (SemaIII) is presented. SemaIII not only induces growth cone collapse, but upon prolonged exposure, also kills nerve growth factor (NGF)-dependent sensory neurons. The SemaIII death signal overcomes trophic factor survival signals, and induces apoptosis in a selective manner. NGF-dependent neurons but not Neurotrophin-3 (NT-3)-dependent neurons are killed. The data in chapter 3 show that the axonal Growth Associated Protein -43 (GAP-43) and SemaIII can function in the same signal transduction pathway(s). In late embryonic NGF-dependent sensory neurons absence of GAP-43 diminishes the sensitivity to SemaIII-induced growth cone collapse. Evidence is presented that GAP-43 is also involved in neuronal death. We demonstrated that absence of GAP-43 can prevent SemaIII-induced death and is beneficial for survival of trophic factor deprived neurons. In absence of GAP-43 also postnatal Purkinje cells are more resistant to death. This is the first report directly showing that axon guidance molecules influence neuronal survival.

The data presented in chapter 4 demonstrate that caspase-1-like proteases and interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ) are important for programmed cell death in fibroblasts and sensory neurons. This is the first report showing that nuclear localization of activated caspase-1-like proteases also occurs in dying primary cells, including neurons. Caspase-1 translocation and neuronal death induced by trophic factor deprivation can be blocked by overexpression of a dominant negative caspase-1 point mutant and reduced by inhibiting the function of the IL-1 receptor using the interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra). In DRG neurons the IL-1Ra alone can only partially protect against trophic factor deprivation and SemaIII-induced death. The same is true for the universal caspase inhibitor zVAD alone. The additive effect of IL-1Ra and zVAD in preventing SemaIII-induced death in sensory neurons suggests that more than

one inhibitor is required to effectively prevent death induced by an exogenous death factor in neurons.

## RIASSUNTO DELLA TESI

Nel capitolo due è descritta una nuova funzione della molecola di guida per gli assoni Semaphorina III (SemaIII). La SemaIII non soltanto induce il collasso dei coni di crescita dei neuroni, ma è in grado, nonostante la presenza di fattori trofici come il nerve growth factor (NGF), di indurre la morte di neuroni sensoriali in seguito ad esposizione prolungata. Il segnale di morte indotto dalla SemaIII è selettivo e induce apoptosis (morte naturale) superaffando i segnali di sopravvivenza prodotti da fattori trofici. Neuroni dipendenti da NGF e non quelli dipendenti da Neurotrophin-3 (NT-3) vengono eliminati dalla SemaIII. Nel capitolo tre sono presentati dati che dimostrano che un'altra proteina coinvolta nella guida degli assoni, la Growth Associated Protein -43 (GAP-43), e la SemaIII agiscono sullo stesso meccanismo intracellulare. Nel periodo finale dello sviluppo embrionale di neuroni sensoriali di topo (E18), dipendenti da NGF, l'assenza della GAP-43 riduce la sensibilità al collasso dei coni di crescita. Inoltre viene descritto il coinvolgimento della GAP-43 nella morte di questi neuroni. L'assenza di questa proteina infatti protegge i neuroni da morte indotta sia dalla SemaIII che da mancanza di fattori trofici. Questo è il primo lavoro che descrive che molecole responsabili per la guida degli assoni, possono anche influenzare la sopravvivenza di specifiche popolazioni di neuroni.

Nel capitolo quattro sono presentati dati che dimostrano l'importanza di specifiche proteasi, le caspasi, e della citochina interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ), nella morte di neuroni sensoriali. Per la prima volta viene descritta la traslocazione nel nucleo di una protease simile alla caspase-1 (caspase-1-like proteases) in colture primarie di fibroblasti e di neuroni durante la morte cellulare. Inoltre, questa traslocazione può essere bloccata con la sovraespressione di un mutante della caspase-1, e ridotta inibendo la funzione del recettore per la interleukina utilizzando un antagonista (IL-1Ra). Nei neuroni dei dorsal root ganglia (DRG),

l'utilizzo dell' antagonista o di un inibitore universale delle caspasi zVAD da soli non è in grado di bloccare completamente la morte indotta sia da deprivazione di fattori trofici che dalla SemaIII, mentre utilizzando la combinazione dei due inibitori, IL-1Ra e zVAD, si riesce a prevenire completamente, o quasi, la morte indotta dalla SemaIII. Questi risultati suggeriscono che forse la combinazione di più inibitori è necessaria per combattere la morte neuronale indotta da fattori esogeni.