

Diss. ETH No. 13909

Nogo-A, a myelin-associated neurite growth inhibitor

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree
of Doctor of Natural Sciences

presented by
Andrea Huber Brösamle
Dipl.-Biol., Biozentrum, Universität Basel
born 7. Oktober 1972
Frenkendorf, BL
Arni, AG

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. M.E. Schwab, examiner
Prof. Dr. U. Suter, co-examiner

2000

Summary

Axonal re-growth after injury in the adult central nervous system (CNS) of higher vertebrates is generally very limited. Myelin-associated neurite outgrowth inhibitors have been found to play a crucial role in this lack of regeneration. The first chapter of this thesis gives an introduction to the field of neurite growth inhibitory molecules and the history of NI-35/250/ Nogo-A. Factors and signal transduction pathways that might be responsible for the poor regeneration capabilities of the injured CNS of adult mammalia are discussed. In the second chapter, the molecular cloning of Nogo-A is reported. The *nogo* gene codes for at least three major proteins: Nogo-A, -B and -C. New antisera raised against the recombinant Nogo-A, AS 472 and AS Bruna, could neutralize the neurite growth inhibitory properties of bovine myelin and allowed dorsal root ganglia neurons to extend neurites over oligodendrocytes in culture. Immunohistochemistry using these antisera and mAb IN-1 showed Nogo-A expression in oligodendrocytes of the adult spinal cord. Recombinant Nogo-A was inhibitory to neurite outgrowth in a mAb IN-1 sensitive manner. In chapter 3, the subcellular localisation of Nogo-A in cultured oligodendrocytes is described. Using different methods we could show that Nogo-A is present at the cell surface and that indeed the Nogo-A-specific part of the molecule is sticking out of the cell. Therefore, Nogo-A exists in two different topologies at the cell surface of oligodendrocytes with the Nogo-A-specific sequence intra- and extracellular. Immunocytochemistry on living cells resulted in a weak but consistent staining of the cell bodies, thick and thin processes of the oligodendrocytes. This was confirmed with functional in vitro assays by adding 3T3 fibroblasts or DRG neurons to oligodendrocyte cultures. Pre-incubation of the cultures with anti-Nogo-A antibodies neutralised the inhibitory properties of the oligodendrocytes specifically. Cell surface biotinylation builds the third line of evidence. However, from staining of permeabilized cells it is clear, that only a small portion of Nogo-A is found on the cell surface, the main part being intracellular. Double-labelling with marker proteins for the endoplasmic reticulum and Golgi complex revealed the association of Nogo-A with these two intracellular structures. In chapter 4 we describe the tissue distribution of the three Nogo isoforms in the developing and adult rat and after CNS lesions. Using immunohistochemistry and in situ hybridization, we found Nogo-A in oligodendrocytes of the mature CNS. Additionally, Nogo-A

expression was also found during development and in subtypes of neurons. In the cerebellum, the expression of Nogo-A in the premigratory but not in the proliferative zone of the external granule layer suggested a possible involvement of Nogo in migratory events. Chapter 5 describes a method for ectopically expressing genes in the adult lesioned spinal cord. We injected recombinant adenovirus carrying the reporter gene green fluorescent protein into the lesion site of an adult spinal cord. We showed that a successful infection of astrocytes, oligodendrocytes and neurons including motoneurons can be achieved with a moderate dosis of adenovirus with reporter gene expression over two weeks. The locomotor behavior of the animals receiving virus was undistinguishable from animals receiving a control injection. No increase in the immunoresponse was found as examination of CD8 positive cells and staining for GFAP showed. This sets the stage for introduction of adenoviral transfer of e.g. Nogo-A to different cells of the adult CNS.

Zusammenfassung

Im erwachsenen Zentralnervensystem (ZNS) höherer Vertebraten findet kaum Faserwachstum nach Verletzungen statt. Myelin-assoziierte Hemmstoffe des Nervenfaserswachstums sind in hohem Masse mitverantwortlich für dieses Fehlen von Regeneration. Das erste Kapitel dieser Doktorarbeit gibt eine Einleitung in molekulare Mechanismen, die das Wachstum von Nervenfasern hemmen können, sowie in die Geschichte von NI-35/250/Nogo-A. Faktoren und Signalwege, die verantwortlich sein könnten für die schlechten Regenerationseigenschaften des verletzten ZNS von erwachsenen Säugern werden diskutiert. Im zweiten Kapitel wird die molekulare Klonierung von Nogo-A beschrieben. Das *nogo* Gen kodiert für mindestens drei Hauptproteinprodukte: Nogo-A, -B und -C. Neue Antikörper gegen rekombinantes Nogo-A konnten sowohl die nervenfaserwachstumshemmenden Eigenschaften von Rindermylein wie auch von Rattenoligodendrozyten neutralisieren; so konnten Neuriten von Spinalganglienneuronen direkt über die Prozesse von Oligodendrozyten wachsen. Immunhistochemie mit diesen Antiseren und dem monoklonalen Antikörper IN-1 zeigten Nogo-A Expression in Oligodendrozyten des erwachsenen Rückenmarks. Weiter wurde gezeigt, dass rekombinantes Nogo-A das Auswachsen von Neuriten hemmt und zwar neutralisierbar durch IN-1. Im Kapitel 3 wird die subzelluläre Verteilung von Nogo-A in kultivierten Oligodendrozyten untersucht. Mit verschiedenen Methoden konnten wir zeigen, dass Nogo-A auf der Zelloberfläche exprimiert ist, und dass tatsächlich der Nogo-A spezifische Teil des Moleküls auf der Aussenseite der Zelle ist. Somit existiert Nogo-A in zwei verschiedenen Topologien auf der Zelloberfläche von Oligodendrozyten mit der Nogo-A-spezifischen Sequenz intra- oder extrazellulär. Immunocytochemie auf lebenden Zellen ergab eine schwache aber reproduzierbare Färbung der Zellkörper und der dicken und dünnen Fortsätze der Oligodendrozyten. Diese Lokalisierung wurde auch durch in vitro assays bestätigt: hierzu wurden 3T3 Fibroblasten oder Neuronen aus Spinalganglien zu Oligodendrozytenkulturen gegeben. Vorinkubation mit den anti-Nogo-A Antikörpern neutralisierte die hemmenden Eigenschaften der Oligodendrozyten spezifisch. Biotinylierungsexperimente bilden einen dritten Hinweis auf Oberflächenlokalisation. Von Färbungen permeabilisierter Oligodendrozyten wissen wir, dass nur ein kleiner Teil von Nogo-A auf der Zelloberfläche gefunden wird, der Hauptteil ist intrazellulär. Doppelfärbungen mit

Markerproteinen für Endoplasmatisches Reticulum und Golgikomplex zeigten die Assoziation von Nogo-A mit diesen beiden intrazellulären Strukturen. Kapitel 4 beschreibt das Verteilungsmuster der drei Nogo Isoformen während der Entwicklung und in der erwachsenen Ratte. Mittels Immunhistochemie und in situ Hybridisierung fanden wir, wie erwartet, Nogo-A in Oligodendrozyten des ausgereiften ZNS; aber auch während der Entwicklung konnten wir eine starke Expression beobachten. Ausserdem wurde Nogo-A auch in Subtypen von Neuronen gefunden. Im Kleinhirn deutet die Expression von Nogo-A in der prä-migratorischen aber nicht in der proliferativen Zone im der äusseren Keimschicht auf eine mögliche Rolle von Nogo in der Zellwanderung von Körnerzellen hin. Kapitel 5 beschreibt eine Methode für ektopische Genexpression im erwachsenen Rückenmark. Wir injizierten einen rekombinanten Adenovirus, der das Reportergen für green fluorescent protein (GFP) trug, in die Verletzungsstelle eines Rückenmarks. Mit diesem Experiment konnten wir zeigen, dass mit einer mittleren Dosis Adenovirus eine erfolgreiche Infektion von Astrozyten, Oligodendrozyten und Neuronen, inklusive Motoneuronen, möglich ist. GFP Expression war während zwei Wochen nach der Injektion sichtbar. Das Bewegungsverhalten der Tiere, die Virus erhielten unterschied sich nicht von denen mit Kontrollinjektion. Untersuchung der CD8-positiven Zellen und Färbung für GFAP zeigten, dass die Immunantwort ebenfalls nicht stärker ausgefallen ist. Damit ist die ektopische Expression von z.B. Nogo-A in verschiedenen Zellen des erwachsenen ZNS mittels Adenovirus prinzipiell möglich.