

DISS.ETH NO 15940

**Isolation, characterisation and functional analysis of two
novel cell adhesion molecules in the developing nervous
system**

A dissertation submitted to the
Swiss Federal Institute of Technology Zurich

For the degree of
Doctor of Natural Sciences

Presented by
Régis BABEY
Biologist, DEA ULP
Born July 9, 1974
Citizen of Switzerland

Accepted on the recommendation of
Prof. Martin Schwab, examiner
Prof. Ueli Suter, co-examiner
Prof. Esther Stoeckli, external co-examiner
Dr. Matthias Gesemann, external supervisor
2005

Summary

The nervous system represents the most complex organ system of the organism. Alone it contains more numerous types of cells, neurons and glia, than any other organ of the body. Various neuronal subtypes form a complicated network of connections with each other, which is the basis of all neurological performance. The accurate formation of these connections is a prerequisite for a correctly functioning brain, from the simplest sensory responses as reflexes to the most elaborated cognitive processes. The elaborate formation of these connections begins when immature neurons initiate the extension of axons. These axons extend into the embryonic environment and are guided by molecular cues called axon guidance molecules. Over the last fifteen years, the identification of numerous guidance molecules helps to understand and describe the fundamentals of axon guidance. However many axon guidance phenomena remain unexplained.

The major events influencing the formation of neuronal connections are reviewed in the **first chapter**. These events include the formation of neural tissues, neuronal migration, patterning of the nervous system and the formation of specific connections between neurons through axon guidance. This chapter particularly focuses on spinal cord and dorsal root ganglion development and introduces the major known axon guidance molecules.

Several types of connections between neurons are well described anatomically, while their formation is still poorly understood. In the **second chapter**, we report the identification and the characterisation of two novel cell adhesion molecules, MDGA-1 and MDGA-2, in the developing rat embryos. Using *in situ* hybridisation and Northern blot analysis, we show that these molecules are highly regulated in different neuronal populations including the basilar pons and the commissural neurons, while virtually absent outside the nervous system. Their structural organisation similarity with other axon guidance molecules as well as their spatiotemporal expression patterns within restricted neuronal populations suggest their implication in neuronal adhesion, migration and axon guidance mechanisms.

In **chapter 3**, we used the easy accessibility and manipulation of chicken embryos to study the function of MDGAs *in vivo*. After identification of chicken MDGA

orthologues, their spatiotemporal expression pattern in the developing spinal cord was analysed. Similarly to the rat, chicken MDGAs are expressed in commissural neurons as they migrate and extend axons. In contrast to the rat, however, MDGA-1 is expressed in the floor plate and MDGA-2 in the dorsal root ganglia. Using RNA interference, we show that down-regulation of MDGA-2 in commissural neurons prevents the rostral turning of commissural axons after decussation. These results show the crucial role of MDGA-2 in axon guidance after floor plate crossing.

Finally **chapter 4** summarizes and discusses the work presented in this thesis and gives an outlook to the open questions.

In summary, the findings presented in this thesis provide evidence that MDGAs are involved in axon guidance of commissural neurons and possibly in migration of pontine neurons in the rat brain.

Résumé

Parmi tous les systèmes composant l'organisme, le système nerveux est le plus compliqué. A lui seul, il contient plus de types de cellules, les neurones et les cellules gliales, que n'importe quels autres organes du corps. Les neurones forment entre eux un réseau complexe de branchements, qui est à la base de toutes activités neurologiques. C'est la formation précise de ces branchements qui est à l'origine du fonctionnement harmonieux du cerveau, allant de la plus simple des réponses sensorielles comme les réflexes aux comportements cognitifs les plus élaborés. Le processus sophistiqué de formation de ces branchements commence lorsque les neurones immatures amorcent l'elongation des axones. Ces axones se prolongent dans le tissu embryonnaire grâce à l'action coordonnée de facteurs appelés molécules de guidage axonal. Bien que les mécanismes fondamentaux de la croissance axonale soient bien connus et que le nombre de facteurs de guidage s'est largement étoffé au cours des quinze dernières années, beaucoup de phénomènes liés au guidage des axones ne peuvent pas être expliqués par les molécules de guidage axonal actuelles.

Dans le **premier chapitre** de cette thèse, je ferai la synthèse des événements principaux influençant la formation des liaisons neuronales. Ces étapes de développement incluent la formation des tissus neuraux, la migration neuronale, le modelage du système nerveux et enfin la connexion spécifique entre neurones par le guidage axonal. En particulier, ce premier chapitre se concentre sur le développement de la moelle épinière et des ganglions de la racine dorsale et introduit les principales molécules de guidage axonal.

Plusieurs connections majeures entre neurones sont bien décrites anatomiquement alors que leur formation est peu connue. Le **second chapitre** décrit l'identification et la caractérisation de deux nouvelles molécules d'adhésion, MDGA-1 et MDGA-2, dans le développement embryonnaire du rat. À l'aide du Northern blot et de l'hybridisation *in situ*, nous montrons que ces protéines sont très étroitement régulées dans différentes populations neurales dont les neurones formant la base du pont dans le cerveau et les neurones commissuraux dans la moelle épinière, alors qu'elles sont virtuellement absentes en dehors du système nerveux. Leur organisation structurelle similaire à d'autres molécules de guidage axonal ainsi que leur expressions spatiotemporelles dans

des populations neuronales bien définies suggèrent leur implication dans l'adhésion neuronale, la migration et dans les mécanismes de guidance axonal.

Dans le **chapitre 3**, nous utilisons l'accessibilité et la manipulation facile de l'embryon du poulet pour étudier la fonction des MDGAs *in vivo*. Après identification des orthologues des MDGAs chez le poulet, leur expression spatio-temporelle pendant le développement de la moelle épinière a été inspectée. De même que chez le rat, les MDGAs du poulet sont exprimés dans des neurones commissuraux pendant qu'ils migrent et prolongent leurs axones. Contrairement au rat, cependant, MDGA-1 est exprimé au niveau de la plaque du plancher du tube neural (*floorplate*) et MDGA-2 dans les ganglions dorsaux de la racine. En utilisant l'ARN interférent, nous avons prouvé que la diminution de l'expression de MDGA-2 dans des neurones commissuraux empêche le virage rostral des axones commissuraux après décussation. Ces résultats montrent l'importance de MDGA-2 dans le guidage des axones après la traversée de la plaque du plancher.

Enfin le **chapitre 4** récapitule et discute le travail présenté dans cette thèse et ouvre des perspectives aux questions restées en suspens.

En conclusion, les résultats présentés dans cette thèse montrent que les MDGAs sont impliquées dans le guidage d'axones commissuraux et probablement dans la migration des neurones de la base du pont dans le cerveau de rat