

The role of nogo-A and endothelial tip cells in CNS and non-CNS angiogenesis

Doctoral Thesis

Author(s):

Wälchli, Thomas

Publication date:

2014

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010155266>

Rights / license:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

DISS. ETH No. 21798

**THE ROLE OF NOGO-A AND ENDOTHELIAL TIP CELLS IN
CNS AND NON-CNS ANGIOGENESIS**

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree

DOCTOR OF SCIENCES

presented by

THOMAS WÄLCHLI

M.sc. in Engineering, ETH Lausanne

Pract. med., University of Zurich

04.11.1978

Rüschelen, Berne

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Martin E. Schwab

Prof. Dr. Karl Frei

Prof. Dr. Simon P. Hoerstrup

Prof. Dr. Viola Vogel

2014

Summary

Angiogenesis describes the process of blood vessel formation which is essential during development and for the regeneration of ischemic tissues. On the other hand, abnormal angiogenesis occurs in pathological conditions such as cancer, retinopathies or inflammatory disorders. The still incomplete knowledge on the regulation of tissue vascularization is reflected by the difficulty in designing effective treatments to modulate blood vessel formation in CNS- and non-CNS tissues.

Over the last decade, extensive research in the fields of physiological and pathological angiogenesis has enlarged our understanding of the cellular and molecular mechanisms that drive tissue vascularization in health and disease. Moreover, the recent finding that growing nerves and developing blood vessels share common growth factors and guidance cues provided an unexpected, new twist to the fields of angiogenesis and neuroscience. This crosstalk between the nervous and the vascular system has been termed the “neurovascular link”. For instance, several key axonal guidance molecules such as Netrins, Semaphorins, Ephrins and Slits have been shown to also guide blood vessel endothelial cells during development. Moreover, whereas Nogo-A is a transmembrane protein restricting plasticity and regeneration of neurites within the adult central nervous system and regulating the growth of neurons during development, its short isoform, Nogo-B, was shown to affect angiogenesis in peripheral tissues (reviewed in **chapter 1**).

To date, most of the evidence for this neurovascular link derives from peripheral tissues outside the CNS and from the retina. However, how axonal guidance molecules regulate angiogenesis in the brain remains poorly understood. The different aspects regarding the regulation of angiogenesis in peripheral tissues and in the CNS as well as the emerging roles of CNS-specific cues for angiogenesis are reviewed in **chapter 2**.

Nogo-A's growth restricting roles and the above-described neurovascular interactions led us to hypothesize that Nogo-A could also influence angiogenesis in the developing CNS. Indeed, in **chapter 3**, we found that Nogo-A negatively regulated angiogenesis in the postnatal mouse CNS. Nogo-A was expressed in immediate vicinity of endothelial tip cells and their filopodia and loss-of-function experiments using Nogo-A KO animals and injections of anti-Nogo-A antibodies revealed that Nogo-A restricted blood vessel density as well as the number of endothelial tip cells in different brain regions and in the retina *in vivo*. Furthermore, using mouse brain-derived, primary microvascular endothelial cells, we could demonstrate that the Nogo-A-specific fragment Nogo-A Delta 20 inhibited various submechanisms of angiogenesis (cell spreading, migration, sprouting and lamellipodia- and filopodia extension) *in vitro*, via the RhoA-ROCK-Myosin II pathway.

Nogo-B, a short isoform of Nogo-A expressed in the brain and in various peripheral tissues, has been shown to promote developmental angiogenesis and to regulate pathological vascular remodeling of blood vessels outside the CNS. This raised the question whether Nogo-A may – in addition to its above-described inhibitory roles on angiogenesis inside the CNS - also affect angiogenesis and vascular endothelial cells in peripheral tissues. Notably, in **chapter 4**, we found that Nogo-A inhibited the motility of human peripheral venous and arterial endothelial cells *in vitro*, via its two inhibitory domains, Nogo-A Delta 20 and Nogo-66, and their respective receptors, S1PR2 and NgR1. In contrast, only Nogo-A Delta 20 but not Nogo-66 restricted the spreading and migration of human brain MVECs, similar to what we observed for mouse brain MVECs. Moreover, application of Nogo-A Delta 20 or Nogo-66 exerted inhibitory effects on chick chorioallantoic membrane angiogenesis *in vivo*, and these inhibitory effects could partially be prevented using pharmacological inhibitors of S1PR2 and NgR1. Our findings point towards an involvement of Nogo-A and its receptors in the negative regulation of angiogenesis outside the CNS.

The CNS is predominantly vascularized by sprouting angiogenesis, defined as the formation of new blood vessels from pre-existing ones. After sprouting angiogenesis has occurred, the newly formed vascular sprout has to form a lumen in order to become a functional, perfused blood vessel. This transition from forming to perfused vessels is tightly regulated and involves deposition of a vascular basement membrane, vessel stabilization and finally perfusion of the lumenized vessel. In **chapter 5**, using a combination of immunofluorescent stainings and Evans blue perfusions, we describe a method that allowed us to quantitatively assess forming blood vessels, and distinguish endothelial tip cells from perfused blood vessels in the postnatal mouse brain.

Similar to axonal growth cones at the tip of extending neurons, endothelial tip cells at the forefront of growing blood vessels extend filopodial structures that explore the local microenvironment. Since the dynamics of these filopodial structures are currently not well understood, we addressed various parameters of endothelial cell filopodia motility and filopodia-induced traction force generation using nanopillar arrays *in vitro*. Furthermore, using the zebrafish intersegmental vessels (ISVs) as a model system, we compared those filopodia dynamics *in vitro* with the dynamic behavior of zebrafish ISV filopodia *in vivo*. These techniques and results are described in **chapter 6**.

Finally, **chapter 7** provides conclusions and an outlook on potential future projects originating from the present PhD thesis. Future studies should aim at further elucidating the cellular and molecular mechanisms by which Nogo-A regulates angiogenesis and endothelial (tip) cells in different tissues as well as at investigating the role of Nogo-A on neo-angiogenesis in pathological conditions such as brain tumors or stroke.

Zusammenfassung

Die Bildung von neuen Blutgefäßen (Angiogenese) ist von entscheidender Bedeutung während der Gewebe-Entwicklung sowie in regenerierenden oder ischämischen Geweben. Andererseits kommt es auch in verschiedenen Krankheitsbildern wie etwa Tumoren, Netzhautpathologien oder entzündlichen Erkrankungen zur Neubildung von Blutgefäßen. Das nach wie vor inkomplette Verständnis der regulierenden Mechanismen der Gewebevaskularisierung spiegelt sich in der Schwierigkeit zur therapeutischen Intervention der Blutgefäßbildung in Geweben innerhalb wie ausserhalb des Zentralnervensystems (ZNS) wieder.

Innerhalb des letzten Jahrzehnts haben intensive Forschungsbemühungen zur physiologischen sowie pathologischen Angiogenese zu einem verbesserten Verständnis der zellulären und molekularen Mechanismen der Vaskularisierung geführt. Die relativ neue und unerwartete Erkenntnis, dass Nerven und Blutgefäße während der Entwicklung durch gemeinsame Moleküle und Wachstumsfaktoren gesteuert werden, hat dabei zu neuen Forschungsimpulsen in den Gebieten der Angiogenese sowie der Neurowissenschaften geführt. Dieses Gebiet der gemeinsamen Signalwege des Nerven- und des Blutgefäßsystems wird auch als „neurovascular link“ bezeichnet. So wurde beispielsweise entdeckt, dass axonale Wegleitungsmoleküle nicht nur sich entwickelnde Nervenfasern sondern auch sich entwickelnde Blutgefäße während der Entwicklung von Geweben steuern. Eine damit in Zusammenhang stehende Beobachtung konnte auch im Hinblick auf die Nogo Proteine gemacht werden: während das transmembranäre Protein Nogo-A eine hemmende Wirkung auf migrierende Nervenzellen, wachsende Nervenfasern sowie auf die Regeneration und Plastizität von Neuronen im ZNS ausübt, reguliert Nogo-B, eine kurze Isoform des Nogo-A Proteins, die Blutgefäßbildung in peripheren Geweben (zusammengefasst in **Kapitel 1**).

Der Grossteil der wissenschaftlichen Erkenntnisse auf dem Gebiet der gemeinsamen neurovaskulären Signalwege stammt derzeit aus peripheren Gefäßen und Nerven ausserhalb

des ZNS sowie aus der Netzhaut. Wie axonale Wegleitungsmoleküle die Angiogenese im Gehirn regulieren ist derzeit jedoch weitgehend unbekannt. Einige zentrale Aspekte betreffend der Regulierung der Angiogenese in peripheren Geweben und im ZNS sowie die zunehmend wichtiger werdenden ZNS-spezifischen Angiogenese-Regulatoren werden in **Kapitel 2** beschrieben.

Die wachstumshemmende Funktion von Nogo-A im Nervensystem führte uns zur Hypothese, dass Nogo-A auch die Angiogenese im ZNS beeinflussen könnte. In der Tat gelang es uns zu zeigen, dass Nogo-A die Angiogenese im postnatalen Maushirn hemmt (**Kapitel 3**). Wir fanden Nogo-A Expression in unmittelbarer Nachbarschaft zu endothelialen Tipzellen und deren Filopodien. Anhand von „Loss-of-function“ Experimenten mit Nogo-A Knock out-Tieren sowie Injektionen von anti-Nogo-A Antikörpern zeigte sich, dass Nogo-A die Blutgefässdichte sowie die Anzahl von endothelialen Tipzellen in verschiedenen Hirnregionen sowie in der Netzhaut *in vivo* hemmt. In Zellkulturexperimenten mit primären, aus postnatalen Maushirnen isolierten mikrovaskulären Endothelzellen konnten wir zudem nachweisen, dass das Nogo-A spezifische, inhibitorische Fragment Nogo-A Delta 20 eine Vielzahl von Submechanismen der Angiogenese (Zell-Ausbreitung, Migration, Sprossung sowie das Auswachsen von Lamellipodien und Filopodien) über den RhoA-ROCK-Myosin II Signalweg inhibiert.

Nogo-B, eine kurze Isoform von Nogo-A, ist im Gehirn sowie in verschiedensten peripheren Geweben exprimiert, hat stimulierende Effekte auf die Angiogenese während der Entwicklung und reguliert die pathologische Remodelierung von Blutgefäßen ausserhalb des ZNS. Dies führte zur Frage, ob Nogo-A allenfalls – und zusätzlich zu der oben beschriebenen hemmenden Funktion auf die Angiogenese im ZNS – auch die Angiogenese sowie vaskuläre Endothelzellen in peripheren Geweben beeinflussen könnte.

In der Tat fanden wir in **Kapitel 4** erste Hinweise, dass Nogo-A die Adhäsion und Migration von humanen, peripheren, venösen sowie arteriellen Endothelzellen über seine beiden hemmenden Domänen, Nogo-A Delta 20 und Nogo-66 sowie deren Rezeptoren, S1PR2 und NgR1, inhibiert. Interessanterweise übte jedoch einzig Nogo-A Delta 20, nicht aber Nogo-66, hemmende Funktionen auf die Ausbreitung sowie die Migration humaner Hirnendothelien aus, analog zu den Resultaten mit Maushirn-Endothelzellen. Des Weiteren führte die Zugabe von Nogo-A Delta 20 oder von Nogo-66 zur Hemmung der Angiogenese auf der Chorioallantois-Membran von Hühnerembryonen, und diese hemmenden Effekte konnten durch pharmakologische Blockierung von S1PR2 und NgR1 partiell aufgehoben werden. Zusammenfassend weisen diese Resultate auf eine negativ regulatorische Funktion von Nogo-A und seinen Rezeptoren auf die Angiogenese auch ausserhalb des ZNS hin.

Das ZNS wird vorwiegend durch den Prozess der Kapillarsprossung – welcher als Aussprossung neuer Blutgefässe aus bereits bestehenden Blutgefässen definiert ist - vaskularisiert. Nach erfolgter Aussprossung muss der neuformierte Blutgefässkeim ein Lumen bilden, um in der Folge mit Blut perfundiert werden zu können. Der Übergang von sich formierenden zu perfundierten und somit funktionellen Blutgefässen ist ein präzise regulierter Prozess und beinhaltet die Bildung einer vaskulären Basalmembran, die Stabilisierung, sowie letztlich die Perfusion des Blutgefässes. In **Kapitel 5** beschreiben wir eine aus einer Kombination von Immunfluoreszenz-Färbungen mit Evans Blue Perfusionen bestehende Methode, die es ermöglicht, sich formierende Blutgefässe, endotheliale Tipzellen sowie perfundierte Blutgefässe im postnatalen Maushirn zu unterscheiden und quantitativ zu analysieren.

Analog zu Wachstumskegeln von aussprossenden Axonen bilden auch endotheliale Tipzellen von aussprossenden Blutgefässen Filopodien, welche die lokale Mikroumgebung abtasten. Da die dynamischen Bewegungen dieser Filopodien bis heute nur ungenügend verstanden sind, haben wir verschiedene Parameter der Beweglichkeit dieser Endothelzell-Filopodien sowie

die Filopodien-induzierten Zugräfte anhand von synthetischen Pfeilern im Nanogrößenbereich untersucht. Des Weiteren wurde die Filopodien-Dynamik in Zellkultur mit dem dynamischen Verhalten von Filopodien der Intersegmentalgefäße von Zebrafischen verglichen. Diese Methoden und Resultate werden in **Kapitel 6** beschrieben.

Abschliessend liefert **Kapitel 7** Schlussfolgerungen sowie einen Ausblick hinsichtlich möglicher zukünftiger Forschungsrichtungen, welche auf dieser Doktorarbeit aufbauen. Weiterführende Studien sollten die zellulären sowie molekularen Mechanismen, durch welche Nogo-A den Prozess der Angiogenese sowie das Verhalten von endothelialen (Tip)zellen in verschiedenen Geweben reguliert weiter aufklären und die Rolle von Nogo-A auf die Angiogenese in Pathologien wie Hirntumoren oder Schlaganfällen untersuchen.