



## Doctoral Thesis

# The role of glial versus neuronal nogo-a in axonal regeneration in the mouse central nervous system

**Author(s):**

Vajda, Flora

**Publication Date:**

2014

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010398102> →

**Rights / License:**

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

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. 22325

**THE ROLE OF GLIAL VERSUS NEURONAL NOGO-A IN  
AXONAL REGENERATION IN THE MOUSE CENTRAL  
NERVOUS SYSTEM**

A thesis submitted to attain the degree of

**DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH**

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

**FLÓRA VAJDA**

M.Sc. in Neuroscience, Eötvös Loránd University (Budapest)

born on 26.12.1986

citizen of Hungary

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Martin E. Schwab, examiner

Prof. Dr. Ueli Suter, co-examiner

Prof. Dr. Stephan Neuhaus, co-examiner

2014

## Summary

In the central nervous system (CNS), Nogo-A has been well described as a myelin-associated inhibitory protein for axonal regeneration after injury. However, Nogo-A is also expressed in neurons, especially in regions of the nervous system where plasticity is high, such as the hippocampus, the cortex and dorsal root ganglia (DRGs). In addition to playing a major role in the blockade of axon growth in the adult CNS, Nogo-A has been shown to modulate neuronal progenitor migration, axon guidance and fasciculation, dendritic branching, synaptic plasticity and even cell survival.

Our recent studies suggested that not only glial, but also neuronal Nogo-A could influence axonal growth and that this neuronal counterpart may be beneficial for axonal regeneration. Besides function-blocking antibodies and pharmacological inhibitors, so far only conventional knock-out (KO) mouse lines have been available to study the functions of Nogo-A. In these complete KO models, systemic gene deletion affected Nogo-A expression in glial and neuronal cell populations at the same time, and led to modest axonal regrowth in the injured CNS. We therefore hypothesized that the selective blockade of Nogo-A in oligodendrocytes may increase axonal regeneration to a higher level than previously observed in full KO mice.

To study the separate role of glial and neuronal Nogo-A/RTN4 on axonal regeneration, we have generated cell-type specific conditional Nogo-A KO animals by using the Cre-lox recombination system. Targeted Nogo-A deletion in oligodendrocytes and in neurons was obtained by crossing a floxed Nogo-A mouse line (*Rtn4<sup>flox/flox</sup>*) with mice expressing Cre-recombinase under the control of the oligodendrocyte-specific 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase promoter (*Cnp-Cre<sup>+/-</sup>*) or the neuron-specific Thy1 promoter (*Thy1-Cre<sup>tg+</sup>*), respectively. Acute excision of the Nogo-A gene in neurons was carried out by adeno-associated virus serotype 2 (AAV2).Cre virus injections in *Rtn4<sup>flox/flox</sup>* animals. We found that Nogo-A was down-regulated to different extents in glia and neuron-specific knock-out mice, in a manner consistent with the proportion of Nogo-A-expressing glial and neuronal cells in the CNS. Axonal regeneration in the optic nerve after crush injury was increased in the glia-specific Nogo-A knock-out mice, suggesting that the targeted deletion of glial Nogo-A improves neuronal growth capacity more than previously observed after systemic Nogo-A gene ablation. The increased axonal growth was associated with the up-regulation of growth associated genes, such as GAP-43 and SPRR1A. Inversely, deletion of Nogo-A from retinal ganglion cells (RGCs) impaired the regenerative growth response. We found that neuronal Nogo-A in RGCs could participate in enhancing axonal sprouting, possibly by *cis*-interaction with Nogo receptors at the cell membrane that may counteract *trans* Nogo-A signaling and

Rho-A pathway activation. In addition, neuronal survival was also significantly improved in the retinae of glial Nogo-A KO mice. Major cellular and molecular events that could contribute to the mechanisms of axonal regeneration and cell survival were also investigated. In these experiments, Nogo-A did not contribute to Müller cell gliosis, ER-stress or autophagic processes. Although Nogo-A is mostly accounted as an extracellular inhibitor of axonal regeneration by acting on the cytoskeleton through the Rho-A/ROCK pathway, oligodendroglial Nogo-A in *trans* has additionally been implicated to suppress the neuronal growth program by modulating CREB, mTOR and ERK1/2 activation.

The results presented in this thesis show that oligodendroglial and neuronal Nogo-A play distinct roles in axonal regeneration in the central nervous system. While myelin Nogo-A presented in *trans* leads to growth inhibition, Nogo-A expressed extra- or intracellularly in neurons might exert a positive function possibly by interacting with its receptors in *cis* position. Therefore, inactivating Nogo-A in glia while preserving neuronal Nogo-A expression may be the most successful strategy to promote axonal regeneration in the CNS. The pioneer work presented in this thesis was carried out in the visual system and may be followed by studies in other parts of the CNS, where traumatic lesions, such as spinal cord injury, lead to permanent neurological impairments.

## Zusammenfassung

Im zentralen Nervensystem (ZNS) ist Nogo-A vor allem als Myelin-assoziiertes Protein, welches axonale Regeneration nach Verletzungen inhibiert, beschrieben. Jedoch wird Nogo-A auch in Neuronen exprimiert, insbesondere in Regionen des Nervensystems mit hoher Plastizität, wie dem Hippocampus, Neokortex und den Spinalganglien. Neben seiner wichtige Rolle bei der Blockade von axonalem Wachstum im adulten ZNS beeinflusst Nogo-A auch Migration von neuronalen Vorläufer-Zellen, axonale Wegleitung und Nervenfaserverfäskulation, dendritische Verzweigung, synaptische Plastizität und sogar das Überleben von Nervenzellen.

Unsere jüngsten Studien zeigen, dass nicht nur Nogo-A exprimierende Gliazellen, sondern auch neuronales Nogo-A selbst axonales Wachstum beeinflussen kann. Dieses neuronale Nogo-A kann sogar vorteilhaft für axonale Regeneration sein. Neben funktionsblockierenden Antikörpern und pharmakologischen Inhibitoren wurden bisher nur konventionelle Knock-out (KO) Mauslinien untersucht, um die Funktionen von Nogo-A zu erforschen. In diesen kompletten KO-Modellen sind jeweils die Nogo-A-Expression in Gliazellen und neuronalen Zellpopulationen betroffen. Diese systemischen KO-Modelle zeigten nur bescheidene axonale Regeneration nach einer Verletzung des ZNS. Wir haben daher die Hypothese aufgestellt, dass die selektive Blockade von Nogo-A in Oligodendrozyten zu einer höheren axonalen Regeneration führen könnte, als dies bisher in kompletten KO-Mäusen beobachtet wurde.

Um die Rollen von Nogo-A in Gliazellen oder Neuronen getrennt voneinander zu untersuchen, haben wir mit Hilfe des Cre-lox-Rekombinations-Systems Zelltyp-spezifische Nogo-A-Knock-out-Tiere erzeugt. Gezielte Nogo-A Deletion in Oligodendrozyten und Neuronen wurde durch das Kreuzen einer geflochten Nogo-A-Mauslinie (*Rtn4<sup>flox/flox</sup>*) mit Mäusen welche Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Oligodendrozyten-spezifischen 2', 3'-zyklische Nukleotide 3'-phosphodiesterase Promotors (*Cnp-Cre<sup>+/-</sup>*) oder des Neuronen-spezifischen Thy1 (*Thy1-Cre<sup>tg+</sup>*) Promotors exprimieren, erreicht. Akute Deletion des Nogo-A-Gens in Neuronen wurde durch Injektionen von Adeno-assoziierten Viren vom Serotyp 2 (AAV2).cre in *Rtn4<sup>flox/flox</sup>* Tiere erreicht. Wir fanden, dass Nogo-A in verschiedenem Ausmaß in Glial und Neuronen-spezifischen Knock-out-Mäusen herunterreguliert wurde, und zwar in einer Weise, die mit dem Anteil der Nogo-A-exprimierenden Gliazellen und den neuronalen Zellen im ZNS korrelierte. Des Weiteren war die axonale Regeneration im Sehnerv nach einer Quetschverletzung in den Glia-spezifischen Nogo-A-Knock-out-Mäusen erhöht, was darauf hindeutet, dass die gezielte Deletion von Glia-Nogo-A die neuronale Wachstumskapazität stärker erhöht, als bisher nach systemischer Nogo-A-Gen-Ablation

beobachtet wurde. Das erhöhte axonale Wachstums war zusätzlich mit der Hochregulierung Wachstums-assoziiertes Gene wie GAP-43 und SPRR1A verbunden.

Im Gegensatz zur Glia-spezifischen Nogo-A Deletion verringerte die Deletion von Nogo-A in retinalen Ganglienzellen die Regeneration. Wir fanden, dass neuronales Nogo-A in retinalen Ganglienzellen die Verstärkung der axonalen Aussprossung möglicherweise durch Wechselwirkung mit Nogo-Rezeptoren in *cis* auf der Zellmembran hervorruft. Diese *cis*-Interaktion könnte somit dem inhibierenden *trans*-Nogo-A Signal und der Rho-A-Signalweg-Aktivierung entgegenwirken. Darüber hinaus war das Überleben der Neuronen in der Netzhaut von Glia-Nogo-A KO-Mäusen nach der Läsion signifikant erhöht. Zusätzlich haben wir auch zelluläre und molekulare Prozesse, welche zur axonalen Regeneration und dem Überleben der Zellen beitragen, untersucht. In diesen Experimenten fanden wir keinen Effekt von Nogo-A auf Müller-Zell-Gliose, ER-Stress oder autophagische Prozesse. Obwohl Nogo-A vor allem für die Aktivierung des Rho/ROCK Signalweges und die Modulation des Zytoskeletts bekannt ist, kann oligodendrogliales *trans*-Nogo-A auch das Wachstumsprogramm von Nervenzellen unterdrücken indem es die Aktivität von CREB, mTOR und ERK1/2 moduliert.

Die Ergebnisse in dieser Arbeit zeigen, dass oligodendrogliales und neuronales Nogo-A unterschiedliche Rollen in der axonalen Regeneration im zentralen Nervensystem spielen. Während Myelin-Nogo-A in *trans* zu Wachstumshemmung führt, könnte extra- oder intrazelluläres Nogo-A in Neuronen eine positive Funktion haben, welche möglicherweise durch die Interaktion mit Nogo Rezeptoren in *cis*-Stellung zustande kommt. Inaktivierung von Nogo-A in Gliazellen unter der Wahrung von neuronaler Nogo-A-Expression könnte daher die erfolgreichste Strategie zur Förderung von axonaler Regeneration im verletzten ZNS sein. Die Erkenntnisse, welche in dieser Doktorarbeit präsentiert werden, wurden im visuellen System gewonnen und sollten durch Studien in anderen Teilen des ZNS, in denen traumatische Verletzungen, wie zum Beispiel Rückenmarksverletzung, zu bleibenden neurologischen Beeinträchtigungen führen, ergänzt werden.