

Diss. ETH ex. B

Diss. ETH Nr. 10325

# **Control of Neuronal Differentiation by Extracellular Matrix Constituents**

ABHANDLUNG

Zur Erlangung des Titels

DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN

der

EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZÜRICH

vorgelegt von

André Lochter

Dipl. Biologe, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg (FRG)

geboren am 09. 11. 1962

Alpen (FRG)

Angenommen auf Antrag von:

Prof. Dr. M. Schachner, Referent

Dr. L. Vaughan, Korreferent

1993



## 1. Kurzfassung

Die vorliegende Doktorarbeit hat zum Ziel einen Beitrag zum besseren Verständnis von Entwicklungsprozessen im Gehirn zu leisten. Hierzu wurde ein Zellkultursystem gewählt, welches die Kultivierung von verschiedenen Neuronen aus dem zentralen Nervensystem und die Untersuchung der Effekte von Molekülen der Extrazellulärmatrix auf das Wachstum und die Differenzierung von Neuriten ermöglicht. Die meisten Experimente wurden mit hippocampalen Neuronen durchgeführt, da sie zu den biochemisch und morphologisch am besten charakterisierten Zellen des zentralen Nervensystems gehören.

Der Ausgangspunkt für alle folgenden Untersuchungen war die Beobachtung, dass das Extrazellulärmatrixmolekül Tenascin in substratgebundener Form das Neuritenwachstum förderte während Tenascin, in löslicher Form im Kulturmedium, das Neuritenwachstum inhibierte. Diese Beobachtung führte zu der Hypothese, dass Extrazellulärmatrixmoleküle zahlreiche Eigenschaften haben, die das Neuritenwachstum auf verschiedene Weise beeinflussen können und dass die Wahl der geeigneten Zellkulturbedingungen diese Eigenschaften zu Tage treten lassen würde. Dieses Konzept der Multifunktionalität wurde weiterhin unterstützt durch die folgenden Ergebnisse: Neben den fördernden und inhibierenden Wirkungen auf die Neuritogenese, verstärkte Tenascin die Ausbildung eines polarisierten neuronalen Phänotyps, indem es das axonale Wachstum beschleunigte, das dendritische Wachstum aber hemmte. Ob Tenascin eine polarisierende oder das Neuritenwachstum allgemein fördernde, das heisst alle Neuriten gleichermassen betreffende, Aktivität entfaltete war abhängig von der Kulturzeit der Neurone. Kurze Kulturzeiten beschleunigten das Wachstum aller Neuriten, längere nur dasjenige von Axonen. Ähnliche Effekte auf Förderung and Polarisierung des Neuritenwachstums wurden auch für die Extrazellulärmatrixmoleküle Janusin, Laminin und Fibronectin festgestellt, während das Zelladhäsionsmolekül L1 und das Lektin Concanavalin A das Wachstum von Axonen und Dendriten zu allen untersuchten Zeitpunkten in Zellkultur gleichermassen förderten, ohne die Polarität der Neurone zu beeinflussen. Der Einfluss der Adhäsivität des Substrates auf das Neuritenwachstum wurde ebenfalls untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass auf substratgebundenen Extrazellulärmatrixmolekülen das axonale Wachstum unabhängig von der Stärke der Adhäsivität des Substrates, das dendritische Wachstum jedoch davon abhängig war. Im Gegensatz dazu

waren auf L1-Substraten und in allen Fällen, in denen Tenascin in löslicher Form im Kulturmedium eingesetzt wurde, sowohl axonales, als auch dendritisches Wachstum unbeeinflusst von der Adhäsivität des Substrates. Aus diesen Resultaten folgt, dass Tenascin den höchsten Grad der Multifunktionalität aufweist, weil es als einziges der getesteten Moleküle das Wachstum aller Neuriten inhibierte.

Mit Hilfe von bakteriell exprimierten Tenascin-Fusionsproteinen und monoklonalen Antikörpern konnten der neuritenwachstumsfördernde und der polarisierende Effekt von Tenascin bestimmten strukturellen Domänen des Moleküls zugeordnet werden. Demnach gibt es mindestens zwei Regionen im Tenascinmolekül die diese Effekte vermitteln können, eine im N-terminalen und eine andere im C-terminalen Drittel des Moleküls.

Inkubation von Neuronen mit Modulatoren der enzymatischen Aktivität von Proteinkinasen führte zu der Entdeckung, dass Proteinkinasen an der Ausbildung neuronaler Polarität beteiligt sind und wahrscheinlich auch die Effekte von Extrazellulärmatrixmolekülen auf das Neuritenwachstum vermitteln. Insbesondere bewirkte die Gegenwart eines Proteinkinase C Inhibitors im Kulturmedium die Ausbildung von neuronalen Morphologien ähnlich denen auf Extrazellulärmatrixsubstraten, während bei Anwesenheit eines Breitspektrum-Proteinkinaseinhibitors auf Extrazellulärmatrixsubstraten neuronale Morphologien ähnlich denen in Abwesenheit von substratgebundenen Extrazellulärmatrixmolekülen entwickelt wurden. Im Gegensatz zu diesen substratspezifischen Effekten, bewirkte die Erhöhung des intrazellulären Spiegels an zyklischem AMP eine Verminderung des axonalen und eine Verbesserung des dendritischen Wachstums, unabhängig von dem Substrat auf dem die Neurone kultiviert wurden.

## 2. Summary

This PhD thesis aimed at a better understanding of developmental processes associated with brain ontogenesis. I have chosen an *in vitro* system suitable for the cultivation of a variety of central nervous system neurons to study the effects of extracellular matrix molecules on neuritogenesis, the growth and differentiation of neurites. Most of the experiments were performed with hippocampal neurons since they are, morphologically and biochemically, among the best characterized cells in the central nervous system.

The starting point for all of the following investigations was the observation that, in comparison to a polyornithine substrate in the absence of extracellular matrix molecules, tenascin coated onto polyornithine substrates promoted neurite outgrowth, whereas tenascin added to the culture medium after cell plating impaired neurite growth. This finding led me to hypothesise that extracellular matrix molecules possess multiple intrinsic features modulating neurite outgrowth which will be uncovered if the culture conditions are chosen in an appropriate manner. The concept of multifunctionality was further supported by the following observation: Besides inhibiting and promoting overall neurite growth, tenascin increased neuronal polarity by increasing the length of the axon-like major neurite and decreasing the length and number of dendrite-like minor neurites resulting in a reduced total neurite length per cell. Whether tenascin had polarizing or neurite promoting activity was dependent on the time neurons were maintained in culture. Similar effects on promotion versus polarization of neurite growth were also observed for the extracellular matrix molecules janusin, laminin, fibronectin and a chondroitin sulphate proteoglycan, whereas the cell adhesion molecule L1 and the lectin concanavalin A increased growth of both major and minor neurites at all time points studied. The dependence of neurite growth on extracellular matrix molecules on the strength of neuron-to-substrate adhesion was also investigated. I found that major neurites on extracellular matrix substrates grew independently of the strength of neuron-to-substrate adhesion, whereas minor neurites elongated adhesion-dependently, that is, grew better on substrates of high adhesiveness than on substrates of low adhesiveness. These correlations between neurite growth on extracellular matrix substrates and the adhesiveness of the substrate were seen with all of the aforementioned extracellular matrix glycoproteins, but not with L1, which promoted neurite growth in completely adhesion-independent manner. Finally, the highest degree of multifunctionality was ascribed to tenascin since

all other extracellular matrix molecules did not inhibit neurite growth when added to the medium in soluble form.

I further characterized the effects of tenascin on neurite growth by making use of bacterially-expressed fusion proteins and monoclonal antibodies. It could be shown that both polarizing and neurite growth promoting properties of tenascin reside in at least two fragments of the molecule and that an antibody binding within the region of fibronectin type III repeats D to 6 (for nomenclature see 4.5.) blocked the neurite growth promoting activity of tenascin.

Manipulation of neurons grown on tenascin and janusin with modulators of protein kinase metabolism led to the dissection of signal transduction mechanisms differentially involved in the growth of major and minor neurites. Treatment with the protein kinase C inhibitor chelerythrine resulted in an "extracellular matrix-like" polarized phenotype on polyornithine substrates and treatment of neurons with the broad-spectrum protein kinase inhibitor H-7 in "polyornithine-like" growth on extracellular matrix substrates. Furthermore, cyclic AMP elevating reagents decreased growth of major neurites and increased growth of minor neurites on polyornithine and polyornithine/extracellular matrix substrates. To further characterize these observations, assays for protein kinase and phosphatase activities and western blotting with phosphotyrosine-specific antibodies were employed. However, no differences could be observed between cells cultured on polyornithine and polyornithine in the presence of extracellular matrix components.