

Diss. ETH Nr. 10459

**Identification and functional associations of CD9  
in the mouse brain**

ABHANDLUNG

Zur Erlangung des Titels

DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN

der

EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZÜRICH

vorgelegt von

Carolin Schmidt

Dipl. Biologin, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg (BRD)

geboren am: 07.06.1963

Korbach (BRD)

angenommen auf Antrag von:

Prof. Dr. M. Schachner, Referentin

Prof. Dr. U. Suter, Koreferent

1993

## 1. Kurzfassung

Zelladhäsion, Zellwanderung und Differenzierung sind bedeutende Ereignisse während der Entwicklung des Nervensystems, aber auch wichtig für das Funktionieren des Immunsystems. Es gibt etliche Moleküle, die sowohl im Gehirn als auch im Immunsystem vorkommen. Eines davon ist CD9, welches im Laufe des vorliegenden Projekts mit dem hier vorgestellten neuen monoklonalen Antikörper (H6) im peripheren und zentralen Nervensystem der Maus nachgewiesen wurde. CD9 wurde auf Astrozyten, Oligodendrozyten, Schwannschen Zellen und Neuronen lokalisiert.

CD9 gehört zu einer neuen Genfamilie, die eine Typ II Membrancharakteristik aufweist (Horejsi und Vlcek, 1991; Levy et al., 1991). Bis heute ist die biologische Funktion dieser Genfamilie nicht bekannt. Diesbezügliche Hinweise wurden jedoch durch Applikationen spezifischer monoklonaler Antikörper in funktionellen Tests erhalten. Um die Funktion von CD9 im Nervensystem der Maus zu untersuchen, wurden Perturbationsexperimente mit monoklonalem Antikörper H6 in neuralen Zellkulturen durchgeführt. H6 verhinderte die Zellwanderung, die Faszikulierung von Neuriten und das Auswachsen astrozytärer Fortsätze in Mikroexplantaten des Kleinhirns der Maus. Dieses Mikroexplantatsystem imitiert möglicherweise *in vitro* die Entwicklung der frühen postnatalen Kleinhirnrinde. Die Ergebnisse der Experimente legen nahe, dass CD9 in morphogenetische Prozesse involviert ist und Zell-Zell bzw. Zell-Substrat Interaktionen *in vitro* beeinflusst. CD9 konnte eine Rolle im Signaltransduktionsprozess nachgewiesen werden, da neuronale Zellen eine gesteigerte intrazelluläre Calciumkonzentration nach Stimulierung mit monoklonalem Antikörper H6 aufwiesen.

Der Einfluss von CD9 auf das Neuritenwachstum wurde untersucht, indem isolierte Kleinhirnneurone auf astrozytären Oberflächen in Anwesenheit von monoklonalem Antikörper H6 kultiviert wurden. Astrozyten bilden ein sehr attraktives Substrat für auswachsende Neuronen *in vivo* als auch *in vitro* (Noble et al., 1984; Fallon, 1985; Fishman und Hatten, 1993). Der monoklonale Antikörper H6 wurde ursprünglich gegen astrozytäre Membranen erzeugt, um Moleküle zu identifizieren, die für die Permissivität dieses Substrats verantwortlich sind. Obwohl dieser Antikörper die Wanderung von Kleinhirnneuronen, das Auswachsen astrozytärer Fortsätze und die Faszikulierung von Neuriten in Mikroexplantaten des Kleinhirns verhinderte,

wurde kein Effekt auf das Neuritenwachstum isolierter Kleinhirnneurone beobachtet, die auf astrozytären Oberflächen kultiviert wurden. Stattdessen förderte der monoklonale Antikörper H6 das Neuritenwachstum isolierter Kleinhirnneurone, wenn sie auf Laminin kultiviert wurden. Dies deutete darauf hin, daß CD9 in die Regulation einer Interaktion zwischen Integrinen und deren extrazellulären Rezeptor Laminin beteiligt ist. Diese Hypothese wurde durch die Tatsache unterstützt, daß  $\alpha 6/\beta 1$  Integrin mit CD9 aus Membranextrakten einer neuronalen Zelllinie (N2A Neuroblastoma) kopräzipitiert werden konnte und auch in der Zellmembran dieser Zellen mit CD9 kolokalisierte. Vergleichsweise ist eine Assoziation zwischen CD9 aus menschlichen Blutplättchen mit dem Integrin GpIIb/IIIa erst nach Aktivierung mit spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen CD9 möglich, was zur Bindung von Fibrinogen und anschließender Aggregation der Blutplättchen führt (Slupsky et al., 1989; Favier et al., 1989).

Das neurale Adhäsionsmolekül L1 wurde als ein weiterer Bindungspartner für CD9 innerhalb des Nervensystems der Maus identifiziert. L1 wurde zusammen mit CD9 immunoaffinitätschromatographisch mit monoklonalem Antikörper H6 aus Mausgesamthirnextrakten aufgereinigt. Ausserdem konnte eine Bindung von immunoaffinitätsgereinigtem L1 an CD9 in ELISA-Studien bestätigt werden. Die Kolokalisierung dieser beiden Moleküle, d.h. das durch Antikörper induzierte Patching von CD9 in der Zellmembran von N2A Neuroblastomazellen induzierte Co-patching von L1, deutet auf eine Cis-Interaktion von CD9 und L1 hin.

## 2. Summary

Cell adhesion, cell migration and cell differentiation are crucial events during development of the nervous system as well as the functioning of the adult immune system. There are several molecules which are present in the brain as well as in the immune system. One is CD9, which was identified with the novel monoclonal antibody H6 (mab H6), in the central and peripheral nervous system of the mouse during the course of this project. CD9 could be localized in the mouse nervous system on astrocytes, oligendrocytes, Schwann cells and neurons.

CD9 belongs to a novel gene family with type II membrane protein characteristics (Horejsi and Vlcek, 1991; Levy et al., 1991). To date, the biological function of this gene family is not known, but the application of specific monoclonal antibodies in various cell culture systems provided clues in this respect. To evaluate the possible role of CD9 in the mouse nervous system, perturbation experiments with mab H6 were carried out in neural cell cultures. Mab H6 inhibited cell migration, neurite fasciculation and astrocyte process outgrowth in a cerebellar microexplant system, which may mimic events implicated in the development of the postnatal mouse cerebellar cortex *in vivo*. These experiments suggest that CD9 is involved in morphogenetic processes, modifying cell-to-cell and cell-to-substrate interactions of neural cells *in vitro*. CD9 could also be shown to be involved in signal transduction mechanism in that increases the intracellular calcium concentration in neuronal cells when stimulated with mab H6.

In order to assess the role of CD9 in more detail, isolated small cerebellar neurons were cultured on monolayers of astrocytes and neurite outgrowth perturbed with mab H6. Astrocytes are endowed with highly permissive cues for process outgrowth from neurons *in vivo* and *in vitro* (Noble et al., 1984; Fallon, 1985; Fishman and Hatten, 1993). Mab H6 was originally generated against astrocyte membranes, in the hope that it may recognize a protein which contributes to these permissive substrate properties. However, although mab H6 inhibited migration of small cerebellar neurons, outgrowth of astrocytic processes and neurite fasciculation in cerebellar microexplants, it did not affect neurite outgrowth from isolated small cerebellar neurons when they were cultured on astrocytic monolayers. In contrast, when cerebellar neurons were cultured in a non cell-contact dependent manner on substrate-coated laminin, mab H6 strongly promoted neurite outgrowth. This indicates that CD9 may

participate in the regulation of the interaction between integrins and the extracellular matrix molecule laminin. This hypothesis was supported by immunoprecipitation and co-patching experiments, in which it was observed that CD9 could associate with  $\alpha 6/\beta 1$  integrin in a neuronal cell line (N2A neuroblastoma). This is in congruence to the human homologue, where monoclonal antibodies against CD9 induce association of CD9 with the major platelet integrin gpIIb/IIIa (Slupsky et al., 1989; Favier et al., 1989), which then enables the binding of fibrinogen, leading to the activation and subsequent aggregation of human platelets.

The neural cell adhesion molecule L1 was identified as a further putative binding partner for CD9 within the nervous system. L1 could be demonstrated as the major copurifying protein in mab H6 immunoaffinity purified preparations of detergent extracts from adult mouse brains. Moreover, immunoaffinity purified L1 bound to immunoaffinity purified CD9 in ELISA studies. A cis-interaction of CD9 with L1 (on one and the same cell membrane) could be demonstrated by means of antibody induced patching of CD9 and co-patching of L1.