

DISS. ETH Nr. 17304

**THREE NOVEL IgCAMs ARE INVOLVED IN ASPECTS OF ZEBRAFISH
NERVOUS SYSTEM DEVELOPMENT**

A dissertation submitted to the

SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of

Doctor of Natural Sciences

presented by

ESTHER ANNE INGOLD

Dipl. Natw. ETH, ETH Zurich

Born 7.4.68
Citizen of Inkwil / BE

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Martin Schwab, University Zurich and ETH Zurich
Prof. Dr. Stephan C. F. Neuhauss, University Zurich
Dr. Matthias Gesemann, ETH Zurich

2007

Summary

During the development of the nervous system, neurons migrate along specific routes and send out axons that grow along stereotypical pathways. Both nerve cells and their axons are guided by chemoattractive and / or repulsive cues that constitute a neuronal 'road map' by shaping the surrounding of neurons and their axons into instructive and/or permissive regions. Temporary interactions of receptors and adhesion molecules in the neuronal membrane with these environmental cues enable the neuron and its axon to 'read' the road map and to choose a specific growth direction. Members of the large superfamily of Ig domain containing cell adhesion molecules (IgCAMs) expressed on the neuronal surface are known to mediate adhesion of migrating neurons and growing axons. We have recently isolated proteins of a novel IgCAM subfamily called MAM domain containing GPI anchored proteins (MDGAs). MDGAs are prominently expressed in nerve cells during the period of neuronal migration and axon growth, suggesting that MDGA mediated adhesion may be required for proper neuronal development. Since the zebrafish offers several advantages compared to other model organisms, such as the easy accessibility of the embryos, the transparency of the developing fish and its rapid development, we decided to use this tropical fish as the model system of choice to study the distribution and functional properties of the MDGAs.

Through comparative database searches with rat and chicken MDGA sequences, we identified and isolated three zebrafish MDGA members, one MDGA-1 ortholog and two different MDGA-2 orthologs. Zebrafish MDGAs share similar structural features like their orthologs in other species, namely six Ig-domains, one or several fibronectin repeats, a MAM domain and a GPI anchor. They are expressed during specific events of nervous system development, such as neuronal migration and axonal growth. Transcripts of all or two MDGA proteins are prominently expressed in the spinal cord, hindbrain and cerebellum, in diencephalic regions and in the midbrain ventricle. Furthermore, MDGA-1 shows prominent expression in specific ganglia of the PNS, including the trigeminal ganglion, the lateral line ganglia and the statoacoustic ganglion. Transcripts of MDGA-2A are also present in the lateral line ganglia as well as the vagal ganglion. Individual expression sites of the third family member, MDGA-2B, are the eye, the otic vesicle, the pineal gland and regions bordering different brain compartments.

Further insights into putative MDGA functions were obtained from the analysis of the MDGA-2A protein distribution. Several reticulospinal interneurons and their projections, as well as specific spinal axons are prominently labeled by the MDGA-2A antibody. In the periphery, cranial nerves and their muscle targets strongly express MDGA-2A

protein. Moreover, the statoacoustic and lateral line nerves, together with the innervated neuromasts are clearly MDGA-2A positive.

In MDGA-1 and MDGA-2A deficient zebrafish embryos, the nuclei of trigeminal and facial branchiomotor neurons (BMNs) are displaced and / or harbor fewer cells, whereas the cluster of vagal BMNs appears to contain more cells. Moreover, the trigeminal and facial nerve appears thinner than normal. Analysis of trigeminal sensory ganglia in MDGA-1 deprived zebrafish embryos revealed that fewer cells are clustered in these ganglia. In addition, their peripheral axon fascicles are thinner, in contrast to the centrally projecting fascicle. Also, some peripheral axons seem to grow along unusual pathways.

Taken together, it seems likely that MDGA members are involved in neuronal migration and axon growth. The absence of MDGA proteins may cause some of the migrating neurons to commit pathfinding errors, finally leading to displaced neuronal clusters or to fewer neurons within these clusters. This hypothesis is supported by the finding that axonal bundles extending from these clusters are thinner than normal, possibly due to the reduced cell number in the clusters. Alternatively, fewer axons may be running in these projections due to the lack of fasciculation promoting MDGA function, leading to impaired outgrowth of these axons.

Zusammenfassung

Während der Entwicklung des Nervensystems wandern (migrieren) Nervenzellen entlang spezifischer Wege zu ihren Bestimmungsorten. In der Folge bilden sie fadenförmige Fortsätze (Axone), welche auf stereotypen Pfaden zu ihren Zielzellen auswachsen. Zu ihrer Orientierung benützen die migrierenden Nervenzellen und ihre Axone wegweisende Moleküle in ihrer Umgebung. Diese Moleküle üben eine anziehende, abstossende und / oder wachstumsfördernde Wirkung aus und bilden dadurch eine 'molekulare Landkarte', die Nervenzellen und Axonen den korrekten Weg weisen. Vorübergehende Interaktionen von Oberflächen-Rezeptoren und Zelladhäsionsproteinen mit diesen wegweisenden Molekülen ermöglichen den Nervenzellen und -fortsätzen das 'Lesen' dieser Landkarte und somit die Wahl des korrekten Wegs. Die Mehrzahl solcher Adhäsionsmoleküle gehört der Immunoglobulin-Superfamilie der neuronalen Zelladhäsionsmoleküle (IgCAMs) an. Wir haben kürzlich Proteine einer neuen IgCAM Subfamilie isoliert, welche MAM domain containing GPI anchored proteins (MDGAs) genannt werden. Da MDGA codierende RNA vermehrt während Phasen neuronaler Migration und Axon-Wachstum synthetisiert wird, ist es wahrscheinlich, dass diese Adhäsion-vermittelnden Proteine zur Entwicklung des Nervensystems beitragen. Im Vergleich zu anderen Modellorganismen weist der Zebrafisch verschiedene Vorteile auf, daher haben wir diesen tropischen Fisch zur Analyse der Eigenschaften der MDGA Proteine gewählt. Unter anderem sind Zebrafisch Embryonen leicht zugänglich, auch sind sie während embryonalen Stadien durchsichtig und entwickeln sich rasch.

Mit Hilfe der Ratten- und Huhn MDGA Sequenzen haben wir Datenbank-Suchen vorgenommen und in der Folge drei Zebrafisch MDGA Gene isoliert. Eines dieser Gene ist ein MDGA-1 Ortholog, die beiden anderen Gene sind MDGA-2 Orthologe. Zebrafisch MDGA Proteine besitzen dieselben strukturellen Eigenschaften wie ihre Orthologen in anderen Arten, namentlich sechs Ig-Domänen, ein Fibronectin-Repeat, eine MAM-Domäne und einen GPI-Anker.

Interessanterweise ist in Stadien, da Nervenzellen wandern und Axone wachsen, besonders viel MDGA RNA feststellbar. Zellen, die Transkripte von allen drei oder von zwei MDGA Proteinen synthetisieren, befinden sich im Rückenmark, Hinterhirn, Kleinhirn, Zwischenhirn und im Ventrikel des Mittelhirns. MDGA-1 codierende RNA ist zudem in einigen Ganglien des peripheren Nervensystems zu finden, unter anderem im trigeminalen Ganglion, in den Ganglien des Seitenlinienorgans sowie im statoakustischen Ganglion. MDGA-2A positive Zellen des peripheren Nervensystems befinden sich ebenfalls in den Ganglien des Seitenlinienorgans sowie im sensorischen

Ganglion des zehnten Kranialnervs. RNA des dritten MDGA Proteins wird in den Augen, im Ohr, in der Epiphyse und entlang von Hirnregionen exprimiert.

Die Analyse der MDGA-2A Proteinverteilung hat uns einen tieferen Einblick in die mutmasslichen Funktionen des MDGA-2A Proteins erlaubt. Dabei haben wir festgestellt, dass ein MDGA-2A spezifischer Antikörper verschiedene reticulospinale Interneuronen, deren Axone und einige Nervenzell-Fortsätze im Rückenmark erkennt. Im peripheren Nervensystem sind Kranialnerven und die davon innervierten Muskeln MDGA-2A positiv. Ferner ist das MDGA-2A Protein auf den Nerven des statoakustischen und des Seitenlinienorgans, sowie auf deren Zielorganen, den Neuromasten erkennbar.

In Zebrafischen, deren MDGA-1 oder MDGA-2A Proteinmenge reduziert wurde, sind die neuronalen Gruppierungen des fünften und siebten Kranialnervs örtlich verschoben. Zusätzlich enthalten diese Zellgruppierungen weniger Zellen. Im Unterschied dazu scheint die Anzahl der Nervenzellen des zehnten Kranialnervs erhöht zu sein. Ausserdem wirken der fünfte und der siebte kraniale Nervenstrang dünner als üblich. Ferner hat die Analyse des trigeminalen sensorischen Ganglions in Fischen mit reduzierter MDGA-1 Proteinmenge gezeigt, dass sich weniger Zellen in diesen Ganglien befinden. Zudem ist das periphere, im Unterschied zum zentral-projezierenden Nervenbündel dünner. Auch scheinen einige periphere Nervenfortsätze entlang unüblicher Pfade zu wachsen.

Aufgrund der hier vorliegenden Daten ist anzunehmen, dass MDGA Proteine eine entscheidende Rolle während der Migration von Nervenzellen und dem Wachstum derer Axone spielen. Die Abwesenheit von MDGA Proteinen führt zu verschiedenen Migrationsfehlern, welche sich in der Verschiebung von neuronalen Gruppen oder in einer geringeren Anzahl Neuronen innerhalb dieser Gruppierungen äussern. Ausserdem fallen Nervenfasern, welche von diesen Zellgruppen gebildet werden, dünner aus als üblich. Ein Grund dafür könnte bei der reduzierten Anzahl von Nervenzellen in den entsprechenden Zellgruppen liegen. Ein anderer Grund für die geringere Anzahl Axone innerhalb dieser Nervenfasern mag im Ausbleiben der Faszikulierung-fördernden Wirkung der MDGA Proteine zu finden sein.