



Doctoral Thesis

Effects of the absence of Schwann cell membrane proteins on myelin formation and survival of axons

Electron microscopic investigations on myelin formation in beta4 integrin-deficient mice and on survival of axons in aged P0-deficient mice

Author(s):

Frei, Regula

Publication Date:

1999

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-003840070> →

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. 13321

Effects of the Absence of Schwann Cell Membrane Proteins on Myelin Formation and Survival of Axons

Electron microscopic investigations on myelin formation in
 $\beta 4$ integrin-deficient mice and on survival of axons in aged
P0-deficient mice

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY
ZURICH

For the degree of
Doctor of Natural Sciences

Presented by
Regula Frei
Dipl. Natw. ETH
Born: 12.02.1970
Citizen of Leuggern (AG)

Accepted on the recommendation of:
Prof. Dr. Ueli Suter, examiner
Prof. Dr. Rudolf Martini, co-examiner
1999

1 Kurzfassung

Die schnelle Fortleitung von elektrischen Impulsen im peripheren Nervensystem beruht auf der Isolation der Axone durch die Mark- (Myelin-) scheiden. Eine Voraussetzung für den Aufbau einer Markscheide ist die Wechselwirkung zwischen der Schwannschen Zelle und ihrer Basallamina. Unter mehreren Kandidaten-Molekülen, welche diese wichtige Interaktion vermitteln können gibt es die Integrine, die als spezialisierte Zelloberflächenmoleküle in der Lage sind, extrazelluläre Matrixkomponenten zu binden. Obwohl Schwannsche Zellen eine Auswahl von verschiedenen Integrin-Untereinheiten exprimieren, ist gerade das $\beta 4$ Integrin ein vielversprechender Kandidat für die Vermittlung spezifischer Wechselwirkungen in myelinisierenden Schwannschen Zellen, weil es zeit- und gewebe-spezifisch während des Beginns der Myelinisierung hochreguliert wird. Um zu klären, ob Schwannsche Zellen auch zur Markscheidenbildung fähig sind, wenn das $\beta 4$ Integrin fehlt, untersuchten wir $\beta 4$ Integrin-defiziente Mäuse. Diese Tiere sterben wenige Stunden nach Geburt, weshalb wir nur femorale Quadricepsnerven von neugeborenen Tieren elektronenmikroskopisch untersuchen konnten. Die Quadricepsnerven von $\beta 4$ Integrin-defizienten Mäusen zeigten dieselbe gemischte Population von frühen Myelinisierungsstadien wie die Kontrolltiere. Zusätzlich kultivierten wir Spinalganglien unter Bedingungen, welche eine Markscheidenbildung erlaubten. Die Quantifizierung von bemarkten Segmenten in den Kulturen, welche mit Antikörpern gegen etablierte Myelinmarker gefärbt wurden, ergab keine Unterschiede zwischen $\beta 4$ -defizienten und Kontrolltieren. Die Ultrastruktur dieser Myelinsegmente war normal. Aus diesen Ergebnissen zogen wir den Schluss, dass $\beta 4$ Integrin für die Markscheidenbildung nicht notwendig ist.

Im zweiten Projekt fokussierten wir unser Interesse auf das Zelloberflächenmolekül P0, welches das häufigste Protein im peripheren Myelin ist. Das Fehlen von P0 führt zu schwerwiegender, kongenitaler Dysmyelinisierung und zur Bildung von nichtkompaktiertem Myelin, was eine erschwerte Fortleitung des Aktionspotentials in den peripheren Nerven zur Folge hat. P0 ist eines der ursächlichen Gene für das Déjérine-Sottas Syndrom, eine klinisch schwere Form der humanen

hereditären Neuropathien. Diese Krankheit ist gekennzeichnet durch ihren Beginn in der Kindheit, Symptome von distaler Muskelschwäche, reduzierte Nervenleitgeschwindigkeiten von weniger als 10m/s und morphologischen Merkmalen von De- und Remyelinisierung. Zusätzlich zur Demyelinisierung wurden in Patienten wie auch in P0-defizienten Mäusen degenerierende Axone gefunden. Wir bestimmten das Ausmaß der axonalen Schädigung im P0-defizienten Mausmodell mit dem Ziel, eine Grundlage für Untersuchungen zu therapeutischen Möglichkeiten in Myelinkrankheiten zu finden. In verschiedenen proximalen Nervenästen fanden wir reduzierte Durchmesser von betroffenen Axonen, jedoch war keine signifikante Reduktion der Anzahl der Axone festzustellen. Distale sensible Nervenäste zeigten eine deutliche Reduktion myelinisierter Axone und die Anzahl der epidermalen sensorischen Rezeptorzellen war auffallend gering. Muskelfasern von P0-defizienten Mäusen erschienen atrophisch und zeigten Merkmale von Denervierung und Reinnervierung durch Nervensprossung aus benachbarten motorischen Einheiten. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Axone in P0-assoziierten Myelinerkrankungen von distal nach proximal fortschreitend degenerieren. Unsere Beobachtungen stützen die Annahme, dass die klinischen Symptome der Patienten, welche an einer schweren Form von hereditärer motorisch-sensibler Neuropathie erkrankt sind, möglicherweise durch die axonale Degeneration bedingt sind.

Bei anderen, nicht-hereditären, neurodegenerativen Erkrankungen, wie der Amyotrophen Lateralsklerose oder der diabetischen Neuropathie, wurden bereits neurotrophe Faktoren als vielversprechende Agenzien in das Behandlungsspektrum aufgenommen. Aufgrund unserer Resultate schlagen wir vor, dass die P0-defizienten Mäuse zum Austesten des therapeutischen Potentials von neurotrophen Faktoren in hereditären primär myelin-bedingten Neuropathien benutzt werden können.

2 Summary

The fast propagation of electric signals in the peripheral nervous system depends on the insulation of axons by myelin sheaths. A prerequisite for the formation of myelin is the interaction of the Schwann cell with its basal lamina. Among several candidate molecules that mediate this important interaction are the integrins - specialized cell surface receptors - which are able to bind to extracellular matrix components. Although Schwann cells express a set of different integrin subunits, the $\beta 4$ integrin is a promising candidate for mediating specific interactions in myelinating Schwann cells being expressed in a temporal and tissue-specific manner at the onset of myelination. To elucidate the competence of Schwann cells to myelinate in the absence of $\beta 4$ integrin, we investigated $\beta 4$ integrin-deficient mice. $\beta 4$ knockout mice die within a couple of hours after birth, therefore, we examined the femoral quadriceps nerves of newborn animals at the electron microscopic level. The femoral quadriceps nerves of $\beta 4$ -deficient mice showed the same diversity of early myelination stages as those of control animals. Furthermore, we cultured dorsal root ganglia under conditions allowing myelination. Quantification of cultured myelin-segments that were immunolabeled for established myelin proteins revealed no differences between control and knockout animals. The ultrastructure of these myelin-segments was normal. Based on these results, we concluded that the $\beta 4$ integrin subunit is not required for myelin formation.

In the second project we focused on the cell adhesion molecule P0 which is the most abundant protein in peripheral myelin. A lack of functional P0 leads to severe and congenital dysmyelination and the formation of noncompacted myelin which results in impaired propagation of action potentials in peripheral nerves. P0 is the culprit gene for a clinically severe form of human hereditary motor and sensory neuropathies, the P0-related Déjérine-Sottas syndrome. Having its onset in infancy, the disease presents with symptoms of distal muscle weakness, slowed nerve conduction velocity below 10m/s and nerve fibers that show signs of de- and remyelination. In addition to demyelination, profiles of degenerating axons were observed in patients and in the P0-deficient mouse model. We assessed the extent of axonal involvement in the P0 mouse model with the aim to provide a basis for investigations on therapeutic possibilities in myelinopathies. In different proximal nerve branches we detected reduced calibers of myelinated axons,

but no significant reduction of the axon numbers. Distal sensory nerve branches displayed a marked loss of myelinated axons and the number of sensory epidermal target cells was significantly reduced. Muscle fibers of P0-deficient mice were atrophic and demonstrated signs of denervation and reinnervation by sprouts of neighboring motor units. In conclusion, we found that axons in P0-related myelin deficiencies degenerated in a dying-back mechanism. Our observations provide additional evidence for the assumption that the clinical symptoms of patients affected by severe forms of hereditary motor and sensory neuropathies may predominantly result from axonal degeneration.

Therapeutic approaches to treat other, non-hereditary, neurodegenerative disorders such as amyotrophic lateral sclerosis or diabetic neuropathy, included neurotrophic factors as promising beneficial agents. We propose that the P0-deficient mice may be used for testing the therapeutic potential of neurotrophic factors also in hereditary myelinopathies.