



Doctoral Thesis

Analysis of the role of Integrin $\beta 1$ and the Rho GTPases Cdc42 and Rac1 in central nervous system myelination

Author(s):

Benninger, Yves Daniel Simon

Publication Date:

2006

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005276619> →

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. 16717

Analysis of the role of Integrin β 1 and the Rho GTPases Cdc42 and Rac1 in central nervous system myelination

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY (ETH) ZURICH
for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

Yves Daniel Simon Benninger

Dr. med., University of Zurich
born September 21, 1974 in Zurich
citizen of Zurich, Switzerland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Ueli Suter, examiner
Dr. Joao Bettencourt Relvas, co-examiner
Prof. Dr. Martin Schwab, co-examiner

June 2006

2 Summary

Oligodendrocytes are the myelinating cells of the central nervous system (CNS). During embryonic development they originate from specific regions of the ventricular zone, migrate and proliferate to populate the whole CNS and then start to myelinate axons. The myelin sheath is a multilamellar structure formed by spirally wrapped, lipid-rich oligodendrocyte membranes and confers the ensheathed axons an electrophysiological insulation. The serial arrangement of myelin sheath segments along a myelinated axon highly increases the velocity of action potential propagation by saltatory conduction. A single oligodendrocyte can myelinate up to 50 axons, whereas Schwann cells, the myelinating glia of the peripheral nervous system, do only myelinate a single axon. The process of myelination is a fascinating example of highly complex cell differentiation and its underlying mechanisms are only poorly understood. It has become increasingly evident that a spatially and temporally well-orchestrated array of extracellular signals guides the intrinsic developmental program of oligodendrocytes in order to achieve proper myelination throughout the CNS in a timely fashion. These extracellular signals include soluble factors, such as growth factors and chemokines, as well as cues originating within the extracellular matrix (ECM). Integrins, the major family of receptors for proteins of the ECM, have been proposed to exert important functions in oligodendrocyte development. Previous studies, using dominant-negative inhibition of integrin $\beta 1$, have suggested a role for integrin $\beta 1$ in oligodendrocyte survival, myelination and remyelination.

We tested this hypothesis using a conditional knock out technique in mice to ablate the *Integrin $\beta 1$* gene specifically in cells of the oligodendrocyte lineage. This approach allowed the study of oligodendroglial integrin $\beta 1$ signaling in the physiologically normal CNS environment, circumventing the potential drawbacks of a dominant-negative approach. We show that integrin $\beta 1$ is involved in stage-specific oligodendrocyte survival, but is not required for myelination and remyelination in the central nervous system. While integrin $\beta 1$ may also contribute to other aspects of oligodendrocyte biology, our results demonstrate that integrin $\beta 1$ signaling has a much more limited role than expected.

The changes of cell shape associated with OPC migration, proliferation, axon ensheathment and myelination are likely to require a dynamic regulation of the actin cytoskeleton. The best-characterized members of the Rho GTPase family, Cdc42, Rac1 and RhoA, have been described to integrate extracellular signals and to regulate the actin cytoskeleton, microtubule dynamics, vesicular transport and gene expression.

We examined the role of the Rho GTPases Cdc42 and Rac1 in oligodendrocyte myelination using a conditional gene knock out technique in mice to target gene ablation specifically to cells of the oligodendrocyte lineage. We demonstrate, that the ablation of both, Cdc42 and Rac1 results in a myelination phenotype, that is characterized by the focal accumulation of oligodendrocyte cytoplasm in the inner tongue resulting in extensive outfoldings of the myelin sheath. This phenotype challenges the hypothesis that the formation of the myelin sheath requires the continuous progression of the inner tongue over the axon surface. In addition, we show that Rac1 synergizes with Cdc42 in a gene-dosage dependent way to regulate myelination. However, ablation of *Cdc42* in cells of the oligodendrocyte lineage did not affect OPC proliferation, directed migration, or differentiation *in vitro*, indicating that the role of Cdc42 in oligodendrocytes is more limited than was previously assumed.

3 Zusammenfassung

Oligodendrozyten sind die myelinisierenden Zellen des zentralen Nervensystems. Während der Embryonalentwicklung migrieren sie als Oligodendrozyten Vorläuferzellen aus bestimmten Regionen der ventrikulären Zone und teilen sich, bis sie sich schliesslich im gesamten ZNS verbreitet haben und beginnen dann die Axone zu myelinisieren. Das Myelin besteht aus lipidreichen, sich spiralförmig um die Axone wickelnden Membranen von Oligodendrozyten und dient der elektrophysiologischen Isolation der Axone. Diese Myelinscheiden reihen sich entlang eines Axons aneinander und ermöglichen dadurch eine schnelle sprunghafte Ausbreitung des Aktionspotentials. Ein einzelner Oligodendrozyt kann bis zu 50 solcher Myelinscheiden bilden, wohingegen Schwann Zellen, die myelinisierenden Zellen des peripheren Nervensystems, nur jeweils ein Axon myelinisieren. Der Vorgang der Myelinisierung selbst ist jedoch noch weitgehend ungeklärt. Mit zunehmenden Wissen wird deutlich, dass die Regulation der Migration und Proliferation sowie die eigentliche Myelinisierung eine komplexe Integration extrazellulärer Signale durch den sich entwickelnden Oligodendrozyten voraussetzt. Lösliche Faktoren, wie Wachstumsfaktoren und Chemokine, als auch Komponenten der extrazellulären Matrix steuern diese Zellen durch die verschiedenen Phasen ihres intrinsischen Entwicklungsprogrammes.

Die Integrine bilden die grösste Familie der Rezeptoren, die Komponenten der extrazellulären Matrix binden. Integrine spielen jedoch nicht nur eine Rolle in der Zelladhäsion, sondern besitzen auch verschiedene Signaltransduktionsfunktionen. Ihnen wurden verschiedene Funktionen in der Regulation der Oligodendrozytenentwicklung zugeschrieben. Unter Verwendung einer dominant-negativ Inhibierung von Integrin β_1 wurde in einem transgenen Mausmodell eine Rolle für Integrin β_1 in der Myelinisierung und Remyelinisierung beschrieben. Wir haben die Rolle von Integrin β_1 in der Myelinisierung und Remyelinisierung im zentralen Nervensystem der Maus mittels eines konditionellen Gen *knock out* Systemes überprüft. Dabei wurde das *Integrin β_1* -Gen selektiv in oligodendroglialen Zellen während der frühen Embryonalentwicklung deletiert. Dieses System ermöglichte die Analyse der Funktion von Integrin β_1 in oligodendroglialen Zellen im sich

entwickelnden ZNS der Maus, ohne die potentiell nachteiligen Effekte der Expression eines dominant-negativ wirkenden Proteines. Die Analyse ergab, dass die Rolle von Integrin β_1 viel begrenzter ist, als bislang angenommen wurde. Während sich das Fehlen dieses Rezeptorproteines in einer Erhöhung der stadiumsspezifischen Apoptose von Oligodendrozyten manifestierte, zeigten sich keine Defizite in der Myelinisierung und Remyelinisierung.

Der Prozess der Myelinisierung, als auch die Migration und Proliferation der Oligodendrozyten Vorläuferzellen, erfordern wahrscheinlich eine dynamische Regulation des Aktin Zytoskelettes. Die Familie der Rho GTPasen, insbesondere Cdc42, Rac1 und RhoA, sind bekannt als Integratoren extrazellulärer Signale und als Regulatoren des Aktin Zytoskelettes, der Mikrotubuli Dynamik, des vesikulären Transportes und der Genexpression. Wir haben die Rolle von Rho GTPasen in der Entwicklung und Differenzierung der Oligodendrozyten unter Verwendung eines konditionellen Gen *knock out* Systemes in der Maus überprüft. Der Verlust von Cdc42 in Oligodendrozyten manifestierte sich in einem Defekt während der Myelinisierung. Charakteristisch waren ungewöhnliche Ansammlungen von Zytoplasma in der inneren Lippe der Myelinscheide, die im Verlauf der Myelinisierung zu grossen fokalen Ausstülpungen der Myelinscheide führten. Die Beobachtung, dass der Myelinisierungsprozess trotz grosser Zytoplasmaakkumulationen in der inneren Lippe fortschreiten konnte, stellt eine alte Hypothese des Myelinisierungsmechanismus in Frage, wonach die kontinuierliche Progression der inneren Lippe um das Axon zum spiralförmigen Aufbau des Myelins führt. Der Verlust von Rac1 manifestierte sich ebenfalls in einer abnormen fokalen Ansammlungen von Zytoplasma in der inneren Lippe mit begleitenden Ausstülpungen der Myelinscheide. Die Analyse verschiedener Doppelmutanten zeigte einen additiven und Gendosis-abhängigen Effekt auf die Ausprägung dieses Phänotyps. Wir zeigen, dass Cdc42 und Rac1 zusammen die normale Myelinisierung regulieren.