

DISS. ETH NO. 17732

**Small Rho-GTPase function in myelinating cells of the vertebrate
peripheral nervous system with focus on RhoA**

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

SVEN MATTHIAS KRAUSE

Diplom Biologe, Eberhard-Karls Universität Tübingen

Born 15.04.1978

citizen of Nidfurn, Glarus

accepted on the recommendation of:

Prof. Dr. Ueli Suter, examiner

Prof. Dr. Stephan Neuhaus, co-examiner

Dr. João B. Relvas, co-examiner

2008

2 Summary

Schwann cells are the myelinating cells of the vertebrate peripheral nervous system (PNS). These cells originate from neural crest progenitor cells and populate the developing nerves. After migration and proliferation, the Schwann cell precursors align with the immature axons and start to sort out single axons by sending out processes into axon bundles and separating single fibres from the bundle. Later, the Schwann cell processes enwrap individual axons repeatedly before maturing and forming the mature myelin sheaths, a specialized lipid rich membrane. The final number of wrappings determines the thickness of the myelin sheath, which is regulated by axon-glial signalling. Small calibre axons remain unmyelinated throughout adulthood. They stay grouped in bundles engulfed by a non myelinating Schwann cell (Remark bundles).

Myelination is a prerequisite for saltatory nerve conduction, thereby allowing faster action potential conduction without increasing axon diameter. The importance of this process is illustrated by the severe neurological consequences of demyelinating diseases such as Charcot-Marie-Tooth (CMT) diseases.

During their development Schwann cell precursors and immature Schwann cells have to integrate signals from their environment and react accordingly. To achieve this, extracellular information has to be read by the Schwann cell and translated into cellular responses, such as directed migration, cytoskeletal rearrangements or changes in transcriptional patterns. Rho GTPases play an important role in the regulation of such processes. They are known to integrate signalling cues produced by growth factors and extracellular matrix (ECM) proteins to activate a broad variety of downstream effectors. RhoA and its downstream effector Rho-Kinase (ROCK) are known to influence cellular shape, process formation and motility in various cell types. These processes are thought to be important for Schwann cell development and myelination. Several studies using dominant negative, constitutive active forms of the protein or chemical inhibition of ROCK have already suggested a regulatory role for RhoA signalling in Schwann cell development.

Therefore, using conditional transgenic mice we analysed the role of the small Rho-GTPase

family member rhoA in Schwann cell development *in vivo*. Our results show that rhoA is largely dispensable for Schwann cell development, PNS myelination, and remyelination. Classical rhoA downstream signalling was not altered in the absence of active rhoA, indicating potential compensatory roles for the less well-characterized rhoB and C proteins. In light of our previous results concerning the role of small rho GTPases cdc42 and rac1 in PNS myelination and remyelination, these results were surprising and suggest that other not yet fully characterized members of the rho GTPase family might play central roles in PNS myelination and remyelination.

3 Zusammenfassung

Schwannsche Zellen sind die myelinisierenden Zellen des peripheren Nervensystems (PNS) der Vertebraten. Diese Zellen entstammen der Neuralleiste und bevölkern den sich entwickelnden Nerv. Nach abgeschlossener Migration und Proliferation richten sich die Schwann Zell Vorläufer im unreifen Axon aus und beginnen einzelne Axone auszusortieren. Hierzu senden sie einzelne Zellfortsätze in die Axonbündel und isolieren einzelne Axone von diesen. Später werden diese Axone wiederholt von diesem Zellfortsatz umwickelt. Diese reift zur Markscheide, einer spezialisierten, lipid reichen Membran. Die endgültige Anzahl der Membranlamellen und damit die Dicke der Markscheiden werden durch axo-gliale Signale reguliert. Hierzu instruieren die Axone die sie umschliessende Schwann Zelle über ihren künftigen Durchmesser. Dünne Axone bleiben auch im adulten Stadium unmyelinisiert. Sie verbleiben mit weiteren dünnen Axonen in einem, von einer nicht myelinisierenden Schwann Zelle umschlossenen Bündel (Remark Bündel).

Die Wichtigkeit von Markscheiden für neuronale Signalweiterleitung im peripheren Nervensystem lässt sich leicht an den Einschränkungen nachvollziehen, die von peripheren Neuropathien, wie einiger Charcot-Marie-Tooth (CMT) Erkrankungen, und den mit ihnen einhergehenden Verlust der Markscheiden, hervorgerufen werden.

Während ihrer Entwicklung müssen Schwann Zell Vorläufer und unreife Schwann Zellen Signale aus ihrer Umgebung integrieren und entsprechend reagieren. Um dies zu erreichen müssen extrazelluläre Signale von Schwann Zellen erkannt werden und in entsprechende zelluläre Reaktionen wie gerichteter Migration, Veränderungen im Zytoskelett oder Änderungen der transkriptionaler Aktivität umsetzen. In diesem Prozess der intrazellulären Signaltransduction spielen Rho-GTPasen eine herausragende Rolle. Rho-GTPasen werden sowohl durch Signale von Wachstumsfaktoren als auch durch Signale der extrazellulären Matrix aktiviert und leiten diese an zahlreiche nachgelagerte Effektoren weiter. Es ist bekannt, dass RhoA und sein nachgeordneter Effektor Rho-Kinase (ROCK) in zahlreichen Zelltypen Einfluss auf die Zellform, die Bildung von Zellfortsätzen und Zellmotilität hat. Alle die zellulären Prozesse sind mit hoher Wahrscheinlichkeit für Schwann Zellen, sowohl

während der Endwicklung als auch während der Myelinisierung von grosser Bedeutung. Zahlreiche Studien haben bereits, unter Zuhilfenahme von dominant negativen, konstitutiv aktiven Formen von RhoA oder durch die chemische Inhibition von RhoA oder ROCK, einen Einfluss der Signaltransduktion von RhoA auf Schwann Zellen nachgewiesen.

Daher untersuchten wir die Funktion der Rho-GTPase RhoA in Schwann Zellen *in vivo*. Um RhoA spezifische Funktionen untersuchen zu können bedienten wir uns der konditionalen, zelltypspezifischen Genablation im Mausmodel. Die Charakterisierung RhoA defizienter Schwann Zellen *in vitro* und die Analyse von Gewebe des peripheren Nervensystems *in vivo* zeigte keinerlei Phänotyp. Auch der Prozess der Remyelinisierung nach Verletzung liess sich nicht von der in Kontrolltieren unterscheiden. Im Gegensatz zu RhoA zeigen Cdc42 und Rac1 defiziente Tiere zahlreiche Phänotypen während der Myelinisierung und Remyelinisierung. Überraschender weise waren einige klassische RhoA Signaltransduktionswege in der Abwesenheit von RhoA nicht eingeschränkt. Diese Tatsache rückt weniger gut charakterisierte Mitglieder der Rho-GTPase Familie in den Vordergrund.

Zusammenfassend zeigt diese Studie, dass RhoA für die Myelinisierung der peripheren Nervensystems verzichtbar ist und wirft die Frage auf, welche anderen Rho-GTPasen während der Verwandlung eines Schwann Zell Vorläufers in eine myelinisierende Schwann Zelle eine zentrale Rolle spielen.