

Diss. ETH Nr. 20328

**The small Rho GTPase Cdc42 regulates Schwann cell proliferation,
peripheral nervous system demyelination, remyelination and
myelin maintenance**

A dissertation submitted to the

ETH Zurich

For the degree of

Doctor of Sciences

presented by

Reto Arnold Baumann

MSc ETH in Biology

ETH Zurich, Switzerland

Born 27.2.1983

Citizen of Bubendorf, BL

Accepted on the recommendation of:

Prof. Dr. Ueli Suter, examiner

Prof. Dr. Esther Stöckli, co-examiner

Dr. João B. Relvas, co-examiner

2012

2. Summary

Schwann cells (SCs) are the myelinating glia of the peripheral nervous system (PNS). In a remarkable process, SCs insulate nerve axons by ensheathing them with multiple layers of fatty membrane. To take on their assigned function, SCs have to proliferate, migrate and undergo morphological changes, involving interpretation of a multitude of extracellular signals and massive cytoskeletal rearrangements. Members of the family of small Rho GTPases, binary molecular switches with highly pleiotropic cellular functions, have been shown to specifically regulate multiple aspects of PNS myelination. Early embryonic inactivation of the gene encoding the Rho GTPase Cdc42 in the PNS of conditional knockout mice is known to cause radial sorting deficits due to decreased SC proliferation, resulting in severe hypomyelination of peripheral nerve axons and associated neurological deficits.

In this study I combined various *in vivo* and *in vitro* approaches to elucidate the function of Cdc42 in SC proliferation, PNS myelination, demyelination, remyelination and myelin maintenance. My results indicate that Cdc42 regulates SC proliferation in a cell autonomous manner by relaying extracellular mitogenic signals to intracellular signaling cascades. *In vivo* I found Cdc42 to be a central mediator of neuregulin (NRG) signaling, a growth factor of pivotal importance, known to regulate multiple aspects of SC biology and myelination. In the adult PNS, Cdc42 regulates demyelination after nerve injury by controlling the activity of c-JUN, a transcription factor and known negative regulator of myelination. Loss of Cdc42 thereby leads to a markedly slowed dedifferentiation of mature myelinating SCs back into their non-myelinating immature state. After the initial phase of demyelination, Cdc42 controls onset and extent of remyelination by allowing process extension and stabilization in mature SCs, supposedly by regulating the activity of N-WASP, Rac1 and myosin light chain 2 (MLC2). Mice devoid of Cdc42 never fully recover from injury, and dissociated DRG (dorsal root ganglion) explant cultures, where Cdc42 has been acutely ablated in SCs, fail to myelinate. This indicates that Cdc42 is important not only for the onset, but also for the progression of myelination.

Additionally, I show that continuous activity of Cdc42 is essential for myelin maintenance by ensuring correct endocytosis and recycling of components from the myelin sheath. Loss of Cdc42 function leads to the formation of myelin aberrations and axonal demyelination, closely resembling a specific subtype of the hereditary motor and sensory neuropathy Charcot-Marie-Tooth disease type 4H (CMT4H), which is caused by mutations in the gene coding for FDG4/Frabin, a Cdc42-specific activator. Using state-of-the-art electron microscopic techniques, I managed to generate three-dimensional representations of very high spatial resolution, which will help to better understand underlying pathomechanisms of CMT4H in the future.

3. Zusammenfassung

Schwann-Zellen sind die myelinisierenden Gliazellen des peripheren Nervensystems (PNS). In einem bemerkenswerten Vorgang isolieren Schwann-Zellen die Axone mit mehreren Schichten lipidreicher Zellmembran. Damit Schwann-Zellen ihre spezialisierte Funktion korrekt ausüben können, müssen sie kontrolliert proliferieren, migrieren und morphologische Veränderungen durchleben. Diese Prozesse involvieren die Interpretation einer Vielzahl von extrazellulären Signalen und massive zytoskeletale Reorganisationen. Mitglieder der Familie der kleinen Rho GTPasen, binäre molekulare Schalter mit hoch pleiotropen zellulären Funktionen, sind dafür bekannt, spezifisch verschiedene Aspekte der Myelinisierung zu regulieren. Inaktivierung des Gens für die Rho GTPase Cdc42 früh in der embryonalen Entwicklung in konditionellen knockout Mäusen führt zu Defekten im Prozess des so genannten „radial sorting“, verursacht durch verminderte Schwann-Zell Proliferation. Dies resultiert schlussendlich in starker Hypomyelinisierung der Axone des PNS mit assoziierten schwerwiegenden neurologischen Defiziten.

In dieser Studie habe ich verschiedenste experimentelle *in vivo* und *in vitro* Systeme verwendet, um die genaue Funktion von Cdc42 in der Kontrolle der Schwann-Zell Proliferation, PNS Myelinisierung, Demyelinisierung, Remyelinisierung und Aufrechterhaltung der myelinisierten Strukturen, aufzuklären. Meine Resultate zeigen, dass Cdc42 die Proliferation von Schwann-Zellen Zell-autonom reguliert, indem dieses Protein mitogene extrazelluläre Signale auf intrazelluläre Signalkaskaden vermittelt. *In vivo* erscheint Cdc42 als zentraler Mediator von Neuregulin, einer Familie von Wachstumsfaktoren von grösster Wichtigkeit, die verschiedenste Aspekte der Entwicklung von Schwann-Zellen und der Myelinisierung von Axonen kontrollieren. Im adulten PNS reguliert Cdc42 die Demyelinisierung nach Verletzung, indem es die Aktivität von c-JUN reguliert, einem Transkriptionsfaktor und bekanntem negativen Regulator der Myelinisierung. Verlust von Cdc42 führt dabei zu einer deutlich verlangsamten Dedifferenzierung von maturen, myelinisierenden Schwann-Zellen zurück in einen nicht-myelinisierenden, immaturren Zustand. Nach einer anfänglichen Phase der Demyelinisierung kontrolliert Cdc42 den Beginn und das Ausmass der Remyelinisierung, indem es die Bildung und Stabilisierung von zellulären Prozessen in maturen Schwann-Zellen positiv beeinflusst. Dies kann in Zellkulturen aus primären Schwann-Zellen gut beobachtet werden und geschieht offensichtlich durch Regulation der Aktivität von N-WASP (Wiskott-Aldrich Syndrome Protein), Rac1 und MLC2 (myosin light chain 2), die alle bereits dafür bekannt sind, wichtige Rollen in der Myelinisierung einzunehmen. Mäuse, denen Cdc42 fehlt, erholen sich nie mehr vollständig von einer Verletzung der peripheren Nerven, und dissoziierte DRG (dorsal root ganglion, Spinalganglion) Kulturen, in denen das Gen für Cdc42 akut inaktiviert wurde,

sind unfähig zu myelinisieren. Dies bedeutet, dass Cdc42 nicht nur für den Beginn, sondern auch für das Fortschreiten der Myelinisierung, wichtig ist.

Zusätzlich zeige ich, dass kontinuierliche Aktivität von Cdc42 essentiell für die Aufrechterhaltung von myelinisierten Strukturen ist, indem es korrekte Endocytose und Rezyklierung von Komponenten der Myelinscheiden sicherstellt. Verlust der Funktion von Cdc42 führt zu progressiver Bildung von strukturellen Anomalien des Myelins und zu axonaler Demyelinisierung, die einem spezifischen Subtypen der Familie von erblichen motorischen und sensorischen Neuropathien, Charcot-Marie-Tooth Krankheit Typ 4H (CMT4H) stark ähneln. CMT4H wird seinerseits durch Mutationen im Gen für FDG4/Frabin, einem Cdc42-spezifischen Aktivator, verursacht. Mittels modernster elektronenmikroskopischer Techniken gelang mir die hochauflösende räumliche Darstellung dieser Myelindefekte, welche dabei helfen wird, den Krankheitsverlauf von CMT4H besser zu verstehen.