

Diss. ETH N<sup>o</sup> 20331

**FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF FRABIN, A PROTEIN MUTANT IN  
CHARCOT-MARIE-TOOTH DISEASE**

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

MICHAEL HORN

Dipl. Biochem., Eberhard-Karls-Universität Tübingen

born 09.03.1980

citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Ueli Suter (examiner)

Dr. Joao Relvas (co-examiner)

2012

## 2. Summary

Charcot-Marie-Tooth disease (CMT) constitutes the most commonly inherited neurological disorder, with a prevalence of approximately one affected individual in 2,500 people. The course of CMT is characterized by disease onset in the first decades of life and progressive impairment of neuromuscular function. Clinical hallmarks of CMT include distal muscle weakness and atrophy, distal sensory loss and limb deformities. As disease of the peripheral nervous system (PNS), CMT is caused by genetic alterations affecting both Schwann cells (SCs) and neurons. So far, more than 30 genes have been found to display mutations leading to CMT, which therefore constitutes a genetically heterogeneous condition with autosomal dominant, autosomal recessive, or X-linked inheritance.

Recently, mutations in the *FGD4* gene have been found to lead to CMT4H, an autosomal recessive demyelinating form of CMT. *FGD4* encodes Frabin (FGD1-related F-actin-binding protein), a molecule putatively involved in the activation of Rho GTPases. *FGD4* mutations in affected individuals suggested loss of Frabin function to be causative for the CMT4H phenotype. Our aim was therefore to further characterize Frabin, elucidating its role in PNS development and maintenance, but also clarifying its cellular and molecular function.

With the Frabin null (*Fgd4* 0/0) mouse line, we reconstructed the human condition in a rodent model, and therefore provided an animal model for CMT4H. The analysis of *Fgd4* 0/0 mice revealed a slight impairment in motor performance and electrophysiological alterations in the absence of Frabin. Importantly, histopathological features such as myelin outfoldings, redundant myelin loops, and signs of demyelination and remyelination such as detected in sural nerve biopsies from CMT4H patients could be reproduced in *Fgd4* 0/0 animals and accurately quantified at the ultrathin level. This allowed us to assess disease progression from early developmental to late adult stages. Furthermore, the mouse model enabled us to compare distal and proximal nerves, and also sensory and mixed fibers, concerning frequency and kind of histopathological alterations as well as numbers of myelinated axons. Therefore, the *Fgd4* 0/0 mouse line provided an overall picture of CMT4H pathology, demonstrating that loss of Frabin leads to a demyelinating neuropathy with early onset and slow progression, but no loss of myelinated axons in the animal model, equally affecting sensory and mixed fibers, and leading to alterations much more pronounced in distal nerves than in proximal nerves.

Conditional Frabin deficient mouse lines allowed us to dissect cellular aspects of Frabin function. Schwann cell specific ablation of Frabin led to a phenotype qualitatively and quantitatively resembling the Frabin null situation, while motor neuron specific loss of Frabin did not cause any detectable alteration. Therefore, a Schwann cell-specific role of Frabin loss in CMT4H is obvious. Furthermore, glia-specific ablation of Frabin in adult mice revealed a substantial role of Frabin for myelin maintenance. Therefore, the animal models allowed us to link CMT4H pathology to a function of myelinating Schwann cells required during establishment and maintenance of the myelin sheath.

On the molecular level, we found reduced active levels of the Rho GTPases Cdc42 and Rac1 in *Fgd4* 0/0 mice when compared to wild type mice, with total protein levels of these molecules being

unchanged. This finding is indicative of a GTP exchange factor (GEF) function of Frabin acting on one or both of these Rho GTPases, suggesting a reduced Rho GTPase activity to be causative for the Schwann cell function disturbed in disease. In line with this finding, glia-specific Cdc42 ablation in adult mice qualitatively reproduced histopathological alterations detected in the *Fgd4 0/0* situation, indicating a joint function of Frabin and Cdc42 for correct myelin homeostasis. Finally, an *in vitro* cell culture model revealed that both Frabin and Cdc42 function is required for efficient endocytosis in Schwann cells. We therefore propose that Frabin and Cdc42 jointly regulate myelin homeostasis by enabling efficient endocytosis in Schwann cells, and that, if one of these two molecules is absent, reduced endocytosis results in the accumulation of redundant material in the myelin sheath, leading to the histopathological features typical for CMT4H. The proposed homeostasis model for myelin maintenance is strengthened by the finding that *in vivo*, Frabin loss leads to up regulation of genes required for endocytosis and a down regulation of genes involved in the biosynthesis of myelin components, which most likely constitutes a cellular compensatory mechanism aimed at reducing the amount of material in the myelin sheath.

In conclusion, we have provided an animal model for CMT4H, and have clarified cellular and molecular mechanisms altered in CMT4H. With the myelin homeostasis model we have set a basis for the further understanding of Schwann cell biology and for disease mechanisms involved in peripheral neuropathies.

### 3. Zusammenfassung

Charcot-Marie Tooth (CMT) Erkrankungen sind die am häufigsten vorkommenden erblichen neurologischen Störungen beim Menschen und treten in der Bevölkerung mit einer Häufigkeit von etwa 1 : 2500 auf. Charakteristisch für den CMT Krankheitsverlauf ist ein Auftreten neurologischer Beeinträchtigungen in den ersten Lebensdekaden, gefolgt von einem progressiven Verlust neuromuskulärer Funktionen im Lauf des Lebens. Klinisch zeichnen sich CMT Erkrankungen durch Auftreten distaler Muskelschwäche und –atrophie aus, distalen Verlusts sensorischer Funktionen und pathologischen Veränderungen an den Extremitäten. CMT Erkrankungen betreffen ausschliesslich das periphere Nervensystem und werden durch genetische Mutationen verursacht, die sowohl Schwannsche Zellen als auch Neuronen betreffen. Mittlerweile sind Mutationen in über 30 Genen entdeckt worden, die CMT Erkrankungen verursachen. Somit stellt die CMT Neuropathie eine genetisch heterogene Erkrankung dar, die autosomal dominant, autosomal rezessiv, oder X-chromosomal vererbt werden kann.

Mutationen im Gen *FGD4* sind kürzlich als Ursache für das Auftreten einer autosomal rezessiven, demyelinisierenden Form von CMT Erkrankung entdeckt worden, nämlich CMT4H. *FGD4* kodiert Frabin (FGD1-related F-actin-binding protein), ein Protein welches möglicherweise die Aktivierung von Rho GTPasen bewirkt. Die Mutationen im Gen *FGD4* legen den Schluss nahe, dass ein Verlust der Frabin Funktion für das Auftreten der CMT4H Neuropathie verantwortlich ist. Unser Ziel ist somit die funktionelle Charakterisierung des Proteins Frabin, die Aufklärung seiner Rolle bei der Entwicklung und Erhaltung des peripheren Nervensystems, sowie die Offenlegung seiner zellulären und molekularen Funktionen.

Mit der Frabin Null Mauslinie (*Fgd4 0/0*) haben wir die menschliche Erkrankung CMT4H in ein Nagermodell rekonstruiert. Die Analyse unseres Tiermodells hat ergeben, dass ein Verlust des Proteins Frabin zu einer leichten Beeinträchtigung der motorischen Funktion des Tieres führt, sowie elektrophysiologische Veränderungen verursacht. Entscheidend ist, dass histopathologische Veränderungen, die in Biopsien des Suralis-Nerves von CMT4H Patienten auftreten, wie etwa Myelinausstülpungen, überschüssige Myelinschleifen sowie Anzeichen für De- und Remyelinisierung, im *Fgd4 0/0* Mausmodell ebenfalls auftreten und akkurat auf Ultradünnschnitten quantifiziert werden können. Dies hat uns einerseits ermöglicht, den Krankheitsverlauf, angefangen bei frühen Entwicklungsstufen, bis hin zu späten adulten Phasen, zu verfolgen. Andererseits konnten wir distale und proximale, sowie rein sensorische und gemischte Nerven bezüglich der Häufigkeit des Auftretens histopathologischer Veränderungen und der Gesamtzahl myelinisierter Fasern miteinander vergleichen. Somit hat uns das *Fgd4 0/0* Mausmodell einen Überblick über die gesamte mit CMT4H assoziierte Neuropathologie ermöglicht und gezeigt, dass Verlust des Proteins Frabin zu einer demyelinisierenden Neuropathie führt, die früh beginnt und langsam fortschreitet, im Mausmodell nicht zum Verlust myelinisierender Axone führt, sensorische und gemischte Nerven gleichermassen betrifft, jedoch in distalen Nerven wesentlich ausgeprägter auftritt als in proximalen Nerven.

Konditionale, Frabin defiziente Mauslinien, haben es uns ermöglicht, zelluläre und molekulare Funktionen von Frabin aufzuklären. Eine spezifisch in Schwannschen Zellen erfolgte Deletion von Frabin hat einen Phänotyp erzeugt, der qualitativ und quantitativ der Situation in *Fgd4* 0/0 Mäusen nahe kam. Eine spezifisch in Motoneuronen erfolgte Deletion von Frabin führte hingegen zu keinen offensichtlichen neuropathologischen Veränderungen. Weiterhin hat eine Glia spezifische Deletion von Frabin in adulten Mäusen eine wichtige Rolle des Proteins bei der Myelinerhaltung offenbart. Somit konnten wir mit Hilfe unserer Tiermodelle die in CMT4H auftretende Pathologie auf eine Funktion Schwannscher Zellen zurückführen, die sowohl beim Aufbau, als auch bei der Erhaltung der Myelinschicht eine wichtige Rolle spielt.

Auf molekularer Ebene konnten wir aufzeigen, dass die Menge an aktiven Cdc42 und Rac1 in *Fgd4* 0/0 Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen reduziert ist, dass aber absolute Proteinnengen unverändert bleiben. Dieses Ergebnis legt den Schluss nahe, dass Frabin als GTP Austauschfaktor (GEF) bezüglich einer, oder beider dieser Rho GTPasen fungiert, und dass die Verringerung der Mengen an aktiven Rho GTPasen für den krankheitsbedingten Verlust von Funktionen der Schwannschen Zellen die Verantwortung tragen könnte. Dieser Schluss wurde durch die Beobachtung verstärkt, dass Glia spezifische Deletion von Cdc42 in adulten Mäusen qualitativ ähnliche histopathologische Veränderungen hervorruft, wie diejenigen, die in *Fgd4* 0/0 Mäusen beobachtet wurden. Somit ist eine gemeinsame Funktion von Frabin und Cdc42 bei der Sicherstellung einer korrekten Homöostase des Myelins naheliegend. Schliesslich konnten wir in einem *in vitro* Modell mit kultivierten Zellen zeigen, dass sowohl Frabin als auch Cdc42 für eine effiziente Endozytose vonnöten sind. Wir schlagen somit vor, dass Frabin und Cdc42 gemeinsam die Homöostase der Myelinschicht regulieren, indem sie effiziente Endozytose in Schwannschen Zellen ermöglichen. Sollte die Funktion eines der beiden Moleküle beeinträchtigt sein, führt dies zu reduzierter Endozytose und somit zur Ansammlung überschüssigen Materials in der Myelinschicht, welches die für CMT4H typische Histopathologie bedingt. Das hier vorgeschlagene Homöostasemodell für die Myelinerhaltung wird durch die Beobachtung gestützt, dass *in vivo* Verlust von Frabin zur Verstärkung der Expression von Genen führt, die Endozytose ermöglichen und gleichzeitig in der Verringerung der Expression von Genen resultiert, welche die Biosynthese von Bestandteilen der Myelinschicht steuern. Diese Beobachtung ist vermutlich auf einen zellulären Kompensationsmechanismus zurückzuführen, welcher die Reduzierung des Materials innerhalb der Myelinschicht anstrebt.

Zusammenfassend haben wir mit der Bereitstellung und Charakterisierung eines Tiermodells für CMT4H zelluläre und molekulare Mechanismen aufgedeckt, die in CMT4H beeinträchtigt sind. Mit dem Homöostasemodell haben wir eine Grundlage zu einem breiteren Verständnis der Biologie Schwannscher Zellen gelegt, sowie zum Verständnis molekularer Mechanismen beigetragen, die in peripheren Neuropathien eine Rolle spielen.