

DISS. ETH NO. 25448

The role of Ral GTPases in Schwann cell development and myelination

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

ANDREA OMMER
M.Sc. University of Bonn

born on 05.11.1988

citizen of Germany

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Ueli Suter, examiner
Prof. Dr. Martin E. Schwab, co-examiner
PD Dr. Hauke B. Werner, co-examiner

2018

1. Summary

Myelination enables the fast conduction of action potentials along axons that is called saltatory conduction. In the peripheral nervous system (PNS) Schwann cells (SCs) form myelin by wrapping their membrane spirally around a segment of a single axon. To enable this process SC precursors have to increase in numbers by proliferation and select an axon suitable for myelination in a process called radial sorting. The 1:1 relationship between SC and axon that is established during radial sorting is necessary for myelination. These processes require the integration of cellular signals deriving from multiple sources such as the axon and the extracellular matrix (ECM) surrounding the SC. In search of novel proteins that regulate the development of SCs, we found screening approaches from other groups that identify the Ral family of small GTPases as potential candidates. The Ras-like GTPases RalA and RalB have been implicated in a variety of cellular functions that are known to be crucial for SCs such as proliferation, cell-cycle progression, formation of cellular protrusions, vesicle targeting, and polarity. Most of this knowledge is derived from studying tumor cells since Rals are an important effector of the proto oncogene Ras.

In this study, we aimed to investigate the function of the Ral GTPases RalA and RalB in the development of SCs. We used mice lacking expression of either RalA in SCs, or RalB in all cell types, or a combination of both as a model to investigate the impact that absence of Rals had on developmental myelination in the sciatic nerve. Our results show that Ral GTPases are required for the radial sorting of axons by SCs and also potentially for the long-term maintenance of axons and myelin. We show that during SC development Ral GTPases are either functionally redundant or can compensate for the loss of the other Ral since only mice deficient for both GTPases developed radial sorting defects. In contrast, we identify a function in the homeostasis of mature myelin that is unique to RalB. We show that the observed radial sorting defect was not due to decreased proliferation of SCs but rather caused by a deficiency in the extension of cellular protrusions. By culturing primary SCs of Ral deficient mice, we

were able to identify the exocyst complex as the Ral effector that mediates the effect of Ral signaling on the cytoskeleton to promote process extension in SCs. Integrating our work with the published work of others, we propose a model in which Ral GTPases and the exocyst complex act downstream of Ras to regulate the actin cytoskeleton by recruiting actin nucleating factors to the sites of process formation.

2. Zusammenfassung

Die Myelinisierung von Axonen ermöglicht die schnelle Weiterleitung von Aktionspotenzialen, was als saltatorische Reizweiterleitung bezeichnet wird. Im peripheren Nervensystem (PNS) bilden Schwann-Zellen (SZ) die Myelinscheide, indem sie ihre Membran spiralförmig um ein Segment eines einzelnen Axons wickeln. Um diesen Prozess zu ermöglichen müssen SZ-Vorläuferzellen zunächst ihre Anzahl durch Proliferation erhöhen. Anschließend findet das „radial sorting“ statt, ein Verfahren bei dem die SZ ein für die Myelinisierung geeignetes Axon auswählt. Das so entstandene 1:1 Verhältnis von SZ zu Axon ist für den Beginn der Myelinisierung notwendig. Diese Prozesse erfordern die Integration extrazellulärer Signale unterschiedlichen Ursprungs, wie beispielsweise vom Axon und der extrazellulären Matrix um die SZ. Um neue Proteine zu finden, die eine wichtige Rolle in der Entwicklung von SZ spielen, nutzten wir die durch Screening-Experimente gewonnenen Daten anderer Gruppen und identifizierten so die Familie der Ral GTPasen (abgeleitet vom englischen „Ras-like“) als potenzielle Kandidaten. Die GTPasen RalA und RalB wurden bereits mit verschiedenen zellulären Funktionen in Verbindung gebracht von denen bekannt ist, dass sie für die Entwicklung von SZ wichtig sind wie zum Beispiel die Proliferation, die Regulation des Zellzyklus, die Bildung von Zellfortsätzen, der gezielte Transport von Vesikeln und die Polarität der Zelle. Ein Großteil der Erkenntnisse über Ral GTPasen stammt aus Experimenten mit Tumorzellen, da Ral GTPasen ein wichtiger Effektor des Protoonkogens Ras sind.

Ziel dieser Arbeit war es die Funktion der Ral GTPasen in der SZ-Entwicklung zu untersuchen. Dafür verwendeten wir transgene Mäuse, die entweder kein RalA in SZ exprimierten oder in denen alle Zelltypen defizient für RalB waren, sowie eine Kombination beider Modelle. Anschließend analysierten wir, welchen Einfluss das Fehlen der Ral GTPasen auf die Myelinisierung im *Nervus ischiadicus* hatte. Unsere Ergebnisse zeigen, dass Ral GTPasen für das „radial sorting“ von Axonen durch SZ und möglicherweise auch für die

langfristige Erhaltung von Axonen und Myelin erforderlich sind. Wir zeigen außerdem, dass RalA und RalB während der SZ-Entwicklung entweder funktionell redundant sind oder den Verlust der anderen GTPase kompensieren können, denn nur der Verlust beider GTPasen führte zu einer Beeinträchtigung des „radial sortings“ in Mäusen. Im Gegensatz dazu hat RalB Funktionen in der Homöostase von Myelin, die nicht von RalA übernommen werden konnten. Wir zeigen, dass die beobachtete Beeinträchtigung im „radial sorting“ nicht durch eine verminderte Proliferation von SZ bedingt ist, sondern auf eine verminderte Bildung und Aufrechterhaltung von Zellfortsätzen zurückzuführen ist. *In vitro* Experimente mit primären SZs von Ral-defizienten Mäusen identifizierten den sogenannten Exocyst-Komplex als den Effektor der Ral GTPasen, der in SZs auf das Zytoskelett einwirken kann um die Bildung von Zellfortsätzen zu fördern. Im Zusammenhang mit publizierten Arbeiten anderer Gruppen schlagen wir daher ein Modell vor, in welchem aktives Ras die Ral GTPasen aktiviert und diese zusammen mit dem Exocyst-Komplex direkte Effektoren des Aktin-Zytoskeletts dorthin rekrutieren, wo diese zur Bildung von Zellfortsätzen benötigt werden.