

Postsynaptic machinery formation and remodelling - the roles of α -dystrobrevin-1- interacting proteins and of extracellular matrix

Marcin Pęziński

Streszczenie

Złącze nerwowo-mięśniowe jest chemiczną synapsą pomiędzy neuronem motorycznym a włóknem mięśnia szkieletowego. Do komunikacji pomiędzy dwoma typami komórek dochodzi przez uwolnienie neuroprzekaźnika acetylocholino (ACh) z terminalu presynaptycznego, który po złączeniu się ze swoim receptorem (AChR) umożliwia wymianę jonów pomiędzy miocytem, a przestrzenią pozakomórkową co prowadzi do depolaryzacji mięśnia i jego skurczu. Obecnie rozpoznanych jest ponad 300 chorób układu nerwowo-mięśniowego. Pośród tych, których etiologia została poznana, zaburzenia często wynikają ze zmian w kompleksach białkowych które stabilizują molekularną maszynę postsynaptyczną wewnątrz błony komórkowej takich jak kompleks dystroglicanu (DGC). DGC jest odpowiedzialny za zakotwiczenie maszyny postsynaptycznej do filamentów cytoszkieletu oraz białek macierzy pozakomórkowej. Białko α -dystrobrevina 1 (α DB1) jest jednym z kluczowych elementów DGC, gdyż jego brak powoduje zaburzenia w organizacji całej maszyny postsynaptycznej. Jednakże dokładna funkcja α DB1 jest nie odkryta. W celu zrozumienia, w jaki sposób α DB1 przyczynia się do organizacji maszyny postsynaptycznej, podjąłem się identyfikacji oraz analizy funkcji białek oddziaływujących z α DB1. Moja praca skupiła się na badaniu dwóch białek- lipryny- α -1 oraz Tks5, gdyż analiza spektrometrii mas wykazała, iż oba łączą się z α DB1, lecz żadne nie było wcześniej opisane w kontekście maszyny postsynaptycznej. Dowiodłem, że białko rusztowania lipryna- α -1 jest odpowiedzialne za organizację mikrotubul znajdujących się bezpośrednio pod AChR, dzięki którym receptory dostarczone do błony komórkowej są w stanie tworzyć charakterystyczne dla maszyny postsynaptycznej skupiska znane jako klastry AChR. W badaniach nad Tks5 wykazałem, że jest odpowiedzialne za tworzenie się struktur znanych jako podosomy synaptyczne wewnątrz klastrów AChR, oraz za modulowanie oddziaływania cytoszkieletu aktyny z maszyną postsynaptyczną. Dodatkowo, opisałem nową metodę hodowli komórek mięśniowych in vitro w celu uzyskania kultur ze zwiększoną ilością klastrów AChR, bazującą na pokrywaniu powierzchni hodowlanej alternatywnymi izoformami białka lamininy. Metodę tę, z sukcesem udało mi się również zastosować w pierwotnej hodowli ludzkich komórek mięśniowych.

Postsynaptic machinery formation and remodelling - the roles of α dystrobrevin-1- interacting proteins and of extracellular matrix

Marcin Peziński

Abstract

The neuro-muscular junction (NMJ) is a chemical synapse between a motor neuron and a skeletal muscle fibre. The communication between the two cell types is endured by the release of neurotransmitter acetylcholine (ACh) from the presynaptic nerve terminal, which after binding to its receptor (AChR) induces exchange of ions between the myocyte and extracellular space, leading to depolarization of the muscle and its contraction. There are currently over 300 identified neuromuscular diseases. Among those with known etiology, aberrations in protein complexes, which stabilize the postsynaptic machinery within the plasma membrane such as the dystrophin-associated protein complex (DGC) appear to be a common cause of neuromuscular disorders. The DGC is responsible for anchoring the postsynaptic machinery to the cytoskeleton and extracellular matrix proteins. α Dystrobrevin-1 (α DB1) is one of the key components of the DGC, as its absence leads to severe disruptions of the postsynaptic machinery organization. However, the exact function of α DB1 remains undiscovered. In order to understand how does α DB1 contribute to the organization of the postsynaptic apparatus, I performed an analysis of α DB1-interacting proteins and characterized some of their functions. Two proteins were identified through mass spectrometry analysis that have not been yet studied at the NMJ before- liprin- α -1 and Tks5. Through my work I demonstrated that a scaffold protein liprin- α -1 is responsible for organization of cortical microtubules located below the postsynaptic machinery, allowing the AChRs to form clusters. On the other hand, I show that Tks5 is involved in formation of AChR cluster-remodelling structures known as synaptic podosomes, as well as recruitment of actin filaments to the postsynaptic machinery. Additionally, I developed an improved method of culturing myotubes in vitro leading to enhanced formation of the AChR clusters through the use of alternative laminin isoforms. I have also applied this method successfully to primary human muscle cells.