

Berichte aus der Biologie

Yina Zhang

**The Development and
Molecular Characterization of Muscle Spindles
from Wildtype and Mutant Mice**

Shaker Verlag
Aachen 2015

Bibliographic information published by the Deutsche Nationalbibliothek

The Deutsche Nationalbibliothek lists this publication in the Deutsche Nationalbibliografie; detailed bibliographic data are available in the Internet at <http://dnb.d-nb.de>.

Zugl.: München, Univ., Diss., 2014

Copyright Shaker Verlag 2015

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without the prior permission of the publishers.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8440-3459-2

ISSN 0945-0688

Shaker Verlag GmbH • P.O. BOX 101818 • D-52018 Aachen

Phone: 0049/2407/9596-0 • Telefax: 0049/2407/9596-9

Internet: www.shaker.de • e-mail: info@shaker.de

Zusammenfassung

Muskelspindeln sind komplexe, dehnungsempfindliche Mechanorezeptoren, die aus vier bis zwölf spezialisierten Muskelfasern bestehen. Diese intrafusalen Muskelfasern werden im zentralen (äquatorialen) Bereich durch afferente Axone und in beiden peripheren (polaren) Regionen von efferenten γ -Motoneuronen innerviert. Über die Entwicklung von Muskelspindeln auf molekularer Ebene ist kaum etwas bekannt, vor allem was cholinerge Spezialisierung angeht. In meiner Doktorarbeit konnte ich zeigen, dass nikotinische Azetylcholinrezeptoren (AChR) an der neuromuskulären Endplatte von γ -Motoneuronen sowie in der äquatorialen Region konzentriert sind. Auch die Enzyme, die für die Synthese, den Transport und den Abbau von Acetylcholin verantwortlich sind, (Cholinazetyltransferase (ChAT), Azetylcholinesterase (AChE) und vesikuläre Azetylcholintransporter (VACHT) wurden in der polaren und der äquatorialen Region gefunden. Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl die sensorischen afferenten- als auch die motorischen efferenten Neurone im Bereich des Kontaktes mit den Intrafusalfasern cholinerg spezialisiert sind.

Während der postnatalen Entwicklung der neuromuskulären Endplatte verändert sich die Zusammensetzung der AChR Untereinheiten. Aus den γ -Untereinheit enthaltenden embryonalen AChRn werden ϵ -Untereinheit enthaltende adulte AChRn gebildet. Vergleichbare postnatale Veränderungen findet man auch an der neuromuskulären Endplatte der Extrafusalfasern. Im Gegensatz zu diesen Synapsen bleibt in den Intrafusalfasern die Expression der γ -Untereinheit im zentralen Bereich der Nervenfasern neben der Expression der ϵ -Untereinheit während der postnatalen Entwicklung erhalten. Diese fehlende gamma-zu-epsilon-Umschaltung wurde mit Hilfe von transgenen Mäusen bestätigt, bei denen die AChR γ -Untereinheiten mittels GFP genetisch markiert waren. Diese Ergebnisse zeigen, dass AChR γ -Untereinheiten in adulten intrafusalen Fasern dort konzentriert sind, wo sie Kontakt zu sensorischen Nervenendigungen haben.

Agrin und der Agrin Rezeptor-Komplex - bestehend aus MuSK und LRP4 (LDL Rezeptor-beziehend Protein) - konnten in Muskelspindeln im Bereich der sensorischen und motorischen Innervation nachgewiesen werden. Außerdem sind Agrin und sein Rezeptor-Komplex in propriozeptiven Neuronen der Spinalganglien exprimiert, während nur Agrin und LRP4 in γ -Motoneuronen im Rückenmark zu finden sind. In Agrin knock-out Mäusen ist keine AChR Aggregation in der Polarregion zu finden, was zu Defekten in der Ausbildung der gamma- Motoeuronen Endplatten führt. Im Gegensatz dazu sind die AChR Aggregate im zentralen Teil der intrafusalen Fasern nicht betroffen. Muskelspezifische Überexpression von Mini-Agrin reicht aus, um die Bildung von synaptischen Spezialisierungen in den Endplatten von γ -Motoneuronen wiederherzustellen.

Diese Ergebnisse zeigen eine ungewöhnliche AChR Reifung an den annulospiralen sensorischen Endigungen und bestätigen, dass Agrin, ein essenzieller Faktor für die Bildung der Endplatten von γ -Motoneuronen ist, während er nicht notwendig für die Aggregation von AChRs in der zentralen Region von intrafusalen Fasern zu sein scheint.

Abstract

Muscle spindles are complex stretch-sensitive mechanoreceptors that consist of 4-12 specialized muscle fibers. These intrafusal muscle fibers are innervated in the central (equatorial) region by an afferent sensory axon and in both peripheral (polar) regions by efferent γ -motoneurons. Until now little is known about muscle spindle development at the molecular level, especially about the development of cholinergic specializations. My study shows that nicotinic acetylcholine receptors (AChR) are concentrated at the γ -motoneuron endplate as well as in the equatorial region. Moreover, enzymes required for the synthesis and removal of acetylcholine, including choline acetyltransferase (ChAT) and acetylcholinesterase (AChE), as well as vesicular acetylcholine transporter (VACHT) and the AChR-associated protein rapsyn are all concentrated at the polar γ -motoneuron endplate and (with the exception of AChE) also at the equatorial region. Finally, the presynaptic protein bassoon, involved in synaptic vesicle exocytosis, is also present at the γ -motoneuron endplate and at the annulospiral sensory nerve ending.

During postnatal development, the AChR subunit composition at the γ -motoneuron endplate changes from the γ -subunit containing fetal AChR to the ϵ -subunit containing adult AChR. This is similar to the postnatal change at the neuromuscular junction. In the equatorial region the ϵ -subunit expression starts around postnatal week two; however the γ -subunit persists in the central region despite the onset of the ϵ -subunit expression. Therefore, the γ - and ϵ -subunits are simultaneously present in the equatorial region. This result was confirmed using a mouse line in which the AChR γ -subunit was genetically labelled by green fluorescence protein (GFP). In this mouse, the GFP-labelled AChR γ -subunits are concentrated at the contact site of the intrafusal fiber with the sensory nerve ending. This result indicates different AChR maturation occurs within two areas of the same intrafusal fiber.

I also show that agrin and the agrin receptor complex (consisting of LRP4 and MuSK) are present in muscle spindles in the region of the sensory and motor innervation. Moreover, agrin, MuSK, and LRP4 are expressed by proprioceptive neurons in dorsal root ganglia but only agrin and LRP4 were detected in the cell body of γ -motoneurons in the spinal cord. In mice with a targeted deletion of agrin, AChR aggregates are absent from the polar region and γ -motoneuron endplates do not form. By contrast, AChR aggregates remain detectable in the central part of intrafusal fibers. Moreover, muscle-specific re-expression of mini-agrin is sufficient to restore the formation of synaptic specializations at γ -motoneuron endplates. These results show an unusual AChR maturation at the annulospiral endings and confirm that agrin is a major determinant for the formation of γ -motoneuron endplates. Agrin on the other hand appears dispensable for the aggregation of AChRs in the central region of intrafusal fibers.