



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Molecular dissection of the dysferlin protein complex in skeletal muscle

Huang, Y.

Citation

Huang, Y. (2006, September 26). *Molecular dissection of the dysferlin protein complex in skeletal muscle*. Gildeprint Drukkerijen, Enschede. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4573>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/4573>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Samenvatting

Mutaties in dysferline veroorzaken een spectrum van klinisch verschillende spierziekten, gezamenlijk bekend onder de term dysferlinopathiën. Deze groep spierdystofiën bestaat uit de proximale limb-girdle spierdystrofie 2B (LGMD 2B), en twee vormen van distale myopathie: Miyoshi myopathie (MM) en “distale myopathie met distal anterior involvement” (DMAT). Er is geen verband tussen de aard en locatie van de mutatie in het dysferline gen en de klinische presentatie. Dit suggereert dat andere factoren betrokken zijn bij de klinische variabiliteit. Mogelijk zijn dit eiwitten die direct of indirect binden aan dysferline.

Na de identificatie van dysferline in 1998, zijn enkele van deze potentiële factoren, te weten caveoline-3, annexines en CAPN3, geïdentificeerd op basis van hun directe interactie met dysferline of hun secundaire reductie in spieren van patiënten met een dysferlinopathie. De studie beschreven in dit proefschrift richt zich op de identificatie van additionele eiwitten in het dysferline complex teneinde een beter begrip te krijgen van de functie van dysferline.

Om de pathogenese van de dysferlinopathiën beter te begrijpen hebben wij ons als eerste gericht op het ontwikkelen van betere antilichaamreagentia voor dysferline. Gebruikmakend van een phage display bank van nonimmuun lama-afgeleide zware keten antilichaamfragmenten (VHH) hebben wij met behulp van twee dysferline fragmenten fagen geselecteerd die VHHs presenteerden specifiek voor het antigen. De geselecteerde VHHs herkennen twee verschillende domeinen in dysferline en zijn toepasbaar in Western blot, immunofluorescente microscopie en immunoprecipitatie experimenten. Gebruikmakend van deze VHH konden we middels co-immunoprecipitatie aantonen dat CAPN3 een complex vormt met dysferline, hetgeen al gesuggereerd was op basis van de secundaire reductie van CAPN3 in patiënten met een dysferlinopathie.

Door middel van co-immunoprecipitatie gevolgd door massa spectroscopie identificeerden wij AHNAK als potentiële nieuwe partner voor dysferline. GST-pulldown experimenten toonden vervolgens aan dat het C2A domein van dysferline bindt aan het carboxyterminale domein van AHNAK. Voor beide eiwitten zijn zeer homologe eiwitten geïdentificeerd in de mens en de muis: myoferline toont grote gelijkheid met dysferline en AHNAK2 heeft hoge homologie met AHNAK. Vervolgexperimenten toonden dan ook aan dat het C2A domein van myoferline ook kan binden aan AHNAK terwijl AHNAK2 ook kan binden aan dysferline. In de skeletspier colocaliseren dysferline en AHNAK in het sarcolemma en in patiënten met een dysferlinopathie namen wij een secundaire reductie waar van AHNAK proportioneel aan de reductie van dysferline. Bovendien laten dysferline en AHNAK een duidelijke toename en

een meer cytoplasmatische localisatie zien in regenererende rattenspier, wat in overeenstemming is met een interactie tussen beiden. De data suggereren dat dysferline AHNAK recruteert en stabiliseert aan het sarcolemma en dat AHNAK een rol speelt in het dysferline membraanherstelproces (hoofdstuk 3). Mutaties in de spierspecifieke non-lysosomale cysteine protease CAPN3 veroorzaken een andere vorm van limb-girdle spierdystrofie (LGMD 2A). Eerdere studies hebben aangetoond dat CAPN3 betrokken is bij de proteolyse van eiwitten die deel uitmaken van het cytoskelet of binden aan actine. Het carboxyterminale uiteinde van AHNAK bindt ook aan G-actine bindt en co-sedimenteert met F-actine en dat AHNAK wordt gedigesteert door een onbekende protease. Dit suggereert dat AHNAK een rol speelt in de functionele organisatie, integriteit en onderhoud van het subsarcolemmale cytoskelet. Vanwege de overlappende eigenschappen van AHNAK en CAPN3 postuleerden wij dat AHNAK een substraat is voor CAPN3. Om dit aan te tonen, stelden we eerst vast dat CAPN3 kan binden aan AHNAK met behulp van GST-pulldown proeven. Vervolgens toonden we aan dat endogeen AHNAK kan worden gedigesteerd door CAPN3 in celkweek en dat constitutief inactief CAPN3 dit niet kan. Tenslotte identificeerden we met behulp van co-expressie studies specifieke domeinen in AHNAK die worden gedigesteerd door CAPN3. Een biologische consequentie van AHNAK proteolyse door CAPN3 was de afwezigheid van AHNAK in cellen die actief wt CAPN3 tot expressie brengen. De opregulatie van AHNAK in het sarcolemma van CAPN3patiënten bevestigt dat CAPN3 de expressie van intact AHNAK reguleert. Bovendien constateerden wij dat na CAPN3 proteolyse, de verschillende AHNAK fragmenten niet meer in staat waren aan dysferline of myoferline te binden, wat suggereert dat CAPN3 zorgt voor de remodelering van cytoskelet-sarcolemma interacties gedurende regeneratie en membraanherstel in skeletspier (hoofdstuk 4).

Concluderend hebben wij aangetoond dat het mogelijk is om uit een phage-display bank van nonimmuun VHH fragmenten functionele VHHs te selecteren voor biomedisch onderzoek. De geselecteerde VHHs waren instrumenteel voor de identificatie van twee nieuwe eiwitten in het dysferline complex: AHNAK en CAPN3. De biologische significantie van deze bevinding werd bevestigd door aan te tonen dat AHNAK een substraat is voor CAPN3 en dat CAPN3 de expressie van intact AHNAK reguleert. Gezien de veelheid van processen met betrekking tot cytoarchitectuur, membraan integriteit en membraanopbouw waarmee AHNAK in verband wordt gebracht, zal deze bevinding ongetwijfeld leiden tot nieuwe inzichten in de functie van het dysferline complex in de skeletspier.