

DISS. ETH NO.23320.....

THE AXON INITIAL SEGMENT DIFFUSION BARRIER AT THE NANOSCOPIC LEVEL

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

presented by
DAVID ALBRECHT

M. Sc. ETH Zurich

born on 24.11.1985

citizen of
GERMANY

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Vikram Panse
Prof. Dr. Helge Ewers
Prof. Dr. Jean-Marc Fritschy
Prof. Dr. Matthias Peter

2016

Abstract

Polarization is a crucial step in neuronal development and the distinct axonal and somatodendritic domains are conserved over the lifetime of an organism once established. The boundary between the domains is the axon initial segment, a macromolecular structure based on a periodically organized cytoskeletal scaffold that concentrates ion channels essential for action-potential generation. Evidence suggests that the establishment of a diffusion barrier to the lateral exchange of molecules in the axon initial segment plasma membrane correlates with the enrichment of ion channels and cell adhesion molecules tethered to the cytoskeleton by the adapter protein ankyrin G. Allegedly, these immobilized obstacles together with the cortical cytoskeleton restrict diffusion of all other membrane components at the axon initial segment. However, a specific physical mechanism for the diffusion barrier at the axon initial segment remains to be established.

Here we perform repeated high-throughput single molecule tracking on individual live rat primary hippocampal neurons during axon initial segment development. We correlate the lateral motion of membrane molecules to the organization of the axon initial segment cytoskeleton. Furthermore, we analyze the lateral mobility of lipid-anchored and transmembrane molecules with microsecond tracking at a resolution of only a few nanometers via interferometric scattering (iSCAT). Finally, we test the permeability of the diffusion barrier by fluorescence recovery after photobleaching in the proximal axon.

We find that the lateral motion of membrane molecules becomes reduced in the axon initial segment during development and that this reduction correlates with the cytoskeletal organization. The motion of membrane molecules is restricted locally, revealing a repetitive pattern of segments spaced ~190 nm along the axonal axis that correlates with a periodically organized cytoskeleton. We find that the diffusion barrier is not impermeable and that an exchange of membrane material takes place despite the local reduction in lateral mobility of single molecules. Our data provide a novel mechanistic insight into the nature of the diffusion barrier at the axon initial segment. We achieve a direct correlation between the motion of individual lipid-anchored molecules and cytoskeletal barriers. Our data provides strong evidence that the submembrane cytoskeleton can compartmentalize the plasma membrane including the exoplasmic leaflet.

Zusammenfassung

Polarisierung ist ein entscheidender Schritt in der neuronalen Entwicklung und die diskreten axonalen und somatodendritischen Domänen von Neuronen bleiben das ganze Leben eines Organismus über erhalten. Die Grenze zwischen diesen Domänen bildet das axonale Initialsegment. Diese makromolekulare Struktur, die auf einem periodisch organisierten Cytoskelett aufbaut, reichert die für die Erzeugung von Aktionspotentialen erforderlichen Ionenkanäle an. Es gibt Hinweise darauf, dass die Entstehung einer Diffusionsbarriere am Initialsegment mit der Anreicherung von Zelladhäsionsmolekülen und Ionenkanälen, welche durch das Adapterprotein Ankyrin G am Cytoskelett verankert werden, korreliert. Zusammen mit dem kortikalen Cytoskelett beschränken diese immobilisierten Hürden mutmasslich die Diffusion aller anderen Membranbestandteile am Initialsegment. Allerdings ist der Mechanismus dieser potentiellen Membrandiffusionsbarriere bisher nicht eindeutig belegt.

In dieser Arbeit führen wir Hochdurchsatz-einzelmolekülverfolgung (high-throughput single molecule tracking) am Initialsegment von primären hippocampalen Rattenneuronen durch. Wir korrelieren die laterale Bewegung von Membranmolekülen mit der Struktur des Cytoskeletts am Initialsegment. Ausserdem analysieren wir die laterale Mobilität von Lipid-verankerten Molekülen und Transmembranmolekülen mithilfe von interferometrischer Streuungsmikroskopie (iSCAT) mit Messzeiten im Mikrosekundenbereich und einer Auflösung von wenigen Nanometern. Schliesslich testen wir die Durchlässigkeit der Diffusionsbarriere mithilfe von fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) am proximalen Axon.

Wir stellen fest, dass die laterale Bewegung von Molekülen durch die Membran am Initialsegment im Laufe der neuronalen Entwicklung abnimmt. Diese Abnahme korreliert mit dem Aufbau des Cytoskeletts. Die Bewegung von Membranmolekülen ist lokal eingeschränkt und weist ein sich wiederholendes Muster mit Abständen von ~190 nm entlang der Achse des Axons auf, welches mit dem periodisch strukturierten Cytoskelett korreliert. Wir stellen ausserdem fest, dass die Diffusionsbarriere nicht vollständig undurchlässig ist, und dass ein Austausch von Membranmaterial trotz einer lokalen Abnahme der Mobilität von Einzelmolekülen stattfindet. Unsere Daten ermöglichen einen neuen mechanistischen Einblick in die Eigenschaften der Diffusionsbarriere am Initialsegment. Ferner gelingt uns die direkte Korrelation der Bewegung einzelner Lipid-verankerter Moleküle mit Barrieren im Cytoskelett. Diese Befunde sind ein starkes Indiz, dass das kortikale Cytoskelett die Plasmamembran inklusive der äusseren Lipidschicht kompartimentiert.