

Varun Venkataramani

Dr. med.

Darstellung präsynaptischer F-Aktin-Anordnung durch höchst aufgelöste 3D-Licht- und Elektronenmikroskopie

Fach/Einrichtung: Anatomie und Zellbiologie

Doktorvater: Professor Dr. med. Thomas Kuner

In der vorliegenden Arbeit soll die Rolle von F-Aktin in der Präsynapse mit Hilfe neuartiger Mikroskopiemethoden charakterisiert werden. Die Calyx von Held wurde hier als Modellsynapse verwendet, da sie funktionell und ultrastrukturell sehr gut charakterisiert ist. Wie genau das Aktin in der Präsynapse angeordnet ist, wurde jedoch bisher nur unzureichend beleuchtet. In diesem Projekt wurden neuartige Mikroskopiemethoden für die Visualisierung des zytoskeletalen Netzwerks in der Calyx von Held etabliert und angewendet. Methoden auf der Basis von 3D-spectral demixing dSTORM, Immunogold-Rasterelektronenmikroskopie sowie Immunogold-Elektronentomographie wurden benutzt um das gesamte präsynaptische, filamentöse Netzwerk zu visualisieren.

dSTORM-Mikroskopie wurde verwendet um zu zeigen, dass das filamentöse Aktin um und im Vesikelcluster angeordnet ist. Das filamentöse Aktin im Vesikelcluster ist lediglich als Punktwolke dargestellt, die nicht einzelnen Filamenten zugeordnet werden können. Deswegen wurde eine neuartige Elektronenmikroskopie-Methode angewendet, die resin-free electron microscopy benannt wurde. Diese ist in der Lage cytoskeletale Elemente in der Präsynapse deutlich darzustellen. Die resin-free electron microscopy-Methode zeigte eine intakte synaptische Ultrastruktur, die vergleichbar war zu vorher publizierten Ergebnissen. Desweiteren konnten Konnektorenfilamente, Ankerfilamente, Filamente, die lediglich mit anderen Filamenten verbunden waren sowie Filamente, die Mitochondrien vernetzen, mit der 2D-resin-free-Rasterelektronenmikroskopie dargestellt werden. Ein Teil dieser Filamente konnte mit Hilfe von Immunogoldfärbungen als Aktinfilamente klar identifiziert werden.

Auf ground-truth Modellen basierende Simulationen sollen im Anschluss die Interpretation der gewonnenen Daten vereinfachen und die Grenzen der Mikroskopiemethoden verdeutlichen. Um ein besseres Verständnis über die dreidimensionale Anordnung von den Aktinfilamenten in der Calyx von Held zu bekommen, wurden Immunogoldfärbungen kombiniert mit Elektronentomographie. Die F-Aktin-Segmentation zeigte, dass es zum

größten Teil um kurze Filamente handelt mit einer medianen Länge von 24 nm, die sich durch die Zytomatrix der aktiven Zonen zieht. Ein Simulationsalgorithmus basierend auf ground truth-Modellen wurde entwickelt, der die Ergebnisse der verschiedenen Mikroskopiemethoden zusammenbringt. Es wurde gezeigt, dass F-Aktin und synaptische Vesikel auch unter den günstigsten Bedingungen mit Hilfe von dSTORM-Mikroskopie nicht aufgelöst werden kann. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass dies ein Problem der räumlichen Anordnung von F-Aktin ist, wie es auch in der subkortikalen Membran von Erythrozyten vorliegt. Ebenfalls wird in dieser Arbeit gezeigt, wie der Simulationsalgorithmus hilft, neue experimentelle Strategien zu entwickeln. Dies wird in dieser Arbeit anhand des Beispiels der Auflösung von einzelnen synaptischen Vesikeln mittels von dSTORM-Mikroskopie gezeigt. Insgesamt wird demonstriert, wie der Simulationsalgorithmus bei der Interpretation der Daten helfen kann, welche Grenzen dSTORM-Mikroskopie mit sich bringt und wie es helfen kann, Hypothesen zu überprüfen und neue experimentelle Strategien zu entwickeln. Im letzten Teil dieser Arbeit wird ein neuer kombinierter Labeling- und Imaging-Ansatz präsentiert, der die Label-Dichte erhöht und es ermöglicht, ein größeres dreidimensionales Volumen mittels dSTORM-Mikroskopie aufzunehmen. Damit wird die Grundlage für die Entwicklung besserer Markierungsverfahren gelegt die helfen können, die Anordnung von F-Aktin im Vesikelcluster noch besser zu verstehen.