

Alp Paksoy

Dr. med

Effects of the clathrin inhibitor Pitstop-2 and dynamin inhibitor Dynasore on synaptic vesicle recycling at a central synapse *in vivo*

Fach/Einrichtung: Anatomie

Doktorvater: Prof. Dr. med. Thomas Kuner

Bis heute wurden vier Mechanismen der präsynaptischen Endozytose und dem damit verbundenen Recycling synaptischer Vesikel beschrieben. Trotzdem ist immer noch unklar, welche dieser Mechanismen unter physiologischen Bedingungen *in vivo* aktiv sind und welchen Anteil sie jeweils an der Endozytose und dem Vesikelrecycling haben. Die Abschnürung der aufzunehmenden endozytotischen Kompartimente von der präsynaptischen Membran wird durch Dynamin katalysiert. Dieses besitzt demnach sowohl bei der aktivitätsabhängigen Aufnahme großer Membranmengen (*bulk endocytosis*) als auch bei der Clathrin-vermittelten und der ultraschnellen Endozytose eine herausragende Rolle. Dahingegen bildet das Mantelprotein Clathrin ein strukturelles Gerüst das die Form, Größe und zu einem gewissen Grad die molekulare Zusammensetzung synaptischer Vesikel während der Regeneration bestimmt. Dies geschieht entweder direkt an der Plasmamembran (Clathrin-vermittelte Endozytose) oder an Endosomen. Das Ziel dieser Studie war die funktionelle Charakterisierung von Clathrin und Dynamin unter physiologischen Bedingungen. Hierzu wurde die Held'sche Calyx, eine für hochfrequente synaptische Transmission optimierte Synapse im auditorischen Hirnstamm, als Modellsynapse benutzt. Dazu wurden Pitstop-2 (Clathrin-Inhibitor) und Dynasore (Dynamin-Inhibitor) jeweils in Kombination mit dem Endozytosemarker Meerrettichperoxidase in den medialen Nucleus des Trapezkörpers anästhesierter Ratten injiziert. Anschließend wurden die Ratten für 30 min Umgebungsgeräuschen (Klimaanlage, Radio, Gespräche) ausgesetzt, um die Held'sche Calyx physiologisch zu stimulieren. Die Wirkungen der Inhibitoren auf das Recycling synaptischer Vesikel in der Held'schen Calyx wurde durch Untersuchung der mit Meerrettichperoxidase gefüllten präsynaptischen, vor Kurzem endozytierten Strukturen (Endosome und synaptische Vesikel) untersucht. Mit Hilfe der hochauflösenden Rasterelektronenmikroskopie wurden Bildserien generiert, die für die dreidimensionale Rekonstruktion von Synapsensegmenten und den darin enthaltenen, endozytierten Strukturen genutzt wurden. Da die Held'sche Calyx während ihrer Reifung große strukturelle und funktionelle Veränderungen erfährt, wurde die

Funktion von Clathrin und Dynamin sowohl in juvenilen, tauben als auch in älteren, hörenden Ratten untersucht. Die Ergebnisse der Inhibitorapplikationen wurden mit zwei voneinander unabhängigen Kontrollgruppen verglichen. Um den nativen Zustand zu untersuchen wurde lediglich Meerrettichperoxidase injiziert. In der zweiten Kontrollgruppe wurde der Meerrettichperoxidase 1% Dimethylsulfoxid zugesetzt, welches zum Lösen von Pitstop-2 und Dynasore verwendet wurde. Die Versuchsauswertung erfolgte hinsichtlich des Einflusses der verwendeten Inhibitoren auf die Dichte der endozytierten Strukturen, deren Volumen und ihrer relativen Position innerhalb der Synapse.

In dieser Studie wurden einige signifikante Unterschiede nach Injektion der Inhibitoren, vor allem Pitstop-2, beobachtet. Pitstop-2 führte in älteren, hörenden Tieren zu einer Verlagerung sowohl der großen Endosome als auch der vor Kurzem recycelten synaptischen Vesikel in Richtung der präsynaptischen Membran. Bei juvenilen, tauben Ratten wurde diese Abweichung nur für die großen Endosome beobachtet. Dieser altersabhängige Unterschied in der Wirkung von Pitstop-2 könnte mit einem altersbedingten Anstieg des Anteils Clathrin-abhängiger Mechanismen beim Recycling synaptischer Vesikel zusammenhängen. Dies könnte auch den Volumenanstieg der großen Endosome in älteren, hörenden Ratten erklären, da durch Pitstop-2 auch Clathrin-abhängige endosomale Abknospungsprozesse synaptischer Vesikel inhibiert würden. Die geringere Wirkung von Pitstop-2 auf die Lokalisation endozytierter Strukturen in juvenilen Calyces weist darauf hin, dass das Recycling synaptischer Vesikel vor Beginn des Hörens vermehrt durch Clathrin-unabhängige Mechanismen getragen wird. Außerdem vermindert Pitstop-2 die Dichte der vor Kurzem recycelten synaptischen Vesikel nur in den Calyces älterer, hörender Tiere. Dies unterstreicht die große Bedeutung des Clathrins bei der Regeneration synaptischer Vesikel unter Bedingungen der hochfrequenten Neurotransmission während des Hörvorgangs. Eine Reduktion der Dichte endozytierter Kompartimente konnte in den Calyces juveniler, tauber Ratten nicht beobachtet werden. Ein möglicher Grund hierfür ist das Überwiegen Clathrin-unabhängiger Mechanismen der Vesikelregeneration. Die Untersuchung der Wirkung von Dynasore auf das Vesikelrecycling- zeigte nur einen signifikanten Effekt. In den Calyces hörender Tiere führte der Dynamin-Inhibitor zu einer Verlagerung der großen Endosome in Richtung der präsynaptischen Membran. Diese geringfügige Veränderung stellt die pharmakologische Wirksamkeit von Dynasore *in vivo* in Frage.