

Mechanisms of assembly and activity-dependent remodelling of the presynaptic cytomatrix at the active zone

von: Diplom Molekularbiologin und Physiologin Vesna Lazarevic

Summary

The release of neurotransmitters is restricted to the specialized region of the presynaptic nerve terminal called the active zone (AZ). At the ultra-structural level, the AZ is characterized as an electron-dense region beneath the presynaptic plasma membrane composed of a meshwork of cytoskeleton and associated proteins, so called, cytomatrix of the AZ (CAZ). To date several CAZ-specific proteins have been characterized: RIMs, Munc13s, ELKS/CAST/ERCs, Bassoon (Bsn) and Piccolo/Aczonin (Pclo).

The first aim of my doctoral thesis was to investigate whether the loss of functional Bassoon and Piccolo may influence assembly, maturation and/or morphological organization of synapses. Since animals double-mutant for both proteins are not viable, we performed an ultra-structural characterization of synapses in primary cultured hippocampal neurons from *Bsn-Pclo* double mutant mice. We could show that synapses are formed in these double-mutant cultures. Comparing the features of the major presynaptic parameters (AZ length, number of synaptic vesicles (SVs), number of docked SVs) between wild-type and *Bsn-Pclo*-double mutant animals, we found that, although two major AZ scaffolding proteins are missing, there is no major difference in the ultra-structure of the presynaptic bouton between these two groups of animals.

As Piccolo and Bassoon are transported to the presynaptic site on specific membrane carriers, the so-called Piccolo-Bassoon transport vesicles (PTVs), we assessed the existence of these 80-nm dense-core organelles in double-mutant cultures. The number of 80-nm dense-core vesicles was found to be significantly reduced suggesting that these AZ precursor vesicles are missing in the absence of Piccolo and Bassoon. Interestingly, the thickness of postsynaptic density (PSD) was significantly reduced. These data suggest that Bassoon and Piccolo are not necessary for synapse formation and assembly, but they have significant role in synapse maturation.

As synapses are complex and highly dynamic structures that are constantly remodelled during development as well as during learning and memory processes, the second aim of my PhD thesis was to investigate whether synaptic activity may alter the molecular composition of the AZ and, if yes, what might be possible molecular mechanisms underlying these activity-dependent changes.

Our experiments revealed that prolonged inhibition of excitatory synaptic transmission (e.g. by blocking ionotropic glutamate receptors) significantly decreases the expression levels of the most CAZ-associated proteins and some of postsynaptic scaffolds, but the expression of SV and SNARE-family proteins was not affected. Also, activity deprivation did not influence the overall number of synapses. Changes in the molecular content of the AZ are reversible within 48 hrs after removal of activity suppressing drugs underpinning the physiological relevance of the observed phenomena. With respect to the mechanisms that governing the activity-dependent remodeling of synapses, we found that inhibition of proteasome-function prevented activity induced decrease of CAZ proteins. This suggests that the ubiquitin-proteasome system might control activity-dependent protein turnover and global compositional changes in the presynaptic AZ. Taken together, our data revealed an unexpected dramatic regulation of CAZ proteins during synaptic plasticity.

Zusammenfassung

Die Freisetzung von Neurotransmittern ist auf eine spezialisierte Region der präsynaptischen Nervenendigung beschränkt, die als aktive Zone bezeichnet wird. Auf ultrastruktureller Ebene wird die aktive Zone durch eine elektronendichte Struktur charakterisiert, die direkt an die präsynaptische Plasmamembran angelagert ist. Sie besteht aus einem Geflecht von cytoskelettalen und damit assoziierten Proteinen, die die so genannte Cytomatrix der aktiven Zone (CAZ) bilden. Bislang sind einige wenige CAZ-spezifische Proteine identifiziert worden. Zu ihnen gehören Mitglieder der Proteinfamilie der RIMs, Munc13, ELKS/CAST/ERCs sowie die Proteine Bassoon (Bsn) und Piccolo/Aczonin (Pclo).

Das erste Ziel meiner Dissertation befasste sich mit der Frage, ob der Verlust von funktionellem Bassoon und Piccolo den Zusammenbau, die Reifung und/oder die morphologische Organisation von Synapsen beeinflussen kann. Da Tiere, bei denen beide Proteine mutiert sind, rasch nach der Geburt sterben, wurde eine ultrastrukturelle Charakterisierung von *Bsn-Pclo*-defizienten Synapsen an hippocampalen Primärkulturen von doppelmutanten Mäusen vorgenommen. Wir konnten zeigen, dass Synapsen in solchen Kulturen gebildet werden. Der Vergleich der präsynaptischen Hauptparameter (Länge der aktiven Zone, Anzahl von synaptischen Vesikeln, Anzahl der gedockten synaptischen Vesikel) zwischen wildtypischen und *Bsn-Pclo*-doppelmutanten Tieren ergab keinen auffälligen Unterschied in der Ultrastruktur der präsynaptischen Endigungen beider Tiergruppen, obgleich zwei Hauptgrundgerüstproteine der aktiven Zone fehlen.

Da Piccolo und Bassoon zu den präsynaptischen Endigungen auf für sie spezifische membranbasierte Transportorganellen, den so genannten Piccolo-Bassoon-Transportvesikeln (PTVs), transportiert werden, wurde der Frage nachgegangen, ob diese 80 nm großen Vesikel mit elektronendichter Füllung (*dense core*-Vesikel) in Doppelmutanten noch existieren. Es stellte sich heraus, dass die Menge an diesen *dense core*-Vesikeln signifikant reduziert ist, was auf einen Verlust dieser Vesikel in Abwesenheit von Piccolo und Bassoon hindeutet. Interessanterweise war die Dicke der postsynaptischen Dichte (PSD), ein elektronendichtes Proteinnetzwerk in der postsynaptischen Endigung, signifikant reduziert. Zusammengefasst lassen diese Daten darauf schließen, dass Bassoon und Piccolo zwar nicht notwendig für die Bildung von Synapsen sind, beide Proteine aber eine signifikante Rolle bei der Reifung von Synapsen besitzen.

Synapsen sind komplexe und hochdynamische Strukturen, die sowohl während der Entwicklung als auch im Verlauf von Lern- und Gedächtnisvorgängen ständig Prozessen der Ummodellierung unterliegen. Das zweite Ziel meiner Arbeit ging daher der Frage nach, inwieweit synaptische Aktivität die molekulare Komposition der aktiven Zone verändert und, wenn ja, welche molekularen Prozesse diesen aktivitätsabhängigen Änderungen zu Grunde liegen.

Unsere Ergebnisse zeigten, dass eine andauernde Inhibition der exzitatorischen Transmission (z.B. durch Blockierung von ionotropen Glutamat-Rezeptoren) zu einer signifikanten Reduktion der Expressionrate der meisten CAZ-assoziierten Proteine führt. Die Expression einiger postsynaptischer Gerüstproteine war ebenfalls reduziert, wohingegen die Expression von synaptischen Vesikel-Proteinen und von Mitgliedern der SNARE-Proteinfamilie unverändert blieb. Ebenso hatte die Stilllegung der Aktivität keinen Einfluss auf die Gesamtzahl an Synapsen. Die Änderungen in der molekularen Zusammensetzung der aktiven Zone waren innerhalb von 48 Stunden nach der Beendigung der aktivitätsblockierenden

Behandlung reversibel, was auf eine physiologische Relevanz dieses Phänomens hindeutet. Im Hinblick auf die Mechanismen, die diesen aktivitätsabhängigen Umbau von Synapsen steuern, konnten wir zeigen, dass eine Inhibition der Proteasomen-Funktion eine aktivitätsinduzierte Abnahme an CAZ-Proteinen verhindert. Dies deutet darauf hin, dass das Ubiquitin-Proteasom-System den aktivitätsabhängigen Protein-Umsatz sowie globale Änderungen in der molekularen Zusammensetzung der aktiven Zone kontrollieren könnte. Zusammenfassend weisen unsere Daten auf eine unerwartet starke Regulation von CAZ-Proteinen während synaptischer Plastizität hin.