

Abstract

The PACSINs act as linking adaptor proteins in clathrin-mediated endocytosis and vesicle trafficking. Via their carboxyterminal SH3-domain they bind to the endocytic protein dynamin as well as to the main regulator of the actin cytoskeleton N-WASP. Via their aminoterminal F-BAR-domain PACSINs oligomerise and are associated with membranes containing distinct lipids. Furthermore, PACSINs interact with several receptors or transmembrane molecules and thereby regulate their intracellular or plasma membrane localisations. Since previous results have been obtained under non-physiological conditions, the aim of this thesis was to inactivate the endogenously expressed proteins PACSIN1 and PACSIN2 by knock-out experiments and RNAi mediated protein depletion in order to shed light on the function of PACSIN proteins. Unlike the unsuccessful targeting of the PACSIN1 gene due to the putative unapproachability of the locus, the conditional targeting of the PACSIN2 gene was successful and yielded several homologous recombined ES-cells. Meanwhile, heterocygous mice could be generated after breeding chimeras with the wt-mouseline. The potential binding of PACSIN2 to the main components of the centrioles in centromeres and of microtubule nucleation centers , α - and γ -tubulin, prompted us to examine the centrosomal structure and microtubule nucleation in detail. After siRNA-mediated PACSIN2 depletion no altered centrosomal cohesion could be observed as has previously been shown for the main PACSIN2 binding partner dynamin. However, a significant delay in microtubule nucleation could be observed after suppression of PACSIN2 mediated by shRNA. This result implicates a centrosomal function of PACSIN2. Analyses PACSIN2 function in clathrin-mediated endocytosis after PACSIN2 suppression showed no change in transferrin receptor uptake in contrast to the observed block in endocytosis after overexpression. In pulse-chase experiments a dose dependent retardation of transferrin receptor recycling from the recycling endosome could be observed.

Zusammenfassung

Die PACSINE agieren als verbindende Adapterproteine in der Clathrin-vermittelten Endocytose und beim Vesikeltransports. Über ihre carboxyterminale SH3-Domäne binden sie an das endozytotische Protein Dynamin und an N-WASP, einem Regulator des Actinzytoskeletts. Über ihre aminoternale F-BAR-Domäne oligomerisieren PACSINE und assoziieren mit Membranen spezifischer Lipidzusammensetzung. Ferner interagieren PACSIN Proteine mit einer Reihe spezifischer Rezeptoren bzw. Transmembranmolekülen, deren intrazelluläre und Plasmamembran Lokalisation sie regulieren. Bisherige Ergebnisse werden vornehmlich unter nicht-physiologischen Bedingungen gewonnen, daher sollte im Rahmen dieser Arbeit eine Inaktivierung der endogen exprimierten Proteine PACSIN1 und PACSIN2 durch *knock-out*-Experimente oder über RNAi-vermittelte Expressionsverminderung Aufschluss über die Funktion der PACSINE geben. Im Gegensatz zum PACSIN1-Gen, das wegen putativer Unzugänglichkeit des Locus nicht gezielt ausgeschaltet werden konnte, wurden beim konditionellen *targeting* des PACSIN2-Gens erfolgreich homolog rekombinierte ES-Zell-Klone gefunden. Mittlerweile sind heterozygote Nachkommen nach Kreuzung der Chimären mit der *wt*-Mauslinie erzeugt worden. Die potentielle Bindung von PACSIN2 an γ -Tubulin und α -Tubulin, den Hauptkomponenten der Centriolen im Centromer und der Mikrotubulibildung, gaben Anlass zu Untersuchungen der Centrosomenstruktur und der Ausbildung von Mikrotubuli. Nach siRNA-vermittelter PACSIN2-Depletion, konnte der bei dem Hauptbindungspartner Dynamin entdeckte Effekt einer veränderten Centrosomenkohäsion nicht beobachtet werden. Dahingegen war nach verminderter PACSIN2-Expression ein signifikanter Unterschied im Mikrotubuliwachstum zu beobachten, was eine Funktion am Centrosom impliziert. Bei der Analyse der Funktion von PACSIN2 in der Clathrin-vermittelten Endozytose zeigte eine PACSIN2-Suppression keinen Einfluss auf die Endocytose des Transferrinrezeptors, die lange propagiert wurde. *pulse-chase* Versuche konnte allerdings eine dosisabhängige vorübergehende Retention des Transferrinrezeptors am Recycling Endosom zeigen.