

# Abstract

PACSIN proteins act as adaptor proteins in clathrin-mediated endocytosis and vesicle trafficking. Via their carboxyterminal SH3-domain they bind to the endocytic protein dynamin, to the main regulator protein of the actin cytoskeleton N-WASP and to the proline-rich-region of the Huntingtin protein. In Chorea Huntington's disease (HD) patient neurons a progressive loss of PACSIN 1 immunostaining in synaptic boutons beginning in presymptomatic and early stages of HD was shown. Thus and the observed differences in the binding behavior of PACSIN 1 to Huntingtin suggest its involvement in the abnormal receptor-recycling process in synaptic boutons of HD degenerating neurons, which leads to the damage of the neurons due to abnormal localisations of involved proteins. The aims of this thesis were the characterisation of the PACSIN-PICK1 interaction and the analysis of the PACSIN 1 involvement in the AMPA-receptor regulation in healthy and degenerating neurons. It was known that PACSIN 1 is involved in other receptor regulation processes. I could confirm the *in vivo* existence of a PACSIN/GluR-complex mediated via PICK1 in brain by co-immunoprecipitation. The N-terminal F-BAR domain is responsible for the PICK1 binding and the SH3- domain seems to promote the interaction. In PICK1 the BAR-domain is essential for PACSIN 1 binding, but also requires the presence of the PDZ domain or the acidic C-terminal region of the protein. The ability of all three PACSIN proteins and PICK1 to bind to phosphoinositide-enriched liposomes *in vitro* could be shown. In case of the PACSIN 1 the binding depends on an intact F-BAR-domain, which was confirmed by deletion mutants and a F-BAR- triplemutant. The existence of a PACSIN/PICK1/GluR complex could also be confirmed by the overlapping localisation of endogenous PACSIN 1 with PKC $\alpha$ , GluR and PICK1 in cell bodies and synaptic boutons of primary neurons. Co-localisations of these proteins in non synaptic microsomes and synaptic vesicle fractions of healthy mouse brain confirm the involvement of PACSIN 1 in AMPA receptor regulation processes. The analysis of this complex in an HD mouse model shows a reduced expression of the AMPAR subunits and PKC $\alpha$  at the synaptic plasma membrane of the transgenic mice. These proteins showed also a strong co-fractionation with PACSIN 1 in synaptic vesicle fractions and are reduced in the non-microsomal fraction. The expression analysis of the complex proteins in different HD mouse brain regions shows for PACSIN 1

together with PKC $\alpha$  and GluR subunits a significant reduction and an overlapping expression in the different brain regions. In case of the Huntington`s disease PC12 cell model only PKC $\alpha$  expression depends on huntingtin aggregate formation and is significantly reduced in those cells.

# Zusammenfassung

Die PACSIN Proteine fungieren als Adapterproteine in der Clathrin-abhängigen Endocytose sowie beim Vesikeltransport. Über die carboxyterminale SH3-Domäne binden sie an das endocytotische Protein Dynamin, an N-WASP, einem Regulatorprotein des Actincytoskeletts sowie an eine prolinreiche Region des Huntingtin Proteins. Für PACSIN 1 konnte in früheren Versuchen gezeigt werden, dass im Frühstadium der Chorea Huntington Erkrankung die *Bouton*-spezifische Lokalisation in frühen pathologischen Stadien völlig fehlt. Dieser Befund könnte zusammen mit der veränderten Interaktion von PACSIN 1 mit Huntingtin darauf deuten, dass es im Krankheitsfall den normalen Ablauf des Rezeptor-*Recyclings* in den *Boutons* stört und die Neurone somit geschädigt sind. Dieses kann durch eine anormale Lokalisation von Proteinen, die an dem *Recycling* von Glutamat-Rezeptoren beteiligt sind, in kranken Neuronen verursacht werden. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente dienten der Charakterisierung der PACSIN-PICK1 Interaktion sowie der Untersuchung einer Beteiligung der PACSINe an AMPA-Rezeptor-Regulationsprozessen in gesunden bzw. kranken Neuronen. Eine Beteiligung der PACSINe an anderen Rezeptoren war bereits bekannt. Ein Nachweis eines PACSIN/GluR-Komplexes über das PICK1 Protein konnte im Hirnextrakt mittels Co-Immunpräzipitation unter *in vivo* Bedingungen erbracht werden. Die PICK1 Bindungsstelle in PACSIN 1 wurde auf eine N-terminale Sequenz innerhalb der F-BAR Domäne eingegrenzt und für die C-terminale SH3 Domäne eine die PICK1-Bindung fördernde Eigenschaft identifiziert. In PICK1 ist die BAR-Domäne für die PACSIN Bindung essentiell, allerdings ist die Interaktion ausschließlich in Kombination mit der PDZ-Domäne oder mit dem C-terminalen sauren Teil möglich. Es konnte ebenso gezeigt werden, dass die PICK1 Deletionen die intrazelluläre Verteilung in NIH 3T3 Zellen stark beeinflussen und zu punktförmigen Aggregatbildungen neigen. Des Weiteren zeigten alle drei PACSIN Proteine wie auch PICK1 *in vitro* eine direkte Bindung an mit Phosphoinositiden-angereicherte Liposomen, wobei die Bindung durch Deletion der PACSIN 1 F-BAR Domäne verhindert bzw. im Falle der PACSIN 1 Triplemutante innerhalb der F-BAR Domäne vermindert wird. In gesunden primären Hippocampus Neuronen konnte eine eindeutige Überlappung von PACSIN 1 mit PICK1, PKC $\alpha$  und den GluR-Untereinheiten im Zellkörper sowie auch in den synaptischen *Boutons* gezeigt

werden. Die überlappende Lokalisation von PACSIN 1, PICK1 und den AMPA-Rezeptor-Untereinheiten in nicht synaptischen Mikrosomen und in synaptischen Vesikeln vom Maushirn bestätigt die Komplexbildung und somit die Beteiligung der PACSINe an AMPAR-Regulationsprozessen. Bei der Untersuchung dieses Komplexes im Chorea Huntington Mausmodell konnte eine Reduzierung der AMPA-Rezeptor-Untereinheiten und von PKC $\alpha$  an der synaptischen Plasmamembran der transgenen Mäuse gezeigt werden. Eine erhöhte Co-Fraktionierung dieser Proteine in den synaptischen Vesikeln sowie eine verminderte Expression in den nicht mikrosomalen Vesikeln war zusammen mit PACSIN 1 zu beobachten. Proteinexpressionsanalysen im Mausmodell von Chorea Huntington zeigten für das PACSIN 1 Protein in einzelnen Hirnregionen zusammen mit PKC $\alpha$  und AMPA-Rezeptor Untereinheiten eine Reduzierung sowie eine überlappende Expression der am Komplex beteiligten Proteine in den Hirnregionen. Im Chorea Huntington PC12-Zellmodell war nur im Falle von PKC $\alpha$  eine Expressionsverminderung in Abhängigkeit von mutierten Huntingtin Aggregaten zu sehen.