

**Assessing the role of Piccolo and Bassoon  
Zinc Finger domains  
on Synapse Vesicle Recycling and  
Maintenance**

**Der Fakultät für Naturwissenschaften  
der Otto-von Guericke-Universität Magdeburg  
zur Erlangung des akademischen Grades**

**Doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)**

**am: 03.03.2012**

**eingereichte Dissertation,  
vorgelegt von: Diplom Biologe Sergio Leal-Ortiz**

**Summary:**

The present study investigates the function of two large presynaptic proteins, Piccolo and Bassoon, in regard to synapse formation and regulation. Synapses are sites of neurotransmission between neuronal cells. The presynaptic compartment of each synapse is filled with 50-nm clear centered synaptic vesicles (SV) that dock and fuse in an activity dependent manner with a specialized region of plasma membrane, called the active zone. Fusion of SV with the active zone releases the neurotransmitters, which generate a new signal at the postsynaptic site by binding to neurotransmitter receptors. Piccolo and Bassoon are high molecular-weight components of the cytoskeletal matrix assembled at the active zone (CAZ), and are hypothesized to participate in active zone formation and the regulated release of neurotransmitter. However, most evidence supporting this hypothesis remains circumstantial in part due to the apparent redundancy between these molecules and challenges associated with knocking out all of the alternatively splice isoforms of Piccolo and Bassoon. In the present study, interference RNAs were developed and used to eliminate the expression of Bassoon and/or Piccolo from cultured hippocampal neurons.

Primary cultures of rat hippocampal neurons elaborate synaptic active networks that are invaluable for studying the molecular, cellular, and physiological mechanisms underlying neuronal morphogenesis, nascent synapse formation and synaptic function. To further facilitate the study of any presynaptic proteins in these cultures, new technologies were developed for delivery and expression of recombinant molecules at near endogenous levels. This was accomplished in part by developing methodologies to cryopreserve and store stocks of glial cells and neurons for months that had been genetically manipulated. In addition, a range of plasmid, lentiviral, and adenoviral vectors were created allowing the expression of fluorescent protein (XFP)-tagged synaptic reporter proteins as well as several short-hairpin RNAs (shRNAs) eliminating expression of the AZ proteins Piccolo and Bassoon. Together these technologies permit the cell autonomous and synapse specific assessment of collections of synaptic proteins using high-resolution fluorescent and electron microscopy and allow collaborators to more efficiently share reagents.

Interference RNAs targeting all Piccolo isoforms revealed that while this active zone protein is not required for glutamatergic synapse formation, it plays a fundamental role in the translocation, docking and fusion of SVs at active zones. Mechanistically, Piccolo was found to negatively regulate neurotransmission by modulating the dispersion kinetics of Synapsin1a and the recruitment of CamKII by regulating the activity dependent assembly of presynaptic F-Actin. These data demonstrate that Piccolo functions primarily within presynaptic boutons to coordinate the dynamic assembly of F-Actin during SV cycling. This function is not shared by the highly homologous protein Bassoon, indicating that Piccolo has a unique role in coupling the mobilization of SVs in the reserve pool to events within the active zone.

To uncover redundant functions of Piccolo and Bassoon, short-hairpin RNAs were used to knockdown the expression of both of these two large AZ proteins (by >95%) from cultured hippocampal neurons. Results of these studies show that these proteins are essential for maintaining SV pools within presynaptic boutons and synapse integrity. Mechanistically, Bassoon and Piccolo were found to maintain SV pool size by negatively regulating the activity of the E3 ubiquitin ligase Siah1, and thus the ubiquitination and degradation of SV-associated proteins. These findings demonstrate a novel role for Bassoon and Piccolo as regulators of presynaptic ubiquitination and proteostasis.

Taken together these studies provide fundamental insights into how presynaptic CAZ proteins are central organizers of presynaptic boutons performing functions that not only direct the activity dependent fusion of SVs but also more global facets of presynaptic function which include the maintenance, efficient delivery, and recycling of SVs at the active zone.

### Zusammenfassung

Im Zentrum der vorliegenden Arbeit stehen die Fragen, ob und inwieweit die beiden präsynaptischen Proteine Piccolo und Bassoon an der Entstehung und Regulation neuronaler Synapsen beteiligt sind. Synapsen sind Orte der Reizübertragung zwischen Neuronen. Hierfür befinden sich auf der präsynaptischen Seite einer Synapse 50 nm große synaptische Vesikel (SV), die in Reaktion auf einen elektrischen Reiz mit der Aktiven Zone (AZ), einer spezialisierten Region der präsynaptischen Plasmamembran, fusionieren können. Durch die Fusion der SV mit der AZ wird Neurotransmitter in den synaptischen Spalt freigesetzt, um auf der postsynaptischen Seite durch Aktivierung von Neurotransmitterrezeptoren einen neuen elektrischen Reiz zu generieren. Piccolo und Bassoon sind Bestandteile der Cytomatrix an der Aktiven Zone (CAZ), und es wird vermutet, dass sie eine Rolle bei der Entstehung von Aktiven Zonen und der Regulation der Neurotransmitterausschüttung spielen. Allerdings beruht diese Hypothese vorwiegend auf indirekten Hinweisen, da Piccolo und Bassoon offensichtlich eine große Redundanz in ihren Funktionen besitzen und sich Knockout-Experimente, bei denen alle alternativen Spleißvarianten von Piccolo und Bassoon eliminiert werden, bisher als schwierig erwiesen. Für diese Arbeit wurden daher neue RNA-Interferenzvektoren und lentivirale Expressionsvektoren zur Eliminierung der Expression von Piccolo und/oder Bassoon in kultivierten hippocampalen Neuronen entwickelt. Diese Vektoren erlaubten nicht nur die Identifizierung und Charakterisierung von Funktionen, die spezifisch für Piccolo sind, sondern auch von solchen, die sowohl von Piccolo als auch von Bassoon erfüllt werden.

Für die Experimente, die in dieser Arbeit beschrieben werden, wurden primäre Kulturen hippocampaler Neuronen von Ratten genutzt. Die Neuronen in diesen Kulturen bilden aktive Netzwerke, anhand derer die molekularen, zellulären und physiologischen Mechanismen neuronaler Morphogenese, Synaptogenese und synaptischer Aktivität untersucht werden können. Um die Verwendbarkeit neuronaler Zellkulturen zur Untersuchung präsynaptischer Proteine wie Piccolo und Bassoon weiter zu verbessern, wurden im Rahmen dieser Arbeit neue Techniken entwickelt, die eine Expression rekombinanter Proteine auf endogenem Niveau gewährleisten. Außerdem sollte die Eignung dieser Art von Zellkulturen für Kooperationen zwischen verschiedenen Arbeitsgruppen erhöht werden. Letzteres wurde zum Teil durch die Entwicklung neuer Methoden zur Kryopräservierung und Langzeitlagerung von genetisch manipulierten Neuronen und Gliazellen erreicht. Darüber hinaus wurden verschiedene Plasmide sowie lenti- und adenovirale Vektoren konstruiert. Mit ihrer Hilfe wurden präsynaptische Reporterproteine mit Molekulargewichten von 15kD (VAMP2) bis zu 420kD (Bassoon) in Neuronen exprimiert und mit fluoreszierenden Proteinen fusioniert. Außerdem konnten sie genutzt werden, um mittels shRNA (short-hairpin RNA) die Expression von endogenem Piccolo und Bassoon zu eliminieren. Diese neuen Techniken erlauben zellautonome und Synapsen-spezifische Untersuchungen mit hochauflösender Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie.

Untersuchungen mit shRNAs gegen alle Isoformen von Piccolo ergaben, dass Piccolo auf der einen Seite nicht essentiell für die Synaptogenese ist, auf der anderen Seite jedoch eine fundamentale Rolle bei Translokation, Anlagerung und Fusion von synaptischen Vesikeln an der Aktiven Zone spielt. Dabei konnte gezeigt werden, dass der dieser Funktion von Piccolo zugrundeliegende Mechanismus auf einer Regulation des aktivitätsabhängigen Aufbaus präsynaptischen F-Aktins beruht. Hierdurch wird sowohl die Dispersionskinetik von Synapsin1a als auch die Rekrutierung von CaMKII an die Präsynapse reguliert. Diese Ergebnisse zeigen, dass die primäre Funktion von Piccolo in Präsynapsen in der Koordination des Aktinzytoskeletts während des Kreislaufes synaptischer Vesikel besteht. Diese Funktion wird nicht vom homologen Protein Bassoon geteilt und Piccolo spielt daher

eine besondere Rolle bei Kopplung synaptischer Vesikel des Reservepools mit Ereignissen an der Aktiven Zone.

Um mögliche gemeinsame Funktionen von Bassoon und Piccolo zu ermitteln, wurden shRNAs eingesetzt, die die Expression beider Proteine in hippocampalen Neuronen um mehr als 95% verringern. Ergebnisse dieser Experimente belegen, dass beide Proteine nötig sind für die Erhaltung verschiedener Untergruppen von synaptischen Vesikeln und für die synaptische Integrität. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Mechanismus für die Erhaltung verschiedener synaptischer Vesikelpools auf einer negativen Regulierung der E3 Ligase Siah1 und damit der Ubiquitinierung und Degradation von SV-assoziierten Proteinen beruht. Diese Daten zeigen eine neue Funktion von Bassoon und Piccolo als Regulatoren präsynaptischer Ubiquitinierung und Proteostasis.

Die vorliegende Arbeit konnte damit neue fundamentale Erkenntnisse zur Rolle von CAZ Proteinen als zentrale Organisatoren von Präsynapsen liefern. Dabei umfassen ihre Funktionen nicht nur die Regulation der aktivitätsabhängigen Fusion synaptischer Vesikel mit der Plasmamembran sondern auch der Erhaltung, Translokation und Recycling von synaptischen Vesikeln an der Aktiven Zone.