

**Charakterisierung der physiologischen Funktion des putativ tumorassoziierten
Moleküls EBAG9 als Modulator der Exozytosefunktion *in vitro* und *in vivo***

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Diplom-Biochemiker Constantin Rüder

aus Lübeck

August 2005

1. Gutachter: Prof. Dr. Fritz G. Rathjen

2. Gutachter: Prof. Dr. Bernd Dörken

Disputation am: 23.01.2006

Inhaltverzeichnis

Abkürzungen

1. Einleitung	1
1.1 Das tumorassoziierte 22-1-1-definierte Antigen.....	1
1.2 Das ubiquitär exprimierte Protein EBAG9	2
1.3 Die subzelluläre Lokalisation von EBAG9 und des 22-1-1-definierten Antigens.....	4
1.4 Der monoklonale Antikörper 22-1-1 erkennt das tumorassoziierte O-gekoppelte Glykan Tn..	6
1.5 Vesikeltransport in eukaryotischen Zellen.....	7
1.6 Die Ca ²⁺ -regulierte Exozytose ist ein universeller Mechanismus in einer Vielzahl von Zellen	8
1.7 Mechanismus der Membranfusion am Beispiel der Neuroexozytose.....	10
1.8 Die Proteinkomponenten der Membranfusion.....	12
1.8.1 Die SNARE-Proteine	12
1.8.2 Die Sec1/Munc18-Proteinfamilie	13
1.8.3 Die Rab-Proteine.....	14
1.8.4 Die Synaptotagmine.....	15
1.8.5 Snapin, ein Modulator der regulierten Membranfusion.....	16
1.9 Zielsetzung der Arbeit.....	18
2. Material	19
2.1 Bakterienstämme.....	19
2.2 Hefestämme	19
2.3 Zellen	19
2.4 Mausstämme	20
2.5 Plasmide.....	20
2.6 Oligonukleotide.....	22
2.7 Antikörper	24
2.8 Häufig verwendete Puffer und Medien.....	25
3. Methoden	28
3.1 Molekularbiologische Methoden	28
3.1.1 Kultivierung von Bakterien und Hefen.....	28
3.1.2 Transformation von <i>E. coli</i> durch Hitzeschock	28
3.1.3 Transformation von <i>E. coli</i> durch Elektroporation	29
3.1.4 Isolation von DNA	29
3.1.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	30
3.1.6 Restriktionsverdau von DNA und Dephosphorylierung	31
3.1.7 Herstellung von glatten Enden an DNA-Fragmenten	31
3.1.8 Standard-Agarosegelelektrophorese	32
3.1.9 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	32
3.1.10 Ligation von DNA	32
3.1.11 Sequenzierung und Sequenzanalysen	32
3.1.12 Statistische Auswertungen	32
3.1.13 Southern-Hybridisierung (Southernblot-Analyse).....	33
3.1.14 Klonierungen.....	34

3.2 Das Hefe-2-Hybrid-System.....	38
3.2.1 Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	39
3.2.2 Plasmidisolierung der <i>prey</i> -Plasmide aus Hefen.....	40
3.2.3 Quantitative Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität	40
3.3 Proteinbiochemische Methoden.....	41
3.3.1 Herstellung rekombinanter Fusionsproteine	41
3.3.2 <i>In vitro</i> Transkription und Translation.....	42
3.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	43
3.3.4 Coomassiefärbung.....	44
3.3.5 Autoradiographie	44
3.3.6 Immunblot (Westernblot-Analyse)	44
3.3.7 <i>In vitro</i> -Kinasereaktion	45
3.3.8 Quantifizierung von Protein-Banden	45
3.4 Zellbiologische Methoden.....	46
3.4.1 Kultivierung von Säugetierzellen.....	46
3.4.2 Transfektion von Säugetierzellen.....	46
3.4.3 Isolierung und Kultivierung primärer muriner Zellen	46
3.4.4 Metabolische Markierung von Proteinen mit Radioisotopen	48
3.4.5 Herstellung von Zellysaten	48
3.4.6 Bindungsexperimente mit GST-Fusionsproteinen (<i>GST-Pulldown</i>).....	49
3.4.7 Gelfiltration.....	50
3.4.8 Subzelluläre Fraktionierung.....	50
3.4.9 Immunpräzipitation und Koimmunpräzipitation	51
3.4.10 Durchflußzytometrie (FACS-Analysen).....	51
3.4.11 Immunfluoreszenzfärbung und Mikroskopie.....	52
3.4.12 Elektronenmikroskopie	53
3.4.13 Histologie und Immunhistochemie von Gewebeschnitten.....	53
3.4.14 Endozytose-Experimente	54
3.4.15 Ca^{2+} -regulierte Exozytose von NPY-GST in PC12-Zellen.....	54
3.4.16 Ca^{2+} -regulierte Exozytose von [3H]Norepinephrin in intakten PC12-Zellen	55
3.4.17 Exozytose-Experimente mit T-Zellen.....	55
3.4.18 Exozytose-Experimente mit Mastzellen	57
3.5 <i>Knockout</i> -Technik bei Mäusen	58
3.5.1 Kultur primärer embryonaler Fibroblasten	58
3.5.2 Kultur und Transfektion embryonaler Stammzellen.....	58
3.5.3 Selektion und Isolation embryonaler Stammzellklone	59
3.5.4 Superovulation und Präparation von Blastozysten	59
3.5.5 Injektion embryonaler Stammzellen in Blastozysten und Uterustransfer.....	60
4. Ergebnisse	61
4.1 Identifizierung von Snapin als ersten Interaktionspartner von EBAG9	61
4.2 EBAG9 geht eine direkte Bindung mit Snapin im zellfreien System ein.....	64
4.3 Nachweis der Interaktion von EBAG9 und Snapin <i>in vivo</i>	65
4.4 Identifizierung der relevanten Bindungsdomänen für die EBAG9-Snapin-Assoziation	67
4.5 Untersuchung der Membranassoziation von EBAG9.....	69
4.6 Snapin und EBAG9 kolokalisieren in HEK293-Zellen	71
4.7 Subzelluläre Lokalisation von EBAG9 in neuroendokrinen Zellen	72
4.8 Die Rolle von EBAG9 in Exozytose- und Vesikeltransportprozessen.....	75

4.8.1 EBAG9 inhibiert die Ca ²⁺ -regulierte Exozytose in PC12-Zellen	76
4.8.2 Der konstitutive Transport bleibt durch EBAG9 unberührt.....	78
4.8.3 Untersuchung der Funktion von EBAG9 im ER-Golgi-Transportweg	79
4.8.4 EBAG9 hat keine modulatorische Rolle im endosomalen Transportweg	80
4.8.5 Die rezeptorvermittelte Endozytose wird durch EBAG9 nicht moduliert.....	81
4.9 EBAG9 inhibiert die basale Phosphorylierung von Snapin <i>in vivo</i>	82
4.10 EBAG9 inhibiert die Bindung von Snapin an SNAP25 und SNAP23	84
4.11 Generierung <i>EBAG9</i> -defizienter Mäuse	86
4.11.1 Isolierung der genomischen <i>EBAG9</i> -Sequenz	86
4.11.2 Konstruktion des konstitutiven <i>EBAG9</i> -Rekombinationsvektors.....	87
4.11.3 Homologe Rekombination des konstitutiven <i>EBAG9-Targeting</i> -Vektors in embryonalen Stammzellen	88
4.11.4 Konditionelle Inaktivierung des <i>EBAG9</i> -Gens	89
4.11.5 Etablierung der konstitutiven <i>EBAG9</i> -defizienten Mäusen	92
4.12 Makroskopische Analyse der <i>EBAG9</i> -defizienten Mäuse	93
4.13 <i>In vivo</i> -Untersuchung der Funktion von EBAG9 in Vesikeltransport- und Exozytoseprozessen	95
4.13.1 Die Deletion von EBAG9 führt in CD8 ⁺ -T-Zellen zu einer erhöhten Freisetzung zytotoxischer Granula	95
4.13.2 Die Exozytose inflammatorischer Granula durch Mastzellen ist in den <i>EBAG9</i> - defizienten Mäusen nicht verändert	98
4.13.2 Die Deletion von EBAG9 führt zu einer Vergrößerung der Zymogengranula im exokrinen Pankreas	100
5. Diskussion	102
5.1 Charakterisierung der Snapin-EBAG9-Assoziation	102
5.2 EBAG9 ist über Palmitinsäurereste peripher an Membranen assoziiert.....	104
5.3 EBAG9 unterliegt einer dynamischen Umverteilung in neuroendokrinen Zellen.....	105
5.4 EBAG9 ist ein spezifischer Regulator der LDCV-Exozytose	107
5.5 Die molekularen Mechanismen der EBAG9-Funktion im Rahmen der Vesikelexozytose... 110	
5.6 Ein Ausblick: Weitere mögliche Funktionen von EBAG9 und Snapin.....	113
5.6.1 SNAP23- und SNAP25-abhängige Fusionsprozesse.....	113
5.6.2 Rezeptorexpression und cAMP- <i>Signaling</i>	114
5.6.3 Sekretorische Lysosomen	115
5.7 <i>EBAG9-Knockout</i> -Mäuse als Modell zur Analyse der <i>in vivo</i> -Funktion	117
5.7.1 EBAG9: ein apoptoseinduzierender Ligand ?	117
5.7.2 Die Bedeutung von EBAG9 als Modulator der zytotoxischen Aktivität von CD8 ⁺ -T-Zellen	118
5.7.3 Der Einfluß von EBAG9 auf die Biogenese und Reifung sekretorischer Granula.....	120
5.8 Die Bedeutung von EBAG9 für den Gesamtorganismus: Ein Ausblick	122
6. Literaturverzeichnis.....	125
7. Anhang	137
Zusammenfassung/Summary	
Eidstattliche Erklärung	
Lebenslauf	
Danksagung	

Abkürzungen

AD	GAL4-Aktivierungsdomäne
Abb.	Abbildung
Ade	Adenin
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
amp ^r	Ampicillin-Resistenz
AFP	<i>alpha-fetoprotein</i>
AP	Adapterprotein
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
BD	GAL4-Bindungsdomäne
bp	Basenpaare
BLOC-1	<i>biogenesis of lysosome-related organelles complex-1</i>
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
bzw.	beziehungsweise
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>copyDNA</i>
CEA	<i>carcinoembryonic antigen</i>
cfu	<i>colony forming unit</i>
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfat
CKII	Kaseinkinase II (<i>casein kinase II</i>)
cpm	<i>counts per minute</i> = Zerfälle pro Minute
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten (<i>cytotoxic T lymphocytes</i>)
Cy5	Cyanin5
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol Dihydrochloridhydrat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbeccos Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DO	<i>Dropout</i>
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EBAG9	<i>estrogen receptor-binding fragment-associated gene 9</i>
ECL	verstärkte Chemilumineszenz (<i>enhanced chemiluminescence</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzymgekoppelter Enzymtest (<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	und andere
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
EPSC	<i>exzitatorisches postsynaptisches Potential (evoked postsynaptic current)</i>
EtBr	Ethidiumbromid

FACS	Durchflußzytometrie (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FSH	follikelstimulierendes Hormon (Follitropin)
G418	Geneticin
GABA	γ -Aminobuttersäure
GST	Glutathion-S-Transferase
HCG	<i>beta-human chorionic gonadotropin</i>
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HER2/NEU	<i>human epidermal growth factor receptor-2</i>
His	Histidin
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kan ^r	Kanamycin-Resistenz
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
Leu	Leucin
LDCV	<i>große elektronendichte Vesikel (large dense-core vesicles)</i>
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i>
LH	luteinisierendes Hormon
loxP	<i>locus of crossing over x in P1</i>
M	Molar
mAK	monoklonaler Antikörper
MAGE	<i>melanoma antigen</i>
MCS	Multiklonierungsort (<i>multi cloning site</i>)
MLR	<i>mixed lymphocyte reaction</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MES	2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure
MHC	Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
Neo	Neomycin
NGF	Nervenwachstumsfaktor (<i>nerve growth factor</i>)
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NPY	<i>neuropeptide Y</i>
NSE	<i>neuron-specific enolase</i>
NSF	<i>N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein</i>
NTA	Nitritriessigsäure (<i>nitritriacetic acid</i>)
OD	Optische Dichte
ONPG	o-Nitrophenylgalactopyranosid
ORF	offenes Leseraster (<i>open reading frame</i>)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglykol

P_i	Orthophosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNS	postnukleärer Überstand (<i>postnuclear supernatant</i>)
PSA	<i>prostate-specific antigen</i>
RANTES	Chemokin, <i>regulated on activation normal T cell expressed and secreted</i> (CCL5)
RCAS1	<i>receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RRP	<i>readily releasable pool</i>
RT	Raumtemperatur
s.a.	siehe auch
SD	Selektion- <i>Dropout</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SCF	Stammzellfaktor (<i>stem cell factor</i>)
SM-Proteine	Sec1/Munc18-Proteine
SNAP25	<i>synaptosomal-associated protein of 25kDa</i>
SNARE	<i>soluble NSF attachment protein receptors</i>
SSV	kleine synaptische Vesikel (<i>small synaptic vesicles</i>)
Syt	Synaptotagmin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
TBS	Trisgepufferte Salzlösung (<i>tris buffered saline</i>)
TCA	Trichloressigsäure
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trk	<i>tropomyosin-related kinase</i>
Trp	Tryptophan
TX-100	TritonX-100
u.a.	und andere, unter anderem
U	units
UAS	<i>upstream activating sequence</i>
Upm	Umdrehungen pro Minute
Ura	Uracil
UV	Ultraviolettes Licht
ü.N.	über Nacht
v/v	Volumen/Volumen
VAMP	vesikelassoziertes Membranprotein (<i>vesicle-associated membrane protein</i>)
Vol.	Volumenanteile
w/v	Gewicht/Volumen
X- α -gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- α -D-Galactopyranosid
X- β -gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid