4. Ergebnisse

4.1 Identifizierung von Snapin als ersten Interaktionspartner von EBAG9

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch die Identifizierung von Interaktionspartnern mit potentiell bekannter Funktion einen Hinweis auf die physiologische Funktion des EBAG9-Proteins zu erlangen. Als Methode wurde das anerkannte Hefe-2-Hybrid-System gewählt, mit dem sich unter nativen Bedingungen direkte Wechselwirkungspartner eines Proteins isolieren lassen (Fields und Song 1989). Dieses System basiert auf der Fähigkeit zweier Hybridproteine, von denen eines (*bait*: engl. Köder) die GAL4-DNA-Bindungsdomäne (BD) und das andere (*prey*: engl. Beute) die GAL4-Aktivierungsdomäne (AD) enthält, miteinander zu interagieren und somit die Transkription der Reportergene *Ade2*, *His3*, *Mel1* und *lacZ* im Hefestamm AH109 zu induzieren (s.a. Kap. 3.2).

Als Köder wurde die humane Wildtyp (wt)-cDNA von EBAG9 als Fusionsprotein mit der GAL4-DNA-Bindungsdomäne (pGBKT7-EBAG9 = BD-EBAG9) verwendet. In einem weiteren Ansatz sollte zudem eine trunkierte Variante, in der die vorhergesagte Transmembrandomäne deletiert ist, als *bait* fungieren (BD-EBAG9 Δ 1-30), da eine Membranverankerungsdomäne störende Auswirkungen im Hefe-2-Hybrid System haben könnte. Um die Eignung der EBAG9-Fusionsproteine für einen Hefe-2-Hybrid-*Screen* zu überprüfen, wurden AH109 Hefezellen mit BD-EBAG9 bzw. BD-EBAG9 Δ 1-30 und den Kontrollplasmiden pGADT7 (*prey*-Leervektor) oder pGADT7-T (AD-SV40) kotransformiert (Tab. 4.1).

bait-Plasmid (BD-)	prey-Plasmid (AD-)	SD (-Ade, -His) ¹	X-Gal ²	Interaktion
Lamin C	SV40 T-Antigen	_	W	nein
p53	SV40 T-Antigen	+	b	ja
EBAG9 Δ1-30	Leervektor	+	b	ja
EBAG9 Δ1-30	SV40 T-Antigen	+	b	ja
EBAG9	Leervektor	_	W	nein
EBAG9	SV40 T-Antigen	-	W	nein

Tab. 4.1 Kontrolltransformationen zur Untersuchung der Eignung der BD-EBAG9-Fusionsproteine für einen Hefe-2-Hybrid-*Screen*

¹Kein Wachstum (-) oder Wachstum (+) auf SD(-Leu, -Trp, -Ade, -His)-Agarplatten

²Weiße (w) oder blaue (b) Kolonien auf X- α -Gal-Agarplatten

Das Plasmid AD-SV40 kodiert für ein Fusionsprotein bestehend aus der GAL4-Aktivierungsdomäne und dem "großen SV40 T-Antigen", von dem angenommen wird, daß es nicht mit EBAG9 interagiert. Als Positivkontrolle diente ein Hefeklon bestehend aus den interagierenden Hybridproteinen pGBKT7-53 (BD-p53) und AD-SV40 (Iwabuchi *et al.*, 1993; Li und Fields 1993). Die Kombination pGBKT7-lam (BD-Lamin C) und AD-SV40 wurde als Negativkontrolle verwendet (Bartel *et al.*, 1993; Ye und Worman 1995).

Die Tab. 4.1 zeigt, daß die trunkierte Variante von EBAG9 (BD-EBAG9 Δ 1-30) die Reportergene (*Ade2, His3* und *Mel1*) intrinsisch, d.h. ohne Wechselwirkung mit einem Protein, aktiviert, wohingegen die Expression der Wildtypvariante (BD-EBAG9) zu keinem Verlust der Histidin- und Adenin-Auxotrophie sowie zu keiner Aktivierung des *Mel1*-Reportergens führte.

Um die Stärke der Autoaktivierung der Reportergene zu quantifizieren, wurden die EBAG9-Fusionsproteine in Hefezellen exprimiert und die Aktivierung des *lac*Z-Reportergens in einem quantitativen β -Galaktosidase-Test ermittelt (Abb. 4.1A). Da BD-EBAG9 Δ 1-30 eine stärkere Reportergenaktivität auswies als die Positivkontrolle, war diese Variante nicht für das Hefe-2-Hybrid-System geeignet. Die Westernblot-Analyse von transformierten Hefen stellte sicher, daß die EBAG9-Fusionsproteine tatsächlich exprimiert wurden (Abb. 4.1B).





(A) Intrinsische β -Galaktosidaseaktivitäten von Hefezellen, die mit BD-EBAG9 bzw. BD-EBAG9 Δ 1-30 transformiert wurden. Angegeben ist die prozentuale β -Galaktosidaseaktivität bezogen auf die Positivkontrolle (PK=100%). Als Positivkontrolle diente dabei ein Hefeklon bestehend aus pGBKT7-53 und pGADT7-T, wohingegen die Kombination BD-LaminC und AD-Leervektor als Negativkontrolle (NK=0%) verwendet wurde. (B) Immunblot (IB) von EBAG9 in transfizierten Hefen. Zellextrakte von mit BD-EBAG9, BD-EBAG9 Δ 1-30 oder pGBKT7 (Leervektor) transfizierten Hefen wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit dem EBAG9-Antiserum analysiert. Der Pfeil kennzeichnet die EBAG9-Fusionsproteine.

Im Hefe-2-Hybrid-*Screen* wurde eine humane Gehirn cDNA-Bank verwendet, die mit der GAL4-Aktivierungsdomäne des *prey*-Vektors (pACT2) fusioniert ist, und in den BD-EBAG9 tragenden Hefeklon transformiert. Es wurden insgesamt etwa 1×10^6 Transformanten auf die Expression der Reportergene Ade, His und Mel1- α -Galaktosidase untersucht. Neun Interaktionsklone konnten so isoliert werden, die auf Platten ohne Histidin und Adenin wachsen konnten und sich nach Zugabe von X- α -Gal blau anfärbten. Die cDNAs der putativen Interaktionspartner wurden aus der Hefe isoliert und sequenziert. Die *prey*-cDNAs (pACT2-Plasmide) wurden dann mit dem Köderkonstrukt (BD-EBAG9) rücktransformiert und erneut auf die Aktivierung der Reportergene untersucht und die Affinität der Interaktion mittels eines β -Galaktosidase-Assay bestimmt (Abb. 4.2A). Die Sequenzanalyse (BLASTN; Altschul *et al.*, 1997) der putativen Interaktionspartner zeigt die Abb. 4.2B.





(A) Angegeben ist die prozentuale β -Galaktosidaseaktivität bezogen auf die Positivkontrolle (PK) pGBKT7-53 und pGADT7-T (100%). Der pGBKT7-EBAG9 und pGADT7-T tragende Hefeklon wurde als Negativkontrolle (NK=0%) verwendet. (B) Blast-Analyse der gefundenen Interaktionspartner.

Da die Interaktion von Snapin mit EBAG9 am stärksten war, wurde die Spezifität dieser Assoziation durch Kontrolltransformationen der isolierten Snapin-cDNA (pACT2-Snapin) zusammen mit nicht-relevanten *bait*-Plasmiden durchgeführt, um sicherzustellen, daß Snapin eine spezifische Interaktion mit dem EBAG9-Protein benötigt und nicht einen beliebigen Proteinrest, um die Reportergene zu aktivieren. Als Kontrollen wurden der *bait*-Leervektor, der nur für den GAL4-BD kodiert, und das Plasmid pGBKT7-Lam verwendet. Diese Untersuchungen zeigten (Tab. 4.2), daß die Kotransformation von pACT2-Snapin mit diesen nicht-relevanten *bait*-Plasmiden zu keiner autokatalytischen Aktivierung der Reportergene führte und verdeutlichen daher eine spezifische Assoziation von Snapin und EBAG9 im Hefesystem.

bait-Plasmid (BD-)	prey-Plasmid (AD-)	SD (-Ade, -His) ¹	X-Gal ²	Interaktion
Lamin C	Snapin	-	W	nein
Leervektor	Snapin	_	W	nein
EBAG9	Snapin	+	b	ja

Tab. 4.2 Kontrolltransformationen zur Überprüfung der Spezifität der Snapin-EBAG9-Assoziation

¹Kein Wachstum (-) oder Wachstum (+) auf SD(-Leu, -Trp, -Ade, -His)-Agarplatten

²Weiße (w) oder blaue (b) Kolonien auf X- α -Gal-Agarplatten

4.2 EBAG9 geht eine direkte Bindung mit Snapin im zellfreien System ein

Im folgenden wurde untersucht, ob die EBAG9-Snapin-Assoziation auch mit anderen Methoden bestätigt werden kann und nicht nur auf das Hefesystem beschränkt ist.

Zunächst wurden GST-Bindungsstudien durchgeführt, wofür EBAG9 in der Gegenwart von [³⁵S]Methionin/Cystein *in vitro* translatiert und mit gleichen Mengen an GST-Snapin bzw. GST als Negativkontrolle inkubiert wurde. Als weitere Kontrollen wurden die GST-Fusionsproteine von SNAP25 und VAMP2 verwendet (Abb. 4.3). Die Proteinkomplexe wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und in einer Autoradiographie analysiert. Während GST-Snapin konsistent eine Bindung mit EBAG9 einging, konnte keine effiziente Interaktion mit den Kontrollproteinen beobachtet werden.



Abb. 4.3 Snapin interagiert direkt und spezifisch mit EBAG9. In einer in vitro Transkription wurde die cDNA von EBAG9 transkribiert. Anschließend wurde die **RNA** in der Gegenwart von [³⁵S]Methionin/Cystein in vitro translatiert und mit an Glutathion-Sepharose-gekoppelten GST-Snapin, GST-SNAP25, GST-VAMP2 oder GST inkubiert (jeweils 3 µg). Die Proteinkomplexe wurden anschließend in einer SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert (oberes Bild). 1/5 Vol. der Reaktionsansätze wurde mit Coomassie angefärbt, um sicherzustellen, daß vergleichbare Mengen an den GST-Fusionsproteinen eingesetzt wurden (Input GST).

Die Unfähigkeit von GST-Snapin mit einem weiteren unrelevanten Transmembranprotein (HLA-A3, MHC Klasse I schwere Kette) zu interagieren, bestätigt die Spezifität der beobachteten Interaktion mit EBAG9 (Daten nicht gezeigt). Diese *in vitro* GST-Bindungsstudien zeigen, daß EBAG9 und Snapin spezifisch eine direkte, nicht durch weitere Moleküle vermittelte Assoziation eingehen.

4.3 Nachweis der Interaktion von EBAG9 und Snapin in vivo

Die nativste Methode, um eine Interaktion von Proteinen zu bestätigen, ist die Koimmunopräzipitation aus Zell- oder primären Organextrakten. In diesen tragen die Proteine ihre posttranslationalen Modifikationen und liegen nativ gefaltet vor, wodurch diese Bedingungen den physiologischen sehr nahe kommen.

Lediglich ein GFP-Fusionsprotein von Snapin konnte rekombinant in HEK293-Zellen exprimiert und mit anti-GFP-Antikörpern im Westernblot detektiert werden. Aufgrund der Größe des Fusionsanteils (26 kD) wurde überprüft, ob der GFP-Anteil eine Behinderung für die Interaktion von Snapin (16 kD) mit seinen bekannten Interaktionspartnern SNAP25 bzw. SNAP23 darstellt. GST-Bindungsstudien zeigten, daß auch das C-terminal mit GFP-fusionierte Snapin-Molekül spezifisch und effizient mit den t-SNARE-Molekülen SNAP25 und SNAP23 interagiert. Das ubiquitär exprimierte SNAP25-Homolog, SNAP29, hingegen ging keine Assoziation mit Snapin-GFP ein (Abb. 4.4).



Abb. 4.4 Snapin-GFP interagiert spezifisch mit seinen bekannten Interaktionspartnern.

HEK293-Zellen wurden mit Snapin-GFP transfiziert, nach 36h solubilisiert und die Zellysate mit an Glutathion-Sepharose-gekoppelten GST-Snapin, GST-SNAP25, GST-SNAP23, GST-SNAP29 oder GST inkubiert (jeweils $4.5 \mu g$). Die Proteinkomplexe wurden anschließend in einer SDS-PAGE separiert und in einem Immunblot (IB) mit einem biotinyliertem anti-GFP-Antikörper (AK) analysiert (oberes Bild). Nach Entfernung der GFPspezifischen AK wurde die Menge an GST-Fusionsproteinen mit einem anti-GST-AK kontrolliert (Input). Input Snapin-GFP, 1/40 Vol. des Zellysates.

Für die Koimmunopräzipitationsanalysen wurden N-Flag-EBAG9 und Snapin-GFP in HEK293-Zellen transient koexprimiert. Als Kontrollen wurden beide Fusionsproteine alleine transfiziert. Nach Solubilisation der Zellen wurde EBAG9 mit einem monoklonalen anti-Flag-Antikörper (M5) aus den Zellysaten immunpräzipitiert. In einer Westernblot-Analyse der Immunkomplexe unter Verwendung eines GFP-spezifischen Antikörpers konnte das im Komplex mit EBAG9 koimmunpräzipitierte Snapin-Protein detektiert werden (Abb. 4.5A). Hingegen konnte kein Snapin-GFP in den Immunkomplexen aus Extrakten von Zellen, die nur mit Snapin-GFP transfiziert wurden, nachgewiesen werden. Dies verdeutlicht, daß der M5-Antikörper keine Kreuzreaktivität gegenüber Snapin-GFP besitzt und die beobachtete Assoziation von EBAG9 und Snapin spezifisch ist. Das mittlere und untere Bild in Abb. 4.5A zeigen die Expressionshöhen von EBAG9 und Snapin im Zellysat. In einem reziproken Ansatz konnte EBAG9-C-Flag im Komplex mit Snapin-GFP koimmunpräzipitiert werden. Dafür wurde Snapin-GFP mit einem GFP-spezifischen Antiserum aus dem Zellextrakt von HEK293-Zellen, die EBAG9-C-Flag und Snapin-GFP exprimierten, immunpräzipitiert und diese Immunkomplexe auf das Vorhandensein von EBAG9 untersucht (Abb. 4.5B).



Abb. 4.5 Koimmunopräzipitation von EBAG9 und Snapin in HEK293-Zellen.

(A) HEK293-Zellen wurden mit Snapin-GFP, N-FLAG-EBAG9 oder mit beiden Konstrukten zusammen transfiziert. Die Zellen wurden lysiert und EBAG9 mit dem an Protein A-Sepharose gekoppelten monoklonalen AK (mAK) M5 (anti-Flag) immunpräzipitiert (IP). Die Immunkomplexe wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und in einem Immunblot (IB) mit einem biotinylierten Antikörper gegen GFP analysiert (oberes Bild). Der untere Teil (Input) zeigt die Expressionslevel der Proteine im Zellysat (1/40 Vol.). (B) Zellysate von HEK293-Zellen, die mit EBAG9-C-Flag alleine oder zusammen mit Snapin-GFP transfiziert waren, wurden mit einem GFP-Antiserum immunpräzipitiert und in einem Immunblot mit dem mAK M2 (anti-Flag) analysiert.

Eine Assoziation der endogen exprimierten Proteine EBAG9 und Snapin konnte des weiteren in einer Gelfiltration bestätigt werden. Dafür wurde das Lysat von PC12-Zellen nach dem Prinzip des Größenausschlußes in einer Superdex200-Säule aufgetrennt. Die einzelnen Fraktionen wurden anschließend in Immunblots auf die Anwesenheit von EBAG9 und Snapin analysiert (Abb. 4.6). Sowohl EBAG9 als auch Snapin eluierten vorwiegend in Fraktionen mit einem hohen Molekulargewicht (>440 kD) (Fraktionen 9-15). Nur ein sehr geringer Prozentsatz wurde in Fraktionen detektiert, die den monomeren Proteinen entsprechen (EBAG9: Fraktionen 33-35; Snapin: Fraktion 43). Zusätzlich konnte das Snapin-Protein in den Fraktionen 27-29 (66-98 kD) detektiert werden, wo auch dessen bekannter Interaktionspartner SNAP25 koeluierte (Daten nicht gezeigt).



Abb. 4.6 Koelution von EBAG9 und Snapin nach Gelfiltration von PC12-Zellysaten.

(A) PC12-Zellen wurden in CHAPS-Lysepuffer solubilisiert und das Lysat über eine Superdex200-Säule aufgetrennt. Die Fraktionen wurden anschließend in Immunblots auf die Anwesenheit von EBAG9 und Snapin getestet. Die Molekulargewichtsangaben stammen von der Kalibrierung der Säule mit den Molekulargewichtsstandards Ferritin (440 kD), Aldolase (158 kD), Ovalbumin (43 kD) und Ribonuclease A (14 kD). Das Ausschlußvolumen (V_o) wurde mit Blue dextran (2000 kD) bestimmt.

4.4 Identifizierung der relevanten Bindungsdomänen für die EBAG9-Snapin-

Assoziation

Um die strukturellen Voraussetzungen der Interaktion von EBAG9 und Snapin näher zu charakterisieren, wurden von beiden Proteinen die für die Interaktion verantwortlichen Bindungsdomänen bestimmt.



Abb. 4.7 Snapin bindet mit seiner vorhergesagten N-terminalen coiled-coil-Domäne an EBAG9.

(A) Schematische Darstellung von GST-Snapin und der Deletionsmutanten. HD, hydrophobe Domäne; H1 und H2, *coiled-coil*-Domänen. (B) HEK293-Zellen wurden mit EBAG9-GFP transfiziert und die Zellysate mit den verschiedenen GST-Varianten von Snapin inkubiert. Nach gründlichem Waschen der Proteinkomplexe wurden diese in einem Immunblot (IB) mit einem anti-GFP-AK analysiert (oberes Bild). Nach Entfernung der GFP-spezifischen Antikörper wurde die Menge an GST-Fusionsproteinen mit einem anti-GST-AK kontrolliert (Input). Input EBAG9-GFP, 1/40 Vol. des Zellysates.

Zur Eingrenzung der EBAG9-Interaktionsdomäne von Snapin wurden zwei GST-Deletionsmutanten von Snapin generiert (Abb. 4.7A). Für Snapin ist eine Struktur mit zwei *coiledcoil-*Domänen (H1: AS 37-65 und H2: AS 83-126) und eine N-terminale hydrophobe Domäne (AS 1-20), die für die Membranassoziation von Snapin verantwortlich sein soll, vorgeschlagen (Buxton *et al.*, 2003; Ilardi *et al.*, 1999). GST-Bindungsstudien dieser in HEK293-Zellen exprimierten Snapin-Mutanten zeigten, daß weder die Deletion der hydrophoben Domäne (Δ 1-20) noch das Fehlen der C-terminalen *coiled-coil*-Domäne (Δ 83-136) die Assoziation mit EBAG9-GFP unterbindet (Abb. 4.7B). Auch die konstitutiv phosphorylierte Mutante von Snapin (S50D) (Chheda *et al.*, 2001) wies eine vergleichbare Bindungsaffinität zu EBAG9-GFP auf. Folglich müssen die Aminosäuren 21-82, die die N-terminale *coiled-coil*-Domäne (H1) enthalten, für die Bindung an EBAG9 verantwortlich sein.

Für die Identifizierung der essentiellen Domäne im EBAG9-Molekül wurden die in Abb. 4.8A dargestellten EBAG9-GFP-Deletionsmutanten verwendet. Datenbankalgorithmen sagen für EBAG9 eine Proteinstruktur mit einer Transmembrandomäne im N-terminalen Bereich und einer *coiled-coil* Domäne im C-terminalen Bereich voraus (Engelsberg *et al.*, 2003).





(A) Schematische Darstellung von EBAG9-GFP und den Deletionsmutanten. TM, Transmembrandomäne, CC, *coiled-coil*-Domäne. (B) HEK293-Zellen wurden mit den EBAG9-GFP Varianten transfiziert und die Zellysate mit angegebenen Fusionsproteinen inkubiert. Nach gründlichem Waschen der Proteinkomplexe wurden diese in einem Immunoblot (IB) mit einem anti-GFP-AK analysiert. Nach Entfernung der GFP-spezifischen Antikörper wurde die Menge an GST-Fusionsproteinen mit einem anti-GST-AK kontrolliert (Input). Input EBAG9, 1/40 Vol. des Zellysates.

Die Abb. 4.8B zeigt, daß EBAG9-GFP (wt) und alle anderen Deletionsvarianten ähnliche Bindungsaffinitäten zu GST-Snapin hatten. Nur die N-terminal trunkierte Variante ohne die vorhergesagte Transmembrandomäne (Δ 1-27) ging keine Assoziation mit Snapin ein. Diese Domäne alleine (Δ 30-213) war ausreichend für die Interaktion mit einem Snapin-Fragment, das nur die AS 21-82 beinhaltet.

Zusammengefaßt zeigen diese Ergebnisse, daß die EBAG9-Snapin Assoziation über die vorhergesagte Transmembrandomäne von EBAG9 und die vorhergesagte N-terminale *coiled-coil*-Domäne (H1) von Snapin vermittelt wird.

4.5 Untersuchung der Membranassoziation von EBAG9

Da die Interaktion einer Transmembrandomäne mit einer helikalen Domäne eher ungewöhnlich ist, sollte im folgenden die Membrantopologie des EBAG9-Proteins untersucht werden. *Protease protection-* und Membranextraktionsstudien schlagen eine Topologie mit einer TypIII-Transmembranorientierung für EBAG9 vor, wobei der lange C-Terminus (AS 28-213) ins Zytosol gerichtet ist. Des weiteren ist die putative Transmembrandomäne (AS 8-27) essentiell für die vorherrschende Golgi-Lokalisation des EBAG9-Proteins in MCF7 Zellen (Engelsberg *et al.*, 2003). Diese Untersuchungen schließen aber nicht aus, daß EBAG9 über eine posttranslationale Lipidmodifikation (z.B. Palmitinsäure) peripher an der Membran verankert sein könnte.

Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden die drei einzigen putativen Akzeptor-Stellen (Cysteinreste) für Fettsäuren im EBAG9-Molekül, die alle in der putativen Transmembrandomäne liegen, zu Serinen mutiert (Kap. 3.1.14.1) und die subzelluläre Lokalisation dieser Mutante (EBAG9-GFP C12/14/27S) analysiert. Die vorwiegend zytoplasmatische Lokalisation dieser Mutante zeigte, daß die Cystein-Aminosäuren essentiell für die Membranassoziation des EBAG9-Moleküls sind. Das wt-EBAG9-GFP-Molekül hingegen zeigte die typische perinukleäre Verteilung (Abb. 4.9).



Abb. 4.9 Die Cysteinreste von EBAG9 sind essentiell für die Membranassoziation von EBAG9. HEK293-Zellen wurden mit wt-EBAG9-GFP oder der Cystein-defizienten Mutante (C12/14/27S) transfiziert und in der konfokalen Mikroskopie analysiert. PC, Phasenkontrastaufnahme. Maßstab, 20µm.

Um die für eine periphere Membranassoziation verantwortliche Lipidmodifikation von EBAG9 zu identifizieren, wurden HEK293-Zellen mit verschiedenen EBAG9-GFP-Mutanten transfiziert und metabolisch mit [³H]Palmitinsäure markiert. Nach Immunpräzipitation der EBAG9-Varianten aus den Zellsolubilisaten wurde die Inkorporation der [³H]Palmitinsäure autoradiographisch analysiert. Das Autoradiogramm (Abb. 4.10A) zeigt, daß nur das wt-EBAG9-Protein das Radionukleotid inkorporiert hatte. Die Cystein-defiziente Mutante (C12/14/27S) und die anderen Kontrollvarianten waren hingegen nicht palmityliert. Die [³H]-markierten Palmitatreste konnten durch die Behandlung mit Hydroxylamin abgespalten werden und bestätigt die Thioester-Verknüpfung der Palmitinsäure mit den Cysteinseitenketten von EBAG9 (Abb. 4.10B)(Magee *et al.*, 1984).



Abb. 4.10 EBAG9 ist palmityliert.

(A) HEK293-Zellen wurden mit EBAG9-GFP, EBAG9-GFP C12/14/27S, EBAG9 Δ1-27-GFP oder GFP transfiziert und für 4 h metabolisch mit [³H]Palmitinsäure markiert. Nach Immunpräzipitation der Zellysate mit einem GFP-Antiserum wurde die Inkorporation der [³H]Palmitinsäure autoradiographisch detektiert. Zur Expressionskontrolle wurden 1/5 Vol. der Immunpräzipitate in einem Immunblot (IB) mit einem biotinylierten GFP-spezifischen AK analysiert (Input). (B) Mit EBAG9-GFP transfizierte HEK293-Zellen wurden mit [³H]Palmitinsäure markiert und das Immunpräzipitat zu gleichen Teilen in zwei SDS-Gelen separiert. Nach Fixierung wurde das eine Gel ü.N. mit einer Tris-Lösung (1 M Tris/HCl pH 7.2) als Kontrolle und das andere mit einer Hydroxylamin-Lösung (1 M pH 7.2) inkubiert. Anschließend wurden die Gele wie in (A) prozessiert.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß EBAG9 kein Transmembranprotein ist, sondern ein zytosolisch orientiertes Protein ist, welches durch Palmitin-Anker vermittelt peripher an Membranen assoziiert vorliegt. Diese periphere Topologie des EBAG9-Proteins würde die Zugänglichkeit für die Assoziation mit Snapin erhöhen.

4.6 Snapin und EBAG9 kolokalisieren in HEK293-Zellen

Snapin ist in nicht-neuronalen Zellen vorwiegend im Zytosol lokalisiert, ist aber zudem in intrazellulären Kompartimenten im perinukleären Bereich und auch auf der Plasmamembran vorzufinden (Buxton *et al.*, 2003). Mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie wurde im folgenden versucht, die Lokalisation von Snapin näher aufzulösen.

Dafür wurde das GFP-Fusionsprotein von Snapin (Snapin-GFP), welches dieselbe Lokalisation aufweist wie das endogen exprimierte Protein (Buxton *et al.*, 2003), zusammen mit dem Golgi-Marker 1,4-GT-YFP (β 1,4-Galaktosyltransferase) in HEK293-Zellen transfiziert. In Übereinstimmung mit der Literatur konnte Snapin-GFP im Zytosol, aber auch nahe des Zellkerns (Golgi-Apparat und/oder Endoplasmatisches Retikulum) detektiert werden (Abb. 4.11A). Der Vergleich mit dem Golgi-Marker 1,4-GT-YFP zeigte eine partielle Überlappung der Fluoreszenzsignale von Snapin-GFP und deutet darauf hin, daß Snapin und EBAG9 im Golgi-Bereich koakkumulieren könnten.



Abb. 4.11 EBAG9 und Snapin kolokalisieren im Golgi-Komplex.

(A) HEK293-Zellen wurden mit Snapin-GFP (grün) und dem Golgi-Marker 1,4-GT-YFP (rot) transfiziert. Nach Fixierung wurden die Zellen mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. (B) Konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie von HEK293-Zellen nach Transfektion mit Snapin-GFP (grün) und pcDNA-EBAG9. Nach Fixierung und Permeabilisierung wurde EBAG9 mit dem EBAG9-Antiserum angefärbt (rot). Die Pfeile kennzeichnen die vergrößerten Regionen im rechten oberen Bildrand. Maßstab, 10µm.

Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden HEK293-Zellen mit Snapin-GFP und pcDNA-EBAG9 kotransfiziert und mit dem EBAG9-Antiserum angefärbt. Die Spezifität dieses polyklonalen Serums wurde zuvor gezeigt (Engelsberg *et al.*, 2003). Die Abb. 4.11B zeigt, daß EBAG9 und Snapin partiell im perinukleären Bereich kolokalisierten. Diese Beobachtung bestärkt eine vermutete Assoziation dieser Proteine *in vivo*.

Um die Membranassoziation und mögliche ko- oder posttranslationale Modifikationen von Snapin zu untersuchen, wurde Snapin in der Gegenwart von Mikrosomen *in vitro* translatiert. Mikrosomen stellen dabei ein funktionelles Milieu für Membranassoziationen, Signalpeptid-Abspaltung und *core* N-Glykosylierung bereit. Die Zugabe von Mikrosomen hatte allerdings keinen Einfluß auf die Migration von Snapin in der SDS-PAGE. Die vorhergesagte N-Glykosylierungsstelle (N110) (NetNGlc 1.0) scheint daher unter diesen Bedingungen nicht verwendet zu werden. Auch die Abspaltung eines Signalpeptides konnte nicht beobachtet werden (Abb. 4.12A).

Um eine mögliche posttranslationale Membranassoziation von Snapin zu untersuchen, wurden die Mikrosomen erst nach Abstoppen der Translation durch Zugabe von Cycloheximid zugesetzt. Die Analyse der membrangebundenen Snapin-Moleküle in einer SDS-PAGE zeigte, daß Snapin sowohl kotranslational (ohne Abstoppen der Translation) als auch posttranslational mit Membranen assoziieren kann (Abb. 4.12B).



Abb. 4.12 Snapin assoziiert mit mikrosomalen Membranen ko- und posttranslational.

(A) Snapin wurde in der Gegenwart von [35 S]Methionin/Cystein mit (+) oder ohne (-) Mikrosomen *in vitro* translatiert und anschließend in einer SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. (B) Mikrosomen wurden zu der *in vitro* Translation entweder zu Beginn (-) oder nach Inhibierung der Translation mit Cycloheximid (+) zugegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wurden die mikrosomalen Membranen pelletiert, zweimal mit PBS gewaschen und wie in (A) prozessiert.

4.7 Subzelluläre Lokalisation von EBAG9 in neuroendokrinen Zellen

Snapin ist ein SNARE-assoziiertes Protein mit einer wichtigen Rolle in der Ca²⁺-regulierten Exozytose. Daher wurde die subzelluläre Lokalisation von EBAG9 in Zellen untersucht, die mit einer starken Regulierten Exozytose-Maschinerie ausgestattet sind, wie beispielsweise Neuronen und neuroendokrine Zellen. Dafür wurde die gut charakterisierte Phäochromozytom-Zellinie PC12 verwendet, die neuroendokrinen Ursprungs ist und viele Charakteristika von Neuronen besitzt, wie

die Ca²⁺-abhängige Freisetzung von Neurotransmittern und Neuropeptiden/Katecholaminen oder ihre Stimulierbarkeit durch NGF (*nerve growth factor*; engl. Nervenwachstumsfaktor)(Greene und Rein 1977; Greene und Tischler 1976).



Abb. 4.13 EBAG9 wird in PC12-Zellen NGF-abhängig zu sekretorischen Vesikeln umverteilt.

(A) Konfokale Fluoreszenzmikroskopie von PC12-Zellen nach Transfektion mit EBAG9-GFP und Kultivierung für 72 h in der Abwesenheit (–) oder Anwesenheit (+) von 150 ng/ml NGF. (B) Die Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und mit einem anti-Synaptophysin- oder (C) einem anti-VAMP2-Antikörper angefärbt. Die Pfeile kennzeichnen die vergrößerten Regionen im rechten oberen Bildrand. Maßstab, 10 μ m.

Konfokale Lokalisationsanalysen zeigten, daß die intrazelluläre Verteilung von EBAG9-GFP in NGF-stimulierten und undifferenzierten PC12-Zellen deutlich unterschiedlich ist (Abb. 4.13A). In undifferenzierten PC12-Zellen (-NGF) war EBAG9 vorwiegend im perinukleären Bereich vorzufinden, sehr ähnlich der Verteilung in MCF7- und HEK293-Zellen. In differenzierten Zellen (+NGF) hingegen konnte zusätzlich eine vesikuläre Verteilung mit Anreicherungen in den neuritischen Ausläufern und in der Nähe der Plasmamembran beobachtet werden. Um die Identität der EBAG9-positiven vesikulären Strukturen zu bestimmen, wurde die subzelluläre Lokalisation der sekretorischen Vesikelmarker (LDCV und SSV) Synaptophysin und VAMP2 mit der von EBAG9 verglichen (Abb. 4.13B und C). Die Immunofluoreszenzsignale von VAMP2 und Synaptophysin wiesen eine signifikante Überlagerung mit EBAG9-GFP in den Neuriten differenzierter PC12-Zellen auf, wohingegen die Verteilung beider Proteine in NGF-unstimulierten Zellen (-NGF) deutlich unterschiedlich war.

Diese Kolokalisationsstudien (Abb. 4.13) wurden von Frau Dr. Tatiana Reimer (AG Dr. Rehm, MDC, Berlin) durchgeführt und freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Eine signifikante Kolokalisation von EBAG9 mit den sekretorischen Vesikelmarkern VAMP2 und Synaptophysin konnte ebenfalls durch subzelluläre Fraktionierung in einem Saccharosegradienten bestätigt werden (Abb. 4.14). Dafür wurde der postnukleäre Überstand von NGF-stimulierten PC12-Zellen über einen diskontinuierlichen Saccharosegradienten fraktioniert. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte und dem daraus resultierenden unterschiedlichen Sedimentationsverhalten können die Zellorganellen voneinander getrennt werden. Die Charakterisierung der Fraktionen erfolgte anschließend in Immunblots mit Antikörpern gegen Organell-spezifische Markerproteine. Dabei diente EEA1 als Endosomenmarker und p115 bzw. GM130 als Golgimarker, wohingegen Synaptophysin und VAMP2 als Marker für Fraktionen fungierten, in denen vorwiegend SSV und LDCV angereichert sind. Wie aus Abb. 4.14 hervorgeht, kofraktionierte EBAG9 vorwiegend mit den sekretorischen Vesikelmarkerproteinen VAMP2 und Synaptophysin in Fraktionen geringerer Dichte (6-8) aber auch in Fraktion (13-15) mit höherer Dichte. Zudem konnte eine partielle Kofraktionierung von EBAG9 in Membranfraktionen mit hoher Dichte (13-15) mit den Golgiproteinen p115 und GM130 beobachtet werden, obwohl ein signifikanter Anteil von GM130 und vor allem von p115 (Fraktionen 9-12) nicht mit EBAG9 überlappte.



Abb. 4.14 Subzelluläre Fraktionierung von NGF-differenzierten PC12-Zellen.
(A) Der postnukleäre Überstand von PC12-Zellen wurde über einen diskontinuierlichen Saccharose-Dichtegradienten fraktioniert. Die Analyse der Fraktionen erfolgte in Immunblots mit Antikörpern spezifisch gegen Synaptophysin, VAMP2, p115, GM130 und EEA1. (B) Prozentuale Verteilung von Synaptophysin, EBAG9, p115 und EEA1 in den Fraktionen 5-15.

Diese Ergebnisse zeigen, daß EBAG9 in differenzierten neuroendokrinen Zellen einer dynamischen Umverteilung von perinukleären Bereichen hin zu SSV und LDCV unterliegt.

4.8 Die Rolle von EBAG9 in Exozytose- und Vesikeltransportprozessen

Snapin nimmt eine regulatorische Funktion im Rahmen der regulierten Freisetzung von LDCV und SSV in chromaffinen Zellen und Neuronen ein. Über die Interaktion mit SNAP25 vermittelt Snapin die Rekrutierung von Synaptotagmin I, des vermutlich wichtigsten Ca²⁺-Sensors der Zelle, hin zum synaptischen SNARE Komplex (Chheda *et al.*, 2001; Ilardi *et al.*, 1999; Thakur *et al.*, 2004). Jüngst konnte SNAP23, das nicht-neuronale Homolog von SNAP25, als Bindungspartner von Snapin

identifiziert werden, was darauf hindeutet, daß die modulatorische Funktion von Snapin nicht auf neuronale oder neuroendokrine Zellen beschränkt sein könnte (Buxton *et al.*, 2003).

Die subzelluläre Lokalisation von EBAG9 in differenzierten PC12-Zellen und vor allem die Assoziation mit Snapin legen eine mögliche Rolle von EBAG9 in Ca²⁺-regulierten Exozytoseprozessen nahe. Da EBAG9 und auch Snapin ubiquitär exprimiert werden und EBAG9 zudem hauptsächlich perinukleär vorzufinden ist, sollte des weiteren die Funktion von EBAG9 in intrazellulären Transportwegen untersucht werden.

4.8.1 EBAG9 inhibiert die Ca²⁺-regulierte Exozytose in PC12-Zellen

Die Ca²⁺-regulierte Exozytose von NPY (Neuropeptid Y) in PC12-Zellen ist ein etabliertes Modellsystem, um die Funktion von Proteinen in der Ca²⁺-abhängigen Membranfusion zu untersuchen (Fukuda *et al.*, 2002a). In PC12-Zellen akkumuliert NPY in LDCV und wird erst nach Depolarisation der Plasmamembran durch Anhebung der extrazellulären Kaliumkonzentration und dem damit einhergehenden Ca²⁺-Einstrom sekretiert.

NPY-GST wurde in PC12-Zellen zusammen mit EBAG9-GFP oder als Kontrolle mit GFP exprimiert und die Exozytose des Reporterpeptides NPY durch Zugabe von 56 mM KCl induziert (Abb. 4.15A). Die Überexpression von EBAG9 führte dabei zu einer signifikanten Erniedrigung der Ca²⁺-abhängigen Exozytose von NPY (\approx 50%; **, p = 0.00025). Dagegen blieb die basale Sekretion unter nicht-depolarisierenden Bedindungen (5.6 mM KCl) unverändert (Abb. 4.15B). Im Gegensatz zur Wildtypform hatte die Cystein-defiziente Mutante von EBAG9 (EBAG9 C/S) bei vergleichbarem Expressionsniveau (Abb. 4.15C) keinen modulatorischen Effekt auf die NPY-Sekretion. Dies deutet darauf hin, daß nur das membranassoziierte EBAG9-Protein die Exozytose von LDCV modulieren kann.



Abb. 4.15 Das membranassoziierte EBAG9-Protein inhibiert die Ca²⁺-regulierte Exozytose in PC12-Zellen. (A) NPY-GST wurde zusammen mit EBAG9-GFP, EBAG9-GFP C12/14/27S (EBAG9 C/S) oder als Kontrolle mit GFP in PC12-Zellen transfiziert. Durch eine 10-minütige Inkubation der Zellen in einer Hochkaliumlösung (56 mM KCl) wurde die Ca²⁺-abhängige Sekretion von NPY-GST induziert. Das NPY-GST wurde anschließend aus den Zellextrakten und dem Überstand mit Glutathion-Sepharose präzipitiert, in einem Immunblot mit einem GST-spezifischen AK analysiert und densitometrisch quantifiziert. Angegeben ist die prozentuale Sekretion bezogen auf den gesamten zellulären Inhalt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.D. von drei unabhängigen Experimente. **, p = 0.00025 verglichen mit der GFP-Kontrolle, ungepaarter zweiseitiger T-Test nach Student. (B) Prozentuale NPY Sekretion unter basalen Bedingungen (5.6 mM KCl) bezogen auf GFP-transfizierte Zellen \pm S.D. (n=3). (C) Zur Kontrolle der Expressionslevel wurden 10 µg der PC12-Lysate in einem Immunblot mit dem EBAG9-Antiserum analysiert.

Um zu überprüfen, ob die Wechselwirkung von EBAG9 mit Snapin verantwortlich ist für die Inhibition der LDCV-Exozytose durch die EBAG9-Überexpression, sollte Snapin zusammen mit EBAG9 koexprimiert werden. Um nicht gleichzeitig drei Proteine (NPY-GST, EBAG9 und Snapin) in PC12-Zellen transfizieren zu müssen, wurde die Exozytose von [³H]-markiertem Norepinephrin (NE) aus LDCV untersucht. Die Abb. 4.16 zeigt, daß die EBAG9-abhängige Reduktion der [³H]Noradrenalinfreisetzung in intakten PC12-Zellen durch die Koexpression von Snapin verhindert werden kann (p = 0.688). Demgegenüber führte die alleinige Expression von EBAG9-GFP (p = 0.0096) oder auch der minimalen Snapin-Bindungsdomäne von EBAG9 (EBAG9 Δ 30-213-GFP; p = 0.041) zu einer signifikant erniedrigten Norepinephrin-Sekretion. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß die inhibitorische Funktion von EBAG9 durch die Assoziation mit Snapin vermittelt wird.



Abb. 4.16 Die Koexpression von Snapin unterbindet die EBAG9-vermittelte Inhibition der LDCV-Exozytose. (A) PC12-Zellen wurden mit GFP, EBAG9 Δ 30-213-GFP, EBAG9-GFP oder zusammen mit EBAG9-GFP und His₆-Snapin transfiziert und ü.N. mit [³H]Norepinephrin (NE) beladen. Die Zellen wurden anschließend für 10 min in einer Hochkaliumlösung (56 mM KCl) oder einer Niedrigkaliumlösung (5.6 mM KCl) inkubiert. Die [³H]NE-Freisetzung wurde mittels Szintillationsmessung ermittelt und auf den zellulären Inhalt und die GFP-Kontrolle (100%) normalisiert. Der Ca²⁺-abhängige Anteil der Sekretion wurde aus der Differenz der prozentualen Freisetzung unter depolarisierenden Bedingungen (56 mM KCl) und der basalen Sekretion (5.6 mM KCl) errechnet. Die Daten zeigen Mittelwerte ± S.D. von drei unabhängigen Experimenten. Die statistischen Signifikanzen wurden mit einem ungepaarten zweiseitiger T-Test nach Student ermittelt. (**B**) Die mit Hilfe eines Immunblots (IB) ermittelten Expressionslevel von EBAG9-GFP waren in allen Experimenten vergleichbar.

4.8.2 Der konstitutive Transport bleibt durch EBAG9 unberührt

Um einen möglichen Einfluß von EBAG9 auf intrazelluläre Vesikeltransportvorgänge zu überprüfen, wurde der konstitutive Transport von α 1-Antitrypsin in HepG2-Zellen untersucht. α 1-Antitrypsin ist ein N-glykosyliertes Protein, welches über den klassischen konstitutiven sekretorischen Transportweg zur Plasmamembran transportiert wird. Es wird an rauhen Ribosomen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) translatiert, dann über den Golgi-Apparat in konstitutiven Transportvesikeln zur Plasmamembran transportiert und dort Ca²⁺-unabhängig sezerniert (Carrell *et al.*, 1981; Samandari und Brown 1993).

HepG2-Zellen wurden mit Adenoviren infiziert, die EBAG9 oder als Kontrolle GFP kodierten, und der Transport von α 1-Antitrypsin in einem *Pulse-Chase*-Experiment verfolgt (Abb. 4.17). Die infizierten Zellen wurden zunächst für 10 min mit [³⁵S]Methionin/Cystein markiert (*Pulse*), dann wurde die radioaktive Markierung durch Zugabe eines Überschusses nicht radioaktiver Aminosäuren beendet. Anschließend wurden die Zellen für die angegebenen Zeiten weiterkultiviert (*Chase*), α 1-Antitrypsin sowohl aus dem Überstand der Zellen als auch aus den Zellysaten immunpräzipitiert und mittels Autoradiographie analysiert. Diese Methode erlaubt es, die

Prozessierung und den Transport nur der Moleküle zu beobachten, die während der *Pulse*-Zeit synthetisiert wurden. Die Abb. 4.17 zeigt, daß bereits nach 30 min ca. 40% der Moleküle den Golgiapparat passiert hatten und sezerniert wurden. Nach 120 min hatten die Zellen nahezu vollständig (ca. 80%) das im ER synthetisierte α 1-Antitrypsin in den Überstand abgegeben.



Abb. 4.17 Der konstitutive Transport von α1-Antitrypsin bleibt durch EBAG9 unbeeinflußt.

(A) HepG2-Zellen wurden für 2 h mit Ad-EBAG9-GFP oder als Kontrolle mit Ad-GFP infiziert (MOIs 5-20). Nach 36 h wurden die Zellen für 10 min mit [³⁵S]Methionin/Cystein metabolisch markiert (*Pulse*) und danach mit einem Überschuß an unmarkiertem Methionin/Cystein bei 37 °C weiterkultiviert. Nach den angegebenen Zeitintervallen (*Chase*) wurde α 1-Antitrypsin aus den Zellsolubilisaten (nicht gezeigt) und dem Überstand (oberes Bild) immunpräzipitiert und autoradiographisch analysiert. Zur Kontrolle der Expressionslevel wurden 10 µg der HepG2-Zellysate in einem Immunblot (IB) mit dem EBAG9-Antiserum analysiert (unteres Bild). (**B**) Quantitative Auswertung der α 1-Antitrypsin-Sekretion bezogen auf den gesamten Zellinhalt zum Zeitpunkt t=0. Dargestellt sind Mittelwerte ± S.D. eines repräsentativen Ergebnisses (von vier unabhängigen Experimenten) durchgeführt in Duplikaten.

Die Überexpression von EBAG9 hatte dabei im Vergleich zu der Kontroll-Infektion (GFP) weder einen signifikanten Effekt auf die Kinetik der Sekretion noch auf die absolute Menge des sezernierten α 1-Antitrypsins.

4.8.3 Untersuchung der Funktion von EBAG9 im ER-Golgi-Transportweg

Die vorwiegende Golgi-Lokalisation von EBAG9 läßt vermuten, daß dieses Protein am ER-Golgi-Transport beteiligt ist. Dies sollte im folgenden näher untersucht werden. Als Modellsubstrat diente die MHC Klasse I schwere Kette, welche während der Synthese im ER mit einer sogenannten *core* (Kerneinheit)-Glykosylierung versehen wird. Nach dem Transport zum medialen Golgi-Komplex wird diese *core*-Glykosylierung durch Verknüpfung weiterer Oligosaccharidseitenketten prozessiert und erweitert. Dabei kann man sich zunutze machen, daß die im ER- und cis-Golgi-befindlichen MHC Klasse I schweren Ketten (engl.: heavy chain; HC) sensitiv gegenüber einer Endoglykosidase H (EndoH_f)-Behandlung sind, hingegen die im medialen Golgi prozessierten Proteine nicht durch EndoH_f gespalten werden können (Helenius und Aebi 2001). In *Pulse-Chase*-Experimenten läßt sich die Kinetik der posttranslationalen Modifikationen entlang des sekretorischen, anterograden Stoffwechselweges untersuchen.





HeLa-Zellen wurden dafür mit EBAG9-GFP oder GFP transfiziert, 10 min mit [³⁵S]Methionin/ Cystein markiert und für 60 min in *Chase*-Medium mit einem Überschuß nicht radioaktiver Aminosäuren weiterkultiviert. Nach Immunpräzipitation der MHC Klasse I schweren Kette (MHC I) wurden die Präzipitate mit EndoH_f behandelt und die Prozessierung der Moleküle autoradiographisch analysiert. Die quantitative Auswertung (Abb. 4.18) zeigt, daß die Kinetik der Erlangung der EndoH-Resistenz, was dem Transport vom ER zum medialen Golgikompartiment entspricht, nicht durch die Überexpression von EBAG9 moduliert wird. Daraus kann geschlußfolgert werden, daß EBAG9 keinen signifikanten Einfluß auf den Vesikeltransport vom ER zum Golgi-Komplex hat.

4.8.4 EBAG9 hat keine modulatorische Rolle im endosomalen Transportweg

In einem dritten Ansatz wurde der endosomale/lysosomale Transportweg analysiert. In einem *Pulse-Chase*-Experiment wurde dafür der Transport von Cathepsin D verfolgt. Das Cathepsin D- Vorläufermolekül (53 kD) wird bei Erreichen des endosomalen Kompartiments zu einem 47 kD Zwischenprodukt prozessiert und anschließend in den Lysosomen in zwei Ketten von 31 und 14 kD gespalten (Gieselmann *et al.*, 1983). Auch bei diesem konservierten, konstitutiven Transportweg konnte keine signifikante Modulation durch die Überexpression von EBAG9 beobachtet werden (Abb. 4.19).



Abb. 4.19 EBAG9 hat keine modulatorische Funktion im Golgi-Endosom-Transportweg.

Mit EBAG9-GFP oder GFP transfizierte HEK293-Zellen wurden für 30 min mit [³⁵S]Methionin/Cystein markiert und nach den angegebenen Zeiten in NP40-Lysepuffer solubilisiert. Nach Immunpräzipitation von Cathepsin D erfolgte die Analyse in einer SDS-PAGE und Autoradiographie. Dargestellt ist ein repräsentatives Autoradiogramm von drei unabhängigen Experimenten. Die Expressionslevel von EBAG9 enstprachen in ihrer Höhe der Abb. 4.18.

4.8.5 Die rezeptorvermittelte Endozytose wird durch EBAG9 nicht moduliert

Die regulatorische Funktion von Snapin im Verlauf der Membranfusion wird mit der Rekrutierung von Synaptotagmin I zu dem SNARE-Komplex erklärt. Da Synaptotagmin I und dessen Isoformen neben der essentiellen Rolle als Ca²⁺-Sensor auch eine Funktion im Rahmen der clathrinabhängigen Endozytose durch die Assoziation mit AP-2 zugeschrieben wird (Haucke und De Camilli 1999; Haucke *et al.*, 2000; Mousavi *et al.*, 2004), wurde der Einfluß von EBAG9 auf die rezeptorvermittelte, clathrinabhängige Endozytose untersucht. Die clathrinabhängige Endozytose wird durch die Rekrutierung des Adapterproteins AP-2 an die Plasmamembran initiiert. Dieses Adapterprotein vermittelt anschließend die Bindung von Clathrin an die Donormembran und induziert damit die Ausbildung der clathrinumhüllten Vesikel.

Die Aufnahme von Proteinen über rezeptorvermittelte Endozytose ist der am besten untersuchte clathrinabhängige Aufnahmemechanismus. Daher wurde als Modellsystem die Internalisierung des Chemokins RANTES durch dessen Rezeptor CCR5 untersucht. HEK293-Zellen, die stabil den Chemokinrezeptor CCR5 exprimierten (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von T. Mokros, AG Dr. Lipp, MDC, Berlin), wurden mit EBAG9-GFP bzw. GFP transfiziert und die zeitabhängige

Endozytose von [¹²⁵I]-markiertem RANTES beobachtet. Auch dieser retrograde Transportweg konnte nicht durch die Überexpression von EBAG9 beeinflußt werden (Abb. 4.20).



Abb. 4.20 Die EBAG9-Überexpression hat keinen Einfluß auf die rezeptorvermittelte Endozytose. Stabil CCR5-exprimierende HEK293-Zellen wurden transient mit EBAG9-GFP oder GFP transfiziert und 2 h mit [¹²⁵I]RANTES bei 4 °C inkubiert. Durch Erwärmen auf 37 °C für 0, 10 und 45 min wurde die Endozytose induziert. Die eine Hälfte der Ansätze wurde sofort lysiert (gesamte zellassoziierte Aktivität) und die andere Hälfte erst nach Waschen mit saurem Medium, um das zelloberflächenassoziierte [¹²⁵I]RANTES zu entfernen (säureresistente Aktivität). Nach Bestimmung der Aktivität wurde die Endozytose aus dem prozentualen Anteil der säureresistenten Aktivität an der gesamten zellassoziierten Aktivität berechnet. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten. Die Expressionslevel von EBAG9 enstprachen in ihrer Höhe der Abb. 4.18.

Zusammengefaßt zeigen diese Ergebnisse, daß EBAG9 eine spezifische Rolle in der Ca²⁺regulierten Membranfusion einnimmt. Intrazelluläre, konstitutive Transportwege hingegen bleiben durch die Überexpression von EBAG9 unbeeinflußt.

4.9 EBAG9 inhibiert die basale Phosphorylierung von Snapin in vivo

Die Phosphorylierung von Snapin an Aminosäureposition 50 (Serin) ist eine wichtige Voraussetzung für die positive modulatorische Funktion im Rahmen der Vesikelexozytose (Chheda *et al.*, 2001). Da EBAG9 an die N-terminale Domäne (AS 21-82) von Snapin bindet (s.a. Kap. 4.4), die die besagte Phosphorylierungsstelle (Ser₅₀) enthält, wurde im folgenden untersucht, ob die Snapin-Phosphorylierung durch die Assoziation mit EBAG9 beeinflußt sein könnte.

Snapin-GFP wurde in HEK293-Zellen zusammen mit pcDNA-EBAG9 oder dem Leervektor als Kontrolle exprimiert. Die Zellen wurden dann metabolisch mit [³²P]Orthophosphat (³²P_i) markiert und für 10 min mit dem Proteinkinase C-Induktor PMA oder dem Proteinkinase A (PKA)-Aktivator Forskolin stimuliert. Nach Immunpräzipitation von Snapin wurde die Phosphorylierung autoradiographisch analysiert. In einem Vorversuch wurde sichergestellt, daß der GFP-

Fusionsanteil kein Substrat für Kinasen unter diesen experimentellen Bedingungen ist (Daten nicht gezeigt).

Die Abb. 4.21 zeigt, daß die basale Phosphorylierung von Snapin durch die Koexpression von EBAG9 signifikant reduziert war ($\approx 50\%$, p = 0.016). Die Phosphorylierung konnte hingegen weder durch PMA noch durch den PKA-Induktor Forskolin erhöht werden. Diese Beobachtung war unerwartet, da Snapin als Substrat der PKA beschrieben ist (Chheda *et al.*, 2001). Auch längere Inkubationzeiten mit Forskolin (bis zu 1 h) führten zu keinem erhöhten Phosphorylierungsgrad von Snapin (Daten nicht gezeigt). Demgegenüber konnte die Phosphorylierung von EBAG9 durch PMA und Forskolin um ein mehrfaches erhöht werden (Daten nicht gezeigt).





(A) Snapin-GFP wurde entweder zusammen mit pcDNA-EBAG9 oder dem Leervektor in HEK293-Zellen transfiziert, 1 h mit ³²P_i markiert und 10 min mit PMA oder Forskolin stimuliert. Snapin-GFP wurde aus den Zellextrakten mit einem GFP-Antiserum präzipitiert, in einer SDS-PAGE separiert und autoradiographisch visualisiert. Ein Teil der Immunpräzipitate wurde in einem Immunblot mit einem GFP-spezifischen AK analysiert und die im Gel geladene Snapinmenge densitometrisch bestimmt. Die Phosphorylierungslevel wurden quantifiziert und auf die Snapinkonzentration normalisiert. Dargestellt ist der relative Phosphorylierungsgrad von Snapin-GFP bezogen auf die unstimulierte (unst.) Vektorkontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.D. von drei unabhängigen Experimenten. *, p = 0.016 verglichen mit der unstimulierten Vektor-Kontrolle, ungepaarter zweiseitiger T-Test nach Student. (B) Zur Kontrolle der Expressionslevel wurden 10 µg der HEK293-Zellysate in einem Immunblot (IB) mit dem EBAG9-Antiserum analysiert.

Auch *in vitro* war Snapin kein effizientes Substrat der PKA. Weder *in vitro* translatiertes (Daten nicht gezeigt) noch rekombinantes Snapin wurde durch die PKA phosphoryliert (Abb. 4.22A). Obwohl Serin an Position 50 neben einer Konsensus-Sequenz für die PKA auch ein entsprechendes Motiv für die Caseinkinase II (CKII) aufweist, konnte Snapin nicht durch die CKII phosphoryliert werden (Abb. 4.22B). Anzumerken ist, daß EBAG9 ein effizientes Substrat sowohl der PKA als auch der CKII war.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die Überexpression von EBAG9 die basale Phosphorylierung von Snapin *in vivo* inhibiert. Somit könnte die modulatorische Funktion von EBAG9 auf die Ca²⁺-



regulierte Exozytose durch die Reduzierung der Snapin-Phosphorylierung zumindest teilweise erklärt werden.

Abb. 4.22 In vitro Phosphorylierung von Snapin und EBAG9 durch PKA bzw. CKII.

(A) Jeweils 2 µg Casein, GST-SNAP25, GST-EBAG9 Δ 1-30 oder His₆-Snapin wurden in der Anwesenheit von [γ -³²P]ATP mit rekombinanter Proteinkinase A (PKA) für 30 min bei 30 °C inkubiert. Die Reaktionsansätze wurden in einer SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Die Phosphorylierung wurde quantifiziert und auf die im Gel geladene Proteinmenge, die mit Hilfe einer Coomassie-Färbung densitometrisch bestimmt wurde (nicht gezeigt), normalisiert. Angegeben ist das prozentuale Phosphorylierungsniveau bezogen auf das Modellsubstrat Casein (100%). Die Daten sind Mittelwerte ± S.D. von drei unabhängigen Experimenten. (B) Quantitative Auswertung der Phosphorylierung von GST-EBAG9 Δ 1-30 und His₆-Snapin durch rekombinante Caseinkinase II (CKII). Die Kinasereaktion und Auswertung erfolgte wie in (A) beschrieben.

4.10 EBAG9 inhibiert die Bindung von Snapin an SNAP25 und SNAP23

In einem kompetitiven Bindungsexperiment wurde untersucht, ob die EBAG9-Snapin-Assoziation die Bindung von Snapin an SNAP25 und SNAP23 beeinflußt. Dafür wurde *in vitro* translatiertes EBAG9 verwendet, da sich rekombinantes EBAG9 in voller Länge in Bakterien nicht exprimieren läßt (Engelsberg *et al.*, 2003). In dem Bindungsassay wurde eine konstante Menge an *in vitro* translatiertem [³⁵S]Snapin mit einer konstanten Menge an Glutathion-Sepharose-fixiertem GST-SNAP25 und zunehmenden Volumina von *in vitro* translatiertem EBAG9 inkubiert. Die Abb. 4.23 zeigt, daß bei Erhöhung der Menge an EBAG9 (Sättigung bei ca. 25µl) die Bindung von Snapin an SNAP25 kontinuierlich abnimmt. Um eine quantitative Annäherung an die Stöchiometrie der Inhibition zu erreichen, wurden die relativen Intensitäten von "direct loads" der *in vitro* translatierten [³⁵S]markierten Proteine Snapin und EBAG9 unter Berücksichtigung des Methionin/Cystein-Gehalts der Proteine quantifiziert (Huppa und Ploegh 1997). Die Berechnungen deuten auf eine 1:1 Stöchiometrie für Snapin und EBAG9 hin (Abb. 4.23C), da über die Zugabe von 25 µl EBAG9 hinaus keine weitere Inhibition erzielt werden konnte (Molare Ratios

EBAG9 : Snapin = 1.28 : 1). In einem äquivalenten experimentellen Ansatz konnte gezeigt werden, daß auch die Assoziation von Snapin mit SNAP23, dem nicht-neuronalen Homolog von SNAP25, durch EBAG9 unterbunden wird (Abb. 4.23B). Dies deutet darauf hin, daß EBAG9 möglicherweise auch eine modulatorische Funktion in Ca²⁺-abhängigen Exozytoseprozessen in Zellen nichtneuronalen Ursprungs haben könnte.



Abb. 4.23 EBAG9 verhindert die Assoziation von Snapin mit SNAP25 und SNAP23.

(A) Eine konstante Menge an *in vitro* translatiertem, [³⁵S]markiertem Snapin wurde für 30 min mit ansteigenden Mengen an *in vitro* translatiertem EBAG9 inkubiert. Zu diesen Reaktionsansätzen wurde dann 10 μg GST-SNAP25 (an Glutathion-Sepharose immobilisiert) gegeben. Nach 60-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Sepharosebeads gründlich gewaschen und gebundenes Snapin wurde in einem Autoradiogramm visualisiert und densitometrisch quantifiziert. Dargestellt ist die prozentuale Menge des an GST-SNAP25 gebundenen Snapins bezogen auf den Reaktionsansatz ohne Zugabe von EBAG9 (100%). Als Spezifitätskontrolle (Kontrolle) diente Retikulozytenlysat ohne EBAG9. (B) Quantitative Auswertung der Inhibition der Snapin-SNAP23-Interaktion in Gegenwart von EBAG9. Die gezeigten Ergebnisse sind repräsentativ für vier unabhängige Experimente. (C) Tabellarische Darstellung der molaren Verhältnisse von EBAG9 und Snapin, die in den Reaktionsansätzen (A) und (B) vorherrschten.

4.11 Generierung EBAG9-defizienter Mäuse

In den vorhergehenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die Überexpression von EBAG9 einen inhibitorischen, modulatorischen Effekt auf die Ca²⁺-regulierte Membranfusion hat. Mechanistisch rührt dieser Effekt wahrscheinlich von einer Inhibierung der Snapin-SNAP25-Assoziation und reduzierten Snapin-Phosphorylierung her, so daß die fördernde Wirkung von Snapin auf die Exozytose von sekretorischen Vesikeln unterdrückt wird.

Obwohl Überexpressionsstudien zwar ein weitverbreiteter Ansatz sind, einen Hinweis auf die Funktion eines Proteins zu erlangen, sind diese *in vitro*-Untersuchen nicht zwangsläufig übertragbar auf das physiologische, endogen exprimierte Protein. Daher sollte im folgenden die *in vivo*-Funktion in Hinblick auf den Gesamtorganismus durch die Deletion des *EBAG9*-Gens in der Maus untersucht werden.

4.11.1 Isolierung der genomischen EBAG9-Sequenz

Die Identifizierung des genomischen *EBAG9*-Lokus in der Maus wurde von der Firma Incyte Genomics Inc. (St. Louis, MO, USA) durchgeführt. Unter Verwendung der humanen EBAG9cDNA (volle Länge) als Sonde konnte die Firma mittels Southernblot-Hybridisierung drei *EBAG9*-Klone (P1, P2 und P3) aus einer SV129-BAC (*bacterial artificial chromosome*)-Genbank isolieren. Zu diesem Zeitpunkt stand die murine EBAG9-cDNA noch nicht zur Verfügung.

Obwohl das murine Homolog der EBAG9-cDNA eine Identität von 90% zu der humanen cDNA aufweist, sollten die genomischen Klone mit einer murinen EBAG9-Sonde verifiziert werden, um falsch-positive Signale in der Southernblot-Analyse auszuschließen. Dafür wurde die murine EBAG9-cDNA aus revers transkribierter mRNA von Hodengewebe amplifiziert und kloniert.



Abb. 4.24 Southernblot-Analyse der BAC-Klone P1, P2 und P3.

Southern-Hybridisierung von *Apal/Bam*HI-verdauter Plasmid-DNA der BAC-Klone P1, P2 und P3 unter Verwendung einer murinen EBAG9-cDNA als Sonde.

Die von der Firma Incyte Genomics identifizierten genomischen Klone wurden dann erneut mittels Southern-Hybridisierung unter Verwendung der murinen EBAG9-cDNA als Sonde analysiert, und es zeigte sich, daß nur die BAC-Klone P1 und P3 den gewünschten Bereich (Kap. 4.11.2) des EBAG9-Gens enthielten (Abb. 4.24).

Da zu diesem Zeitpunkt die chromosomale Sequenz des *EBAG9*-Lokus nicht zur Verfügung stand, wurde der im pBeloBAC11-Vektor befindliche chromosomale DNA-Abschnitt des Klons P3 mittels Restriktionsanalysen, Southern-Hybridisierungen und partiellen DNA-Sequenzierungen kartiert (Abb. 4.25), wobei die von Tsyuchi *et al.* (2001) ermittelte grobe genomische Struktur als Anhaltspunkt diente.



Abb. 4.25 Schematische Struktur des EBAG9-Lokus.

Die Exons sind durch schwarze Boxen und die Introns durch Linien repräsentiert. Das Start- und das Stop-Codon des *open reading frames* sowie ausgewählte Restriktionsschnittstellen sind markiert. A, *Apa*I; B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; P, *PmI*I; RV, *Eco*RV; Sc, *Sac*I; X, *Xho*I

4.11.2 Konstruktion des konstitutiven EBAG9-Rekombinationsvektors

Um eine Null-Mutation des EBAG9-Gens durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen zu erreichen, sollte ein möglichst großer Teil des EBAG9-Gens inaktiviert werden. Für eine Deletion wurde das Exon 2, welches das Startcodon enthält, sowie die Exons 3 und 4 ausgewählt (entspricht AS 1-107). Die Strategie der konstitutiven Geninaktivierung ist in Abb. 4.26 gezeigt.

Zur Konstruktion des Rekombinationsvektors wurde der 5'-flankierende Bereich stromaufwärts von Exon 2 als auch der 3'-flankierende Bereich stromabwärts von Exon 4 in den Rekombinationsvektor kloniert (s.a. Kap. 3.1.14.2). Als Grundgerüst des EBAG9-*Targeting*-Vektors für die homologe Rekombination in ES-Zellen diente das Plasmid pTV-0, welches neben einer Neomycin-Resistenz (positive Selektion) auch eine Thymidinkinase-Kassette 3' der homologen Sequenz enthält. Das Thymidinkinasegen integriert nur bei zufälliger, nicht-homologer Rekombination in das Genom der ES-Zellen und wird zur negativen Selektion unspezifischer Integrationsereignisse eingesetzt. Diese Zellen können durch Zusatz des mutagenen Nukleosidanalogons Gancyclovir eliminiert werden, da Zellen mit dem Thymidinkinasegen das Analogon phosphorylieren und in ihre DNA einbauen (Mansour *et al.*, 1988; Thomas und Capecchi 1987).



Abb. 4.26 Strategie zur konstitutiven Inaktivierung des EBAG9-Gens.

Schematische Darstellung der Struktur des Wt *EBAG9*-Lokus, des *Targeting*-Konstrukts und des mutierten *EBAG9*-Allels nach homologer Rekombination (EBAG9^{Δ}). Die Exons sind durch schwarze Boxen und die Introns durch Linien repräsentiert. Die Neomycin-Kassette (Neo) ist vom 5'- und 3'-Rekombinationsarm flankiert und ersetzt die Exons 2 bis 4. Außerhalb des 3'-Rekombinationsarms befindet sich ein Thymidinkinasegen (Tk). Die nach Restriktionsspaltung erwarteten Fragmente sind eingezeichnet. Die neue, durch den Rekombinationsvektor eingeführte Schnittstelle ist rot markiert. A, *ApaI*; B, *Bam*HI; X, *Xho*I.

4.11.3 Homologe Rekombination des konstitutiven EBAG9-*Targeting*-Vektors in embryonalen Stammzellen

Der Rekombinationsvektor wurde zunächst mit *Cla*I linearisiert und anschließend in E14.1 ES-Zellen der Mauslinie SV129 elektroporiert. Über die Doppelselektion mit G418 und Gancyclovir wurden resistente ES-Zellklone angereichert und isoliert. Zur Identifikation von homolog rekombinierten ES-Zellklonen wurde die *XhoI/Bam*HI-geschnittene, chromosomale DNA von 980 Klonen mittels Southern-Hybridisierung analysiert. Als 5'-Sonde diente dabei ein 610 bp-Fragment, das stromaufwärts und damit außerhalb des Rekombinationsvektors liegt. Im Falle eines homologen Rekombinationsereignisses hybridisiert die 5'-Sonde mit einem im Vergleich zum Wildtyp-Allel (13.5 kb) um ca. 9 kb kleineren *XhoI/Bam*HI-Fragment (4.5 kb). Auf diese Weise konnten zehn homolog rekombinierte ES-Zellklone isoliert werden, die heterozygot für das mutierte *EBAG9*-Gen (*EBAG9* +/-) waren. Vier dieser Klone (D:A1, I:B5, C:G11, C:H5) wurden expandiert und mittels Southernblot-Analyse erneut verifiziert (Abb. 4.27A). Um sicherzustellen, daß der 3'-Rekombinationsarm des Rekombinationsvektors ebenfalls korrekt rekombiniert war, wurde zusätzlich eine 3'-Sonde stromabwärts des *Targeting*-Konstruktes verwendet (Abb. 4.27B). Der ES-Zellklon C:H5 stellte sich nach Expandierung als falsch-positiv heraus.



Abb. 4.27 Southernblot-Analyse homolog rekombinierter ES-Zellklone.

(A) *Xhol/Bam*HI-geschnittene genomische DNA wurde mit der 5'-Sonde hybridisiert. Die Wildtyp-Bande mit 13.5kb und ein 4.5kb-Fragment des rekombinierten *EBAG9*-Allels sind zu erkennen. Die mit dem Pfeil markierte Bande stellt ein partielles Restriktionsprodukt dar. (B) Hybridisierung *Apa*I-verdauter DNA mit der 3'-Sonde. Die Wildtyp-Bande mit 19.5kb und ein 14.5kb-Fragment des rekombinierten *EBAG9*-Allels sind zu erkennen.

4.11.4 Konditionelle Inaktivierung des EBAG9-Gens

Da ein embryonal- oder postnatal-letaler Phänotyp der homozygoten EBAG9-*Knockout*-Mäuse nicht ausgeschlossen werden konnte, sollte neben konstitutiven *Knockout*-Mäusen auch eine induzierbare Linie unter Verwendung des Cre/loxP-Rekombinationssystems generiert werden.

Die DNA-Rekombinase Cre vermittelt die spezifische Deletion eines Genabschnitts zwischen zwei 34bp-Erkennungssequenzen (loxP-Elementen), die mit gleicher 5'-3'-Orientierung in den Genlokus inseriert wurden. Da sich die Cre-Rekombinase gewebespezifisch und bei Wahl eines induzierbaren Promotors auch zeitlich definiert in der Maus exprimieren läßt, kann sowohl der Ort als auch der Zeitpunkt der Deletion in der adulten Maus festgelegt werden (Abb. 4.28).



Abb. 4.28 Strategie zur konditionellen Deletion des EBAG9-Gens.

Schematische Darstellung der Struktur des Wt *EBAG9*-Lokus, des *Targeting*-Konstrukts und der mutierten *EBAG9*-Allele. Nach homologer Rekombination sind die Exons 2-4 von zwei loxP-Sequenzen (grüner Pfeil) flankiert, daran anschließend befindet sich die Neomycin-Kassette, die ebenfalls gefloxt ist. Die transiente Expression der Cre-Rekombinase in ES-Zellen führt dann zur Deletion der Neomycin-Kassette. Durch Verpaarung mit Cre-transgenen Mäusen kann der gefloxte Genabschnitt deletiert werden. Die nach Restriktionsspaltung erwarteteten Fragmente sind eingezeichnet. Die Exons sind durch schwarze Boxen und die Introns durch Linien repräsentiert. Die neue durch den Rekombinationsvektor eingeführte Schnittstelle ist rot markiert. Neo, Neomycin-Kassette; Tk, Thymidinkinasegen; A, *ApaI*; B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; RV, *Eco*RV; Sc, *SacI*; X, *XhoI*.

Konstruktion und homologe Rekombination des induzierbaren Rekombinationsvektors

Für die konditionelle Inaktivierung des EBAG9-Gens wurden die Exons 2-4 mit loxP-Elementen flankiert (gefloxt), ohne dabei die Funktion des Gens zu beeinflussen. Als 5'-Rekombinationsarm für den *Targeting*-Vektor wurde ein 2.2kb-*Eco*RI/SacI-Fragment verwendet und am 3'-Ende mit einem loxP-Element versehen. Ein *SacI/Eco*RV-Fragment (5kb), das die Exons 2-4 des EBAG9-Gens enthält, wurde stromaufwärts der Neomycin-Kassette in den Vektor ligiert. Der 3'-Rekombinationsarm, ein *Eco*RV/*Bam*HI-Fragment mit einer Länge von 3.8 kb, wurde stromabwärts der bereits gefloxten Neomycin-Kassette integriert (Abb. 4.28). Eine detaillierte Beschreibung der Klonierung findet sich in Kap. 3.1.14.3.

Der mit *Cla*I-linearisierte Rekombinationsvektor wurde in ES-Zellen elektroporiert, und es konnten 480 G418- und Gancyclovir-resistente ES-Zellklone isoliert werden. Mittels Southernblot-Analysen konnten 20 Klone identifiziert werden, bei denen der Rekombinationsvektor in das Genom eingebaut worden war. Vier dieser Klone wurden expandiert und mittels Southern-Hybridisierung als homolog rekombinierte ES-Zellklone verifiziert (Abb. 4.29).



Abb. 4.29 Southernblot-Analyse der homolog rekombinierten ES-Zellklone.

*XhoI/Bam*HI-geschnittene genomische DNA wurde mit der 5'-Sonde hybridisiert. Die Wildtyp-Bande mit 13.5kb und ein 9.5kb-Fragment des rekombinierten *EBAG9*-Allels sind zu erkennen.

Anschließend sollte durch die transiente Expression der Cre-Rekombinase die Neomycin-Kassette in den ES-Zellen entfernt werden. Da aber in der Zwischenzeit die ersten homozygoten konstitutiven *EBAG9-Knockout*-Mäuse geboren wurden und diese lebensfähig und fertil waren, sowie keinen makroskopischen Defekt zeigten (s.a. Kap. 4.12), wurde auf die Fortführung der Generierung der induzierbaren Mauslinie verzichtet.

4.11.5 Etablierung der konstitutiven EBAG9-defizienten Mäusen

Der Klon D:A1 (Kap. 4.11.3) wurde in Blastozysten der Mauslinie C57Bl/6 injiziert und anschließend in den Uterus pseudoschwangerer CB6F1-Weibchen transferiert (Kap. 3.5.5). Diese Arbeiten wurden freundlicherweise von Frau Kathrin Rudolph (AG Prof. Carmen Birchmeier, MDC, Berlin) durchgeführt. Zwei chimäre männliche Nachkommen konnten anhand der Fellfarbe identifiziert werden, da die verwendeten ES-Zellen aus dem Mausstamm 129/Ola mit gelblichbrauner Fellfarbe (agouti) stammten, wohingegen die Blastozystenspender (C57Bl/6) schwarz sind.



Abb. 4.30 Southernblot- und Westernblot-Analyse von EBAG9-defizienten Mäusen.

(A) Southernblot-Hybridisierung genomischer DNA von Wildtyp-Tieren (+/+), heterozygot (+/-) und homozygot deletierten EBAG9-Mäusen (-/-). (B) Westernblot-Analyse der EBAG9-Expression am Beispiel von Lymphknoten- und Hirnstammextrakten (jeweils 100 μ g) unter Verwendung des EBAG9-Antiserums. (C) Dargestellt ist die Proteinexpression von EBAG9 in verschiedenen Mausgeweben (jeweils 100 μ g Proteinlysat) einer adulten Wildtypmaus. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung wurde das Gel zusätzlich mit einem anti-Actin-Antikörper analysiert.

Entscheidend für die Etablierung der EBAG9-defizienten Mauslinie ist der Beitrag mutierter ES-Zellen zur Keimbahn, welcher häufig mit dem Beitrag zu somatischen Zellen korreliert. Die chimären Männchen wurden mit C57Bl/6-Weibchen verpaart und es wurden daraus Nachkommen mit einer braunen Fellfarbe der F1-Generation erhalten, wovon gemäß der Mendel-Regel 50% heterozygot für das deletierte *EBAG9*-Gen waren. Die Genotypisierung dieser Mäuse erfolgte mittels Southern-Hybridisierung genomischer DNA aus Schwanzbiopsien. Verpaarungen von heterozygoten Tieren dieser F1-Generation führten mit der erwarteten Wahrscheinlichkeit bei 25% der Tiere zu homozygot deletierten *EBAG9*-Mäusen (Abb. 4.30A; s.a. Tab. 4.3). Die Westernblot-Analyse von Homogenisaten verschiedener Organe zeigte, daß die Deletion der Exons 2 bis 4 tatsächlich die EBAG9-Proteinsynthese unterbindet (Abb. 4.30B). Auch konnten keine trunkierten Formen detektiert werden.

Die Expressionslevel des EBAG9-Proteins in verschiedenen Geweben von Wildtyptieren ist in Abb. 4.30C gezeigt. Im Hirnstamm sowie Lymphknoten waren die höchsten Proteinmengen vorzufinden, wohingegen in der Niere, dem Magen oder Dick- und Dünndarm kein EBAG9-Protein detektiert werden konnte.

4.12 Makroskopische Analyse der EBAG9-defizienten Mäuse

Sowohl heterozygote als auch homozygote *EBAG9*-defiziente Mäuse waren lebensfähig und wiesen keine Abnormitäten im Habitus auf. Der Anteil homozygoter Mäuse nach Verpaarung heterozygoter Tiere entsprach dem zu erwartenden statistischen Viertel nach den Mendelschen Regeln. Auch die Fertilität homozygoter Mäuse war nicht beeinträchtigt (Tab. 4.3).

Generation	Anzahl der Würfe	Ø Wurfgröße	+/+	+/-	-/-
F1 (+/-) x (+/-)	12	7.8	18 (19%)	50 (54%)	25 (27%)
F1 (+/+) x (+/+)	21	5	105	-	-
F1 (-/-) x (-/-)	25	4.88	-	-	122

Tab. 4.3 Verteilung von Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten Mäusen

Die makroskopische Untersuchung der gesamten Maus sowie morphologische Analysen verschiedener Organe (u.a. Milz, Lymphknoten, Parotis) zeigten keine Auffälligkeiten in den homozygoten *EBAG9*-defizienten Tieren. Da das EBAG9-Protein ursprünglich dem tumorassoziierten, 22-1-1-definierten Antigen gleichgesetzt wurde, lag ein Hauptaugenmerk auf der Analyse der Lymphknotenmorphologie. Dem 22-1-1-definierten Antigen wurde eine allgemeine apoptoseinduzierende Funktion bei der Eliminierung von aktivierten Lymphozyten zugeschrieben,

vergleichbar dem FasL-Fas-System wird (Nakashima *et al.*, 1999). Der Defekt in der Apoptose im FasL-Fas-System führt zu einer starken Vergrößerung der Lymphknoten durch die fehlende Elimination autoreaktiver B- und T-Zellen (Nagata und Suda 1995). Die Abb. 4.31 verdeutlicht allerdings, daß die EBAG9-Deletion keinen signifikanten Einfluß auf die Struktur und Organisation der B- und T-Zellzonen des Lymphknotens hatte. Auch die Lymphozytensubpopulationen im Blut waren durch das Fehlen von EBAG9 nicht verändert (Daten nicht gezeigt).



Abb. 4.31 Das Fehlen von EBAG9 hat keinen Einfluß auf die Organisation und Struktur der Lymphknoten. (**A**) H/E-Färbung von Lymphknoten 10 Monate alter Wildtyp-Tieren (+/+) und homozygot deletierter *EBAG9*-Mäuse (-/-). (**B**) Immunfluoreszenzfärbung der Lymphknoten gegen B-Zellen (anti-B220; grün) und T-Zellen (anti-CD3ε; rot).

4.13 *In vivo*-Untersuchung der Funktion von EBAG9 in Vesikeltransport- und Exozytoseprozessen

4.13.1 Die Deletion von EBAG9 führt in CD8⁺-T-Zellen zu einer erhöhten Freisetzung zytotoxischer Granula

In dem ersten Abschnitt dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, daß *in vitro* die Überexpression von EBAG9 zu einer Inhibierung der Ca²⁺-abhängigen Vesikelfreisetzung in PC12-Zellen führt (Kap. 4.8.1). Die Deletion von EBAG9 in der Maus ermöglichte es nun, die *in vivo*-Rolle von EBAG9 im Rahmen von Vesikeltransport- und Exozytoseprozessen zu untersuchen. Um eine mögliche Rolle von EBAG9 bei Ca²⁺-abhängigen Membranfusionsprozessen aufzuklären, wurde die Sekretion lytischer Vesikel aus zytotoxischen CD8⁺-T-Zellen (CTL; *cytotoxic T lymphocytes*) untersucht.

der Mediatoren zytotoxischer Die Exozytose Granula, zu denen vor allem die apoptosevermittelnden Granzyme und das porenbildende Protein Perforin gehören, nimmt eine essentielle Funktion bei der Eliminierung von virusinfizierten Zellen und Tumorzellen ein (Henkart 1994; Kagi et al., 1994). Die lytischen Granula liegen im Zytosol der "ruhenden" CD8⁺-T-Zelle gespeichert vor und werden erst nach Stimulation des T-Zell-Rezeptors zur sogenannten "Immunologischen Synapse", der Kontaktstelle zwischen CD8⁺-T-Zelle und Zielzelle, transportiert und dort Ca²⁺-abhängig sezerniert (Griffiths 1996). Eine aus der Milz isolierte Lymphozytenkultur wurde zunächst in einer MLR-Reaktion (mixed lymphocyte reaction) zur Proliferation und Ausdifferenzierung in Effektor-T-Zellen induziert.





Eine Milz-Lymphozytenkultur wurde in einer MLR (*mixed lymphocyte reaction*) aktiviert und B- sowie CD4⁺-T-Zellen depletiert. Der Reinheitsgrad und Aktivierungsgrad der zytotoxischen T-Zellen wurde anschließend mittels einer FACS-Analyse der Oberflächenexpression von CD8 und CD25 (IL2-Rezeptor α -Kette) bestimmt.

Die Aufreinigung zu einer ca. 90% ig reinen CD8⁺-T-Zellkultur erfolgte anschließend durch Depletion der B- und CD4⁺-T-Zellen mittels immunmagnetischer Beads (Abb. 4.32).

Die so aufgereinigte Zellpopulation von zytotoxischen T-Zellen wurde dann durch Quervernetzung des T-Zell-Rezeptors mit anti-CD3 ϵ -Antikörpern zur Sekretion ihrer lytischen Granula stimuliert. Anschließend wurde die prozentuale Sekretion von Granzym A (Abb. 4.33A) und der β -Hexosaminidase (Abb. 4.33C) ermittelt; beide Enzyme sind Markermoleküle lytischer Vesikel. In beiden Fällen konnte im Vergleich zu Wildtyptieren eine um ca. 85% erhöhte Freisetzungsrate in den EBAG9-deletierten T-Zellen beobachtet werden. Gleichzeitig war die Gesamtzellaktivität von Granzym A (Abb. 4.33B) und auch der β -Hexosaminidase (Abb. 4.33D) nicht signifikant unterschiedlich.



Abb. 4.33 Die Regulierte Exozytose lytischer Vesikel ist in EBAG9-defizienten Mäuse erhöht.

Aus der Milz isolierte CD8⁺-T-Lymphozyten von jeweils drei Tieren pro Gruppe (EBAG9 +/+ und EBAG9 -/-) wurden in einer MLR (*mixed lymphocyte reaction*) aktiviert, durch Depletion von B- und CD4-T-Zellen aufgereinigt und anschließend vereinigt. Die Ca²⁺-abhängige Exozytose (schwarzer Balken) von Granzym A wurde durch Quervernetzung des T-Zell-Rezeptors mit anti-CD3 ϵ -Antikörper (+) stimuliert. Als Kontrolle für die basale konstitutive Sekretion (weißer Balken) blieben die Zellen unstimuliert (–). Nach vier Stunden wurde die Enzymaktivität sowohl im Überstand der CTL als auch im Zellysat bestimmt. Dargestellt ist die prozentuale Sekretion von Granzym A (**A**) und der β -Hexosaminidase (**C**) bezogen auf den zellulären Inhalt zum Zeitpunkt t=0 ± S.D. von neun unabhängigen Experimenten. **, p < 0.003 verglichen mit der Wildtyp-Kontrolle, ungepaarter zweiseitiger T-Test nach Student. (**B**) und (**D**) Gesamtenzymaktivät der CTL nach Zellyse zum Zeitpunkt t=0. Um einen möglichen Einfluß auf den konstitutiven Transportweg in zytotoxischen T-Zellen zu überprüfen, wurde die Sekretion von IFNγ untersucht. Im Gegensatz zu den lytischen Granula wird IFNγ erst nach Stimulation des T-Zell-Rezeptors synthetisiert, über den klassischen sekretorischen Transportweg durch konstitutive Vesikel zur Plasmamembran transportiert und dort sezerniert (Fortier *et al.*, 1989). Die Bestimmung der IFNγ-Konzentration nach Stimulation des T-Zell-Rezeptors im Überstand der T-Zellen zeigte, daß dieser Vesikeltransportweg nicht signifikant durch die Abwesenheit von EBAG9 moduliert war (Abb. 4.34).



Abb. 4.34 Die konstitutive Sekretion von IFNy wird durch EBAG9 nicht beeinflußt.

Wie in Abb. 4.33 beschrieben, wurde die Sekretion von CD8⁺-T-Zellen durch Quervernetzung des T-Zellrezeptors mit anti-CD3 ϵ -Antikörpern induziert. Als Kontrolle blieben die Zellen für 4 h unstimuliert (ohne CD3). Nach den angegebenen Zeiten wurde IFN γ im Überstand der T-Zellen mittels ELISA ermittelt. Die Daten zeigen Mittelwerte \pm S.D. von sechs unabhängigen Experimenten.

Ein weiterer Mediator, der von zytotoxischen T-Zellen nach Erkennung ihres Antigens sekretiert wird, ist das Chemokin RANTES. Der Prozeß der RANTES-Freisetzung verläuft dabei sowohl über den regulierten Transportweg aus gespeicherten Vesikeln aber auch über die konstitutive Sekretion von neu-synthetisiertem Protein. Interessanterweise scheint RANTES in Vesikeln gespeichert zu sein, die distinkt von lytischen Granula und auch "konstitutiven" Vesikeln sind (Catalfamo *et al.,* 2004). Die prozentuale Sekretion dieser putativ neuartigen Vesikel durch zytotoxische T-Zellen war durch das Fehlen von EBAG9 allerdings nicht signifikant beeinflußt (Abb. 4.35). Auch die absolute Sekretion von RANTES sowie der zelluläre RANTES-Gehalt war im Vergleich zu Wildtyptieren nicht verändert (Daten nicht gezeigt).



Abb. 4.35 Die Sekretion von RANTES ist bei Abwesenheit von EBAG9 nicht verändert.

Wie in Abb. 4.33 beschrieben, wurde die Sekretion von $CD8^+$ -T-Zellen durch Quervernetzung des T-Zellrezeptors mit anti- $CD3\epsilon$ -Antikörpern stimuliert. Das im Überstand und im Zellysat befindliche RANTES wurde mittels ELISA ermittelt. Dargestellt ist die prozentuale Sekretion von RANTES bezogen auf den zellulären Inhalt zum Zeitpunkt t=0. Die Daten zeigen Mittelwerte \pm S.D. von drei unabhängigen Experimenten.

4.13.2 Die Exozytose inflammatorischer Granula durch Mastzellen ist in den EBAG9-

defizienten Mäusen nicht verändert

In einem zweiten Modellsystem wurde der Einfluß von EBAG9 auf die Ca²⁺-abhängige Freisetzung inflammatorischer Granula von Mastzellen untersucht. Aus dem Knochenmark der Mäuse isolierte, unreife myeloische Vorläuferzellen wurden über vier Wochen in der Gegenwart von IL-3 und SCF hin zu Mastzellen differenziert, so daß am Ende eine über 90% reine Mastzellpopulation vorhanden war (Abb. 4.36).





Die Sekretion der vorgespeicherten Granula aus Mastzellen wurde entweder durch Inkubation mit dem Ca²⁺-Ionophor A23187 oder durch Stimulation des FccR1-Rezeptors induziert (Kap. 3.4.18). Nach Vorinkubation der Mastzellen mit einem DNP-spezifischen IgE-Antikörper, dessen Fc-Teil an den hochaffinen Rezeptor für Immunglobulin E (FccRI) bindet, kann die Exozytose der inflammatorischen Granula durch Zugabe des multivalenten Antigens DNP-BSA induziert werden. Die Bindung von DNP-BSA an die IgE-Antikörper führt dabei zu einer Quervernetzung der IgE-Moleküle und Fcc-Rezeptoren und initiiert die physiologische Signalkaskade zur Ca²⁺-abhängigen Freisetzung der Mastzellvesikel. Markermoleküle dieser Granula sind wiederum die β -Hexosaminidase und Serotonin. Die Abb. 4.37 zeigt, daß im Gegensatz zur Regulierten Exozytose in CD8⁺-T-Zellen die Abwesenheit von EBAG9 keinen Einfluß auf die Ca²⁺-abhängige Sekretion in Mastzellen hat.



Abb. 4.37 Die Deletion von EBAG9 hat keinen Einfluß auf die Ca²⁺-abhängige Exozytose in Mastzellen. (A) Ausgereifte Mastzellen des Knochenmarks wurden ü.N. mit [³H]Serotonin beladen. Am nächsten Morgen wurden die Zellen für 10 min mit dem Ca²⁺-Ionophor A23187 inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung des Serotoningehalts im Zellkulturüberstand mittels Szintillationsmessung. Dargestellt ist die prozentuale Sekretion von [³H]Serotonin bezogen auf den zellulären Inhalt zum Zeitpunkt t=0. (B) Prozentuale Sekretion der β -Hexosaminidase. (C) Prozentuale Sekretion der β -Hexosaminidase nach Quervernetzung des FccRI–Rezeptors mit dem multivalenten Antigen DNP-BSA. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für fünf unabhängige Experimente.

Obwohl EBAG9 als ubiquitär exprimiertes Protein beschrieben ist (Engelsberg *et al.*, 2003; Tsuchiya *et al.*, 2001), konnte in Mastzellen kein EBAG9-Protein in der Westernblot-Analyse detektiert werden (Abb. 4.38). Auch in anderen Geweben wie Niere, Magen, Dick- und Dünndarm konnte kein EBAG9-Protein nachgewiesen werden (Abb. 4.30C). Da das EBAG9-Protein in Mastzellen nicht oder unter der Nachweisgrenze exprimiert wird, kann daher auch die EBAG9-Deletion keinen signifikanten Einfluß auf die Vesikelfreisetzung in Mastzellen haben.



Abb. 4.38 EBAG9 wird nicht in Mastzellen exprimiert.

(A) Westernblot-Analyse von ausgreiften Mastzellen mit dem EBAG9-Antiserum. Als Kontrolle diente das Zellysat von aufgereinigten CD8⁺-T-Zellen aus der Milz. (B) Westernblot-Analyse mit dem EBAG9-Antiserum von Pankreasund Parotis-Zellextrakten. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung wurden die Gele zusätzlich mit einem anti-Actin-Antikörper analysiert.

4.13.2 Die Deletion von EBAG9 führt zu einer Vergrößerung der Zymogengranula im exokrinen Pankreas

Die Westernblot-Analyse verschiedener sekretorisch-aktiver Organe (Abb. 4.38) deutete darauf hin, daß das EBAG9-kodierte Genprodukt eine wichtige Rolle im Rahmen von Vesikeltransport- und Membranfusionsprozessen im Pankreas (Bauchspeicheldrüse) hat. In der Parotis hingegen, einem ähnlich polarisierten Drüsengewebe, konnte kein EBAG9-Protein detektiert werden. Die morphologische Analyse der Bauchspeicheldrüsen in der Elektronenmikroskopie (in Zusammenarbeit mit Dr. Bettina Erdmann, MDC, Berlin) zeigte, daß die Zymogengranula der EBAG9-defizienten Mäuse deutlich vergrößert waren (Abb. 4.39A). Die Bestimmung der Vesikeldurchmesser ermöglichte es, die Volumenzunahme der Vesikel zu bestimmen (Abb. 4.39B). Im Vergleich zu Wildtyptieren (V = $0.135 \ \mu m^3$) waren die Granula der EBAG9-deletierten Mäuse um $\approx 60\%$ vergrößert (V = 0.212 µm³). Diese Beobachtung legt eine Rolle von EBAG9 im Verlauf der Vesikelbiogenese oder -reifung nahe.



Abb. 4.39 Die Deletion von EBAG9 führt zu einer Vergrößerung der Zymogengranula im exokrinen Pankreas. (A) Elektronenmikroskopische Aufnahme von repräsentativen Ausschnitten des Pankreas. Vor Entnahme der Bauchspeicheldrüsen wurden die Tiere ü.N. ohne Futter gehalten. (B) Verteilung der Vesikelgröße der Zymogengranula im exokrinen Pankreas. Die Ergebnisse zeigen die durchschnittlichen Durchmesser der Zymogengranula von jeweils vier Tieren pro Gruppe (EBAG9 +/+: n \approx 1800 und EBAG9 -/-: n \approx 1700 Vesikel).