

5. Diskussion

Um Einblicke in die weitgehend ungeklärte physiologische Funktion von EBAG9 zu erhalten, sollten im Rahmen dieser Doktorarbeit EBAG9-interagierende Proteine isoliert werden. Durch die Identifizierung von Snapin, einem modulatorischen Molekül im Rahmen der Ca^{2+} -regulierten Exozytose in neuronalen und chromaffinen Zellen, konnte EBAG9 in einen funktionellen Zusammenhang mit Vesikelkreisläufen in eukaryotischen Zellen gebracht werden. Die physiologische Relevanz von EBAG9 wurde anschließend in Überexpressionsmodellen *in vitro* und im Kontext des Gesamtorganismus durch die konstitutive Deletion von EBAG9 in der Maus analysiert.

5.1 Charakterisierung der Snapin-EBAG9-Assoziation

Snapin wurde als stärkster Interaktionspartner von EBAG9 im Hefe-2-Hybrid-System identifiziert. Die direkte und spezifische Interaktion von EBAG9 mit Snapin konnte im Hefesystem und mit Hilfe von verschiedenen GST-Bindungsstudien und Koimmunpräzipitationsexperimenten verifiziert werden (Tab. 4.1 und 4.2; Abb. 4.2, 4.3, 4.4 und 4.5). Bei den gewählten experimentellen Bedingungen gingen EBAG9 und auch Snapin keine artifiziellen Assoziationen mit irrelevanten Proteinen ein, was für die Spezifität der EBAG9-Snapin-Interaktion spricht. Die Gelfiltration von PC12-Zellextrakten zeigte, daß EBAG9 und Snapin in Proteinkomplexen mit einem hohen Molekulargewicht (> 440 kD) vorkommen (Abb. 4.6), was die Vermutung nahelegt, daß EBAG9 und Snapin auch *in vivo* eine Interaktion eingehen. Zusätzlich lag Snapin in einem 66-98 kD-großen Proteinkomplex vor und könnte die Assoziation von Snapin mit monomeren (≈ 60 -100 kD) bzw. oligomeren (> 230 kD) SNARE-Komplexen widerspiegeln (Brunger 2001; Kubista *et al.*, 2004; Lawrence und Dolly 2002a; Lawrence und Dolly 2002b; Tokumaru *et al.*, 2001). Das Elutionsprofil von Snapin steht dabei im Einklang mit Untersuchungen einer anderen Arbeitsgruppe, die die Kofraktionierung von Snapin mit dem BLOC-1-Komplex (*biogenesis of lysosome-related organelle complex-1*) in einem Größenbereich von 600 kD beobachten konnte (Starcevic und Dell'Angelica 2004). Ein *in vivo*-Nachweis der EBAG9-Snapin-Assoziation durch die Koimmunpräzipitation beider Proteine aus nativen Geweben konnte aus technischen Gründen leider nicht geführt werden, da weder das endogen exprimierte EBAG9-Molekül noch das Snapinprotein mit den zurzeit erhältlichen Antikörpern effizient immunpräzipitiert werden können (Daten nicht gezeigt).

Die GST-Bindungsstudien sowie die Koimmunpräzipitationsexperimente beider Proteine aus HEK293-Zellen (Abb. 4.3, 4.5, 4.7 und 4.8) deuteten auf eine transiente Interaktion hin. Die

Quantifizierung der EBAG9-Snapin-Komplexe im Vergleich zu der im Zellysat vorhandenen Gesamtmenge beider Proteine zeigte, daß ca. 8% der Proteine im Komplex vorliegen (Rüder *et al.*, 2005). Dieser Prozentsatz korreliert mit der Anzahl der fusionskompetenten SNARE-Komplexe in neuronalen Zellen (4 - 5%), und könnte die Rolle von Snapin im späten Verlauf der Neuroexozytose nach Ausbildung des SDS-resistenten, exozytosekompetenten SNARE-Komplexes reflektieren (Chheda *et al.*, 2001; Ilardi *et al.*, 1999; Matveeva *et al.*, 2001; Thakur *et al.*, 2004). Werden EBAG9 und Snapin dagegen im zellfreien System (Retikulozytenlysat) translatiert, deuten die Konkurrenzexperimente mit SNAP25 und SNAP23 auf eine 1:1-Stöchiometrie für die EBAG9-Snapin-Assoziation hin (Abb. 4.23). Die Diskrepanz zwischen GST-Pull-down- bzw. Koimmunpräzipitationsexperimenten und den Resultaten unter Verwendung von *in vitro* translatiertem EBAG9 und Snapin könnte mehrere Gründe haben: (1) Rekombinante Proteine entsprechen in ihrer Konformation nicht zwangsläufig dem nativen Zustand und dieser Umstand könnte zur verminderten Bindungsfähigkeit führen. (2) Proteine mit geringer Abundanz können aus kinetischen Gründen in Pull-down- oder Koimmunpräzipitationsexperimenten nicht effizient gebunden werden. (3) Auch können Komplexe mit anderen Proteinen, die bereits in der Zelle vorliegen, die Menge des frei verfügbaren Interaktionspartners deutlich herabsetzen. Gleiches gilt für artifiziell entstehende Komplexe, die während der Zellsolubilisierung entstehen. In den Konkurrenzexperimenten wurden EBAG9 und Snapin in Retikulozytenlysat translatiert, welches eukaryotische Bedingungen für Proteintranslation, -faltung, Signalpeptidabspaltung sowie N-Glykosylierungen liefert und damit ein natives Milieu für die Analyse von Protein-Protein-Interaktionen darstellt. Ein bedeutender Vorteil bei der Verwendung dieses zellfreien Systems ist aber, daß störende Einflüsse durch andere Proteine auf Protein-Protein-Assoziationen vermieden werden. Dieser Umstand ist möglicherweise die Ursache für die sehr unterschiedlichen Ergebnisse bei der Ermittlung der Stöchiometrie der EBAG9-Snapin-Assoziation.

Die Analyse der subzellulären Verteilung von EBAG9 und Snapin in HEK293-Zellen zeigte, daß Snapin vorwiegend im Zytosol lokalisiert ist, aber zudem mit EBAG9 partiell an perinukleären Membranen im Golgi-Apparat kolokalisiert (Abb. 4.11). Dies ist ein weiterer Hinweis für eine *in vivo*-Assoziation von EBAG9 und Snapin. Da die Kolokalisation der membranassoziierten Population der Snapinmoleküle mit dem Golgi-Markerprotein β 1,4-Galaktosyltransferase und EBAG9 aber nur partieller Natur ist, kann spekuliert werden, daß Snapin noch in anderen Zellorganellen, wie beispielsweise Endosomen, Lysosomen oder dem ER lokalisiert ist. Diese Resultate bestätigen die Beobachtungen von Buxton *et al.* (2003) und Vites *et al.* (2004), daß die

Lokalisation von Snapin nicht auf synaptische Vesikel beschränkt ist, wie es ursprünglich publiziert wurde (Ilardi *et al.*, 1999).

Die Assoziation von Snapin mit dem Membranpool kann durch Waschen mit 1 M Harnstoff oder 1 M Natriumchlorid aufgehoben werden, was darauf hinweist, daß Snapin über andere Proteine und nicht über eine putative Transmembrandomäne am N-Terminus an die Membran gebunden ist (Buxton *et al.*, 2003; Ilardi *et al.*, 1999). Diese These stimmt mit der Beobachtung überein, daß Snapin über posttranslationale Mechanismen zu mikrosomalen Membranen rekrutiert wird (Abb. 4.12).

5.2 EBAG9 ist über Palmitinsäurereste peripher an Membranen assoziiert

Die essentiellen Proteinbereiche für die EBAG9-Snapin-Assoziation konnten durch Deletionsanalysen bestimmt werden. Dabei zeigte sich, daß die putative Transmembrandomäne (AS 8-27) von EBAG9 mit der N-terminalen *coiled-coil*-Domäne (H1) von Snapin interagiert (Abb. 4.7 und 4.8). EBAG9 konkurriert damit also nicht mit SNAP25 oder SNAP23 um denselben Aminosäurebereich im Snapin-Molekül, da beide t-SNAREs jeweils an die C-terminale helikale Domäne (H2) von Snapin binden (Buxton *et al.*, 2003; Ilardi *et al.*, 1999). Obwohl kürzlich gezeigt werden konnte, daß Synaptotagmin I mit seiner Transmembrandomäne direkt an die *coiled-coil*-Domäne von VAMP2 bindet (Fukuda 2002), ist eine Protein-Protein-Assoziation über eine Transmembrandomäne und eine *coiled-coil*-Domäne sehr selten. Daher wurde überprüft, ob der für die Membranverankerung von EBAG9 verantwortliche Aminosäureabschnitt (AS 8-27) eine membrandurchspannende Domäne ist oder alternativ eine periphere Membranassoziation des EBAG9-Moleküls gewährleistet (Abb. 5.1).

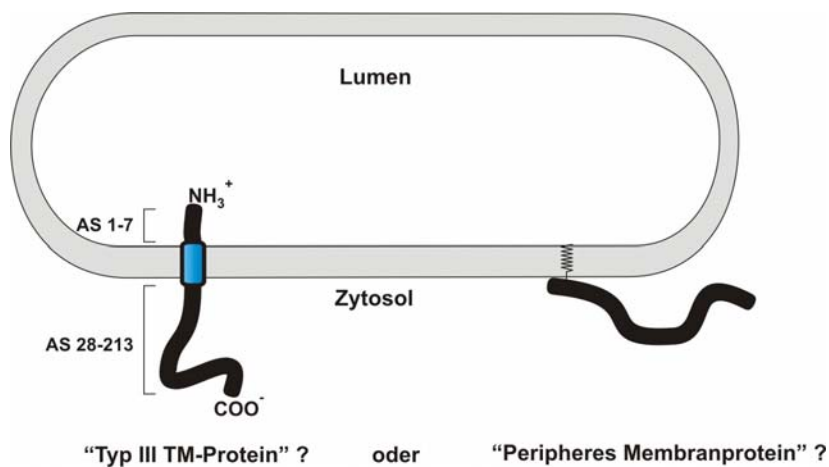


Abb. 5.1 Membrantopologie von EBAG9

Mögliche Membranorientierung des EBAG9-Proteins (nach Engelsberg *et al.*, 2003). TM, Transmembran.

Eine zytosolorientierte, periphere Membranassoziation könnte dabei über eine hydrophobe Modifizierung mit Fettsäuren erfolgen. Die verschiedene Formen der hydrophoben Proteinmodifikationen umfassen die Myristylierung, Isoprenylierung und S-Acylierung (Magee und Courtneidge 1985; Wilcox *et al.*, 1987). Die Protein-S-Acylierung, die nach der am häufigsten in dieser Verknüpfung vorkommenden Fettsäure auch Palmitoylierung genannt wird, ist einzigartig unter den hydrophoben Lipidmodifikationen von Proteinen, da sie reversibel ist und dadurch das Potential hat, regulierbar zu sein (Mumby 1997). Die Prenylierung und auch die Myristylierung sind dagegen irreversibel. Während die Myristylierung durch kovalente Verknüpfung über Amidbindungen an N-terminale Glycinreste und die Prenylierung über eine stabile Thioetherbindung an Cysteinreste erfolgt, ist die Palmitinsäure kovalent über Thioesterbindungen mit Cysteinresten in der Polypeptidkette verknüpft. Durch Behandlung mit Hydroxylamin bei neutralem pH kann die über eine Thioesterbindung verknüpfte Fettsäure abgespalten werden. Die sehr selten vorkommende Oxyesterbindung der Palmitinsäure mit Serinen und Threoninen kann dagegen nicht durch Hydroxylamin entfernt werden (Magee *et al.*, 1984). Die metabolische Markierung mit [³H]-markierter Palmitinsäure sowie die Analyse der subzellulären Lokalisation einer Cystein-defizienten EBAG9-Mutante zeigte, daß die drei Cysteinreste (Position 12, 14 und 27) im EBAG9-Molekül essentiell für die Membranassoziation von EBAG9 sind (Abb. 4.9 und 4.10). Diese Beobachtungen lassen vermuten, daß EBAG9 kein Transmembranprotein ist, sondern als palmitoyliertes Protein peripher in Membranen verankert ist. Es ist allerdings nicht auszuschließen, daß die Isoprenylierung von einzelnen Cysteinresten zusätzlich zur Membranverankerung von EBAG9 beitragen könnte. Diese periphere Membrantopologie des EBAG9-Proteins würde eine strukturelle Erleichterung für die EBAG9-Assoziation mit der N-terminalen *coiled-coil*-Domäne von Snapin gewährleisten.

5.3 EBAG9 unterliegt einer dynamischen Umverteilung in neuroendokrinen Zellen

Ein detailliertes Wissen über die subzelluläre Lokalisation von Proteinen ist eine Grundvoraussetzung, um Hypothesen über die Funktion dieses Proteins zu formulieren. Da Snapin eine regulatorische Funktion im Rahmen der Ca²⁺-regulierten Exozytose von SSV und LDCV einnimmt, wurde die subzelluläre Lokalisation von EBAG9 in der neuroendokrinen Zelllinie PC12 untersucht, die als Modellsystem für Ca²⁺-abhängige Freisetzung von LDCV akzeptiert ist. Die Zugabe von NGF und die damit einhergehende Differenzierung der PC12-Zellen von proliferierenden in post-mitotische, neuritische Zellen (Greene und Tischler 1976) führte zu einer

Umverteilung von EBAG9 von perinukleären Membranen hin zu vesikulären Strukturen in den Neuriten und nahe der Plasmamembran, wo EBAG9 mit den sekretorischen Vesikelmarkern von SSV und LDCV (Synaptophysin und VAMP2) kolokalisierte (Abb. 4.13 und 4.14). Eine derart dynamische Umverteilung eines Proteins im Verlauf der neuronalen Differenzierung ist sehr selten. In diesem Zusammenhang können nur Lokalisationstudien von Synaptotagmin IV (Syt IV) und Hrs (*hepatocyte growth factor-regulated kinase substrate*) herangezogen werden (Fukuda *et al.*, 2003; Kwong *et al.*, 2000). Beide Proteine sind regulatorische Moleküle der Exozytose von LDCV in PC12-Zellen und werden wie EBAG9 durch die NGF-induzierte Differenzierung von intrazellulären Kompartimenten hin zu sekretorischen Vesikeln sortiert. Am besten untersucht ist der Transport von Syt IV. Syt IV wird in PC12-Zellen nach der Translation im ER zunächst zum Golgi-Apparat transportiert und dort festgehalten. Erst die NGF-induzierte Differenzierung der Zellen führt zu einer Umverteilung von Syt IV hin zu fusionskompetenten LDCV (Fukuda *et al.*, 2003; Fukuda und Yamamoto 2004; Ibata *et al.*, 2000).

Wie könnte die Umverteilung von EBAG9 im Verlauf der Differenzierung von PC12-Zellen reguliert sein? NGF gehört zusammen mit BDNF (*brain derived neurotrophic factor*), NT-3 (Neurotrophin-3), NT-4 und NT-5 zur Familie der Neurotrophine (Nervenwachstumsfaktoren). Diese spielen bei der Embryonalentwicklung und der Regulation von postembryonalen Differenzierungs- und Reparaturmechanismen des zentralen und peripheren Nervensystems eine entscheidende Rolle. Bevorzugter Rezeptor für NGF ist die Rezeptortyrosinkinase TrkA (Huang und Reichardt 2003). Nach Bindung von NGF dimerisieren die Trk-Rezeptoren, wodurch sie sich gegenseitig an mehreren Tyrosinen in der intrazellulären Domäne phosphorylieren. Diese Phosphotyrosine dienen dann als Anker für eine Reihe intrazellulärer Signalproteine. Die Bindung von NGF an TrkA führt dabei zur Aktivierung einer Reihe kleiner G-Proteine, wie Ras, Raf sowie Mitgliedern der Cdc-42-Rac-Rho-Familie. Weiterhin induziert die Ligand-Rezeptor-Interaktion aber auch Signalwege, bei denen ERK/MAP-Kinasen, Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase) und der Phospholipase C γ einbezogen sind.

Proteinphosphorylierungen stellen einen entscheidenden Mechanismus der Zelle dar, Stoffwechselwege genau zu regulieren (Graves und Krebs 1999). Auch bei der Regulation der synaptischen Transmission und allgemein der Exozytose hat die Phosphorylierung von SNARE-Molekülen und anderer regulatorischer Moleküle eine essentielle Rolle, wie es u.a. Untersuchungen zur Phosphorylierung von Synaptotagmin, Rabphilin 3A, VAMP, Syntaxin, SNAP25 und SNAP23 gezeigt haben (Bennett *et al.*, 1993; Cabaniols *et al.*, 1999; Fykse *et al.*, 1995; Nagy *et al.*, 2004; Nielander *et al.*, 1995; Risinger und Bennett 1999). Da die durch NGF-induzierte Signalkaskade zur

Aktivierung einer Vielzahl von Proteinkinasen (u.a. PKA und PKC) führt und EBAG9 als Substrat der PKA, PKC und CK II identifiziert werden konnte (Abb. 4.22; Daten nicht gezeigt), wäre eine Regulation der EBAG9-Lokalisation über Phosphorylierung denkbar. Einen solchen Einfluß der Phosphorylierung auf die subzelluläre Lokalisation wurde auch für Syt IV, SNAP25, den Acetylcholintransporter oder Synaptotagmin IX beschrieben (Fukuda und Yamamoto 2004; Haberman *et al.*, 2005; Kataoka *et al.*, 2000; Krantz *et al.*, 2000). Da der Austritt von Proteinen aus dem Golgi-Apparat und allgemein der anterograde Transportweg vom ER zur Plasmamembran durch die posttranslationale Anheftung von Palmitinsäureresten reguliert wird, könnte alternativ die dynamische, reversible Palmitoylierung von einzelnen Cysteinresten im EBAG9-Molekül die Sortierung hin zu sekretorischen Vesikeln induzieren (Apolloni *et al.*, 2000; Bijlmakers und Marsh 2003; Choy *et al.*, 1999; Kanaani *et al.*, 2004; Qanbar und Bouvier 2003).

Da NGF auch auf nicht-neuronale Zellen wirkt, im besonderen auf Zellen des hämatopoetischen Systems, wie Mastzellen und Lymphozyten, wäre die Analyse der subzellulären Verteilung von EBAG9 in diesen Zelltypen von besonderem Interesse (Levi-Montalcini *et al.*, 1995; Levi-Montalcini *et al.*, 1996; Vega *et al.*, 2003).

5.4 EBAG9 ist ein spezifischer Regulator der LDCV-Exozytose

Die Identifikation von Snapin als Interaktionspartner von EBAG9 und die vesikuläre Lokalisation von EBAG9 in differenzierten PC12-Zellen legte eine Rolle von EBAG9 bei der Regulierten Membranfusion nahe. In der Tat führte die Überexpression von EBAG9 zu einer deutlichen Verringerung der Exozytoserate von NPY und Norepinephrin in PC12-Zellen unter depolarisierenden Bedingungen (Abb. 4.15 und 4.16). Auch die Verwendung eines Fragmentes von EBAG9, das nur die Snapin-Bindedomäne beinhaltet (AS 1-30), war in der Lage, die Exozytose von LDCV in PC12-Zellen zu inhibieren. Wahrscheinlich konkurriert bei diesem dominant-negativen Ansatz dieses EBAG9-Fragment mit dem endogenen EBAG9-Protein um die Bindung an Snapin. Bei Koexpression von Snapin erlangt die Exozytose das ursprüngliche Niveau zurück und läßt damit vermuten, daß die inhibitorische Wirkung von EBAG9 auf die Exozytose von LDCV alleine durch die Assoziation mit Snapin vermittelt wird.

Obwohl die Rolle von Snapin im Rahmen der synaptischen Vesikelexozytose noch nicht vollständig aufgeklärt ist (s.a. Kap. 1.8.5)(Chheda *et al.*, 2001; Ilardi *et al.*, 1999; Thakur *et al.*, 2004), wäre eine inhibitorische Rolle bei der Freisetzung von SSV in hippokampalen Neuronen sehr wahrscheinlich. Unerwarteterweise hatte die Überexpression von EBAG9 in exzitatorischen/glutamergen, hippokampalen Neuronen keinen Effekt auf die basalen Parameter der synaptischen

Transmission (Rüder *et al.*, 2005). Die elektrophysiologischen Untersuchungen wurden dabei in Kooperation mit Ignacio Delgado-Martinez (Abteilung Membranbiophysik, Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen) durchgeführt. Weder die EPSC-Amplitude noch die Größe des akut freisetzbaren Vesikelpools (RRP) oder die Depressionsrate der EPSC-Amplituden bei hochfrequenter, repetitiver Stimulierung waren in EBAG9-überexprimierenden hippocampalen Neuronen statistisch signifikant verändert (Rüder *et al.*, 2005).

Zwar gleichen sich die Mechanismen der Exozytose von SSV und LDCV in vielen Aspekten, wie etwa der involvierten SNARE-Proteine SNAP25, VAMP2 und Syntaxin2 sowie der Ca^{2+} -Sensorfamilie der Synaptotagmine, sind aber aufgrund spezifischer regulatorischer Proteine in einigen wesentlichen Aspekten sehr unterschiedlich (Burgoyne und Morgan 2003; Geppert und Südhof 1998; Martin 2003; Rettig und Neher 2002). So unterscheiden sich die beiden Vesikeltypen in Morphologie, Ca^{2+} -Sensitivität sowie verschiedenen luminalen und Membranproteinen. Auch ist die Kinetik der Vesikelfreisetzung verschieden. Während SSV innerhalb von Millisekunden nach Ca^{2+} -Einstrom mit der Plasmamembran fusionieren, ist die Kinetik der LDCV-Exozytose um den Faktor 10-20.000x langsamer. Ein weiterer fundamentaler Unterschied zwischen diesen beiden Vesikelarten ist die Vesikelbiogenese und der „Recycling“-Transportweg. Obwohl der Ablauf der Biogenese von SSV noch nicht in allen molekularen Einzelheiten aufgeklärt werden konnte, so zeichnet sich dennoch ab, daß die Proteine der SSV das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) im Zellkörper der Neuronen in sekretorischen Vesikeln des konstitutiven Weges verlassen und durch einen schnellen axonalen Transport zur Synapse gelangen. Reife synaptische Vesikel werden dann durch einige Zyklen konstitutiver Exozytose und „Recycling“ durch ein endosomales Kompartiment gebildet. Über transmitterspezifische Vesikeltransporter werden dabei die Neurotransmitter wie Acetylcholin, Glutamat oder GABA aktiv in das Lumen der Vesikel transportiert. Nach Ende der Exozytose werden die SSV lokal in den Nervenendigungen (*nerve terminals*) über ein endosomales Kompartiment regeneriert. Unreife LDCV hingegen knospen vom TGN, wo sie auch mit ihrem Inhalt, Neuropeptiden oder modulatorischen biogenen Aminen beladen werden. Nach der Ca^{2+} -abhängigen Fusion mit der Plasmamembran werden die LDCV endosomenunabhängig über den Golgi-Apparat regeneriert (Hannah *et al.*, 1999; Südhof 2004).

Bisher konnten allerdings nur wenige Proteine identifiziert werden, welche selektiv im Rahmen des Vesikelzyklus von LDCV oder SSV agieren. Eines der wenigen Beispiele ist das Regulatorprotein CAPS-1, welches nur essentiell für das „priming“ von LDCV ist und nicht von SSV (Berwin *et al.*, 1998; Grishanin *et al.*, 2004; Tandon *et al.*, 1998). Möglicherweise ist nun EBAG9 solch ein neues Molekül, welches eine spezifische Rolle im Verlauf des Vesikelzyklus von LDCV einnimmt. Um

diese außerordentliche Spezifität des EBAG9-Moleküls im Rahmen der Vesikelfreisetzung zu überprüfen, wäre es wichtig, elektrophysiologische Experimente in verschiedenen Hirnregionen bzw. mit neuroendokrinen Zellen auf dem genetischen Hintergrund der EBAG9-*Knockouts* zu wiederholen.

Die Fähigkeit von EBAG9, trunkierte O-Glykane in HEK293-Zellen zu generieren, läßt vermuten, daß EBAG9 eine allgemeinere Rolle im sekretorischen Transportweg haben könnte (Engelsberg *et al.*, 2003). Die korrekte Glykosylierung ist eine strukturelle Voraussetzung für die Proteinstabilität und Aktivität einer großen Anzahl von Molekülen und beeinflußt indirekt den Transport von Proteinen zu ihrem jeweiligen Zellkompartiment (Hanover 2001; Rudd *et al.*, 1995; Van den Steen *et al.*, 1998). Da allerdings sowohl die EBAG9-Überexpression in Zelllinien als auch die Deletion des EBAG9-Moleküls in der Maus keinen ubiquitären Einfluß auf die N- oder O-Glykosylierung von Proteinen haben, scheint die modulatorische Aktivität auf die O-Glykosylierung auf wenige oder ein einziges, bisher nicht identifiziertes Protein- oder Lipidrückgrat beschränkt zu sein (Daten nicht gezeigt; Abb. 4.17 und 4.18). Damit im Einklang stehen die Beobachtungen des Vesikeltransports der schweren Kette der MHC Klasse I-Moleküle, von Cathepsin D sowie α 1-Antitrypsin. Diese intrazellulären, konstitutiven Transportwege konnten nicht durch die Überexpression von EBAG9 in Kurzzeit-Transportassays beeinflußt werden (Abb. 4.17-4.19). Vielmehr scheint die EBAG9-vermittelte Inhibition der LDCV-Exozytose und die Generierung von trunkierten O-Glykanen über unabhängige Mechanismen, abhängig vom Zelltyp zu erfolgen, da die Überexpression von EBAG9 in PC12-Zellen nicht wie in Zellen ohne den regulierten Exozytoseapparat (HEK293-, HeLa- und MCA-205-Zellen) zu einer Generierung der tumorassoziierten O-Glykanantigene Tn und TF führt (Daten nicht gezeigt; Engelsberg *et al.*, 2003). Diese Beobachtung könnte möglicherweise die Unterschiede der Organisation des sekretorischen Stoffwechselweges zwischen Zelltypen, in denen regulierte und konstitutive Exozytose koexistieren (PC12-Zellen), und solchen Zellen, die lediglich eine konstitutive Exozytose aufweisen (HEK293-Zellen), widerspiegeln (Khvotchev *et al.*, 2003).

Zusammengefaßt deuten diese Befunde darauf hin, daß EBAG9 im Rahmen der Vesikelexozytose eine spezifische Rolle bei der Ca^{2+} -abhängigen Freisetzung von LDCV hat. Die Freisetzung kleiner, synaptischer Vesikel und die Vesikeltransportmaschinerie des konstitutiven Transportweges scheinen dagegen nicht beeinflußt zu sein. Die EBAG9-vermittelte Inhibition der LDCV-Sekretion in PC12-Zellen läßt sich damit nicht auf einen unspezifischen Effekt der Proteinüberexpression zurückführen, der beispielsweise die strukturelle oder funktionelle Integrität des sekretorischen Transportweges stört. Damit reiht sich EBAG9 in eine Reihe von regulatorischen Proteinen im

Rahmen der Regulierten Exozytose ein, wie den Synaptotagminen, Complexin, CSP (cystein spring protein) und auch Snapin, die wie EBAG9 kein Ortholog im Hefesystem haben (Littleton 2000).

5.5 Die molekularen Mechanismen der EBAG9-Funktion im Rahmen der Vesikelexozytose

Ein wichtiger Bestandteil der Regulation der synaptischen Aktivität ist die Phosphorylierung einer Vielzahl von Proteinen, die eine essentielle oder regulatorische Rolle im Rahmen des Transportes und der Exozytose von sekretorischen Vesikeln einnehmen (Evans und Morgan 2003; Turner *et al.*, 1999). Es wurde vorgeschlagen, daß die PKA-abhängige Phosphorylierung von Snapin an Aminosäureposition 50 die Bindungsaffinität der Snapin-SNAP25-Assoziation verstärkt und in einer erhöhten Rekrutierung von Synaptotagmin I zum SNARE-Komplex resultiert (Chheda *et al.*, 2001). Die fundamentale Bedeutung der Snapin-Phosphorylierung zeigen auch die funktionellen Befunde der Expression einer phosphomimetischen Mutante (S50D) in chromaffinen Zellen, die zu einer Steigerung des exozytotischen „burst“, also der Größe des RRP, führt. Da aber die Kinetik der langsamen, verzögerten Freisetzung (*sustained component*) durch die phosphomimetische Snapin-Variante schneller abläuft, ist es unwahrscheinlich, daß diese Effekte alleine auf einer verstärkten Bindung von Synaptotagmin I zum neuronalen SNARE-Komplex beruhen (Chheda *et al.*, 2001). Synaptotagmin I nimmt eine exklusive Rolle bei der Ausreifung und Freisetzung sekretorischer Vesikel des RRP-Pools ein (Geppert *et al.*, 1994b; Voets *et al.*, 2001), daher liegt eine Rolle für Snapin in der Rekrutierung der putativen Ca^{2+} -Sensoren der verzögerten Freisetzungsphase (Synaptotagmin III, VII und IX) oder im Prozeß des „Priming“ nahe (Fukuda *et al.*, 2004; Fukuda *et al.*, 2002b; Südhof 2002; Sugita *et al.*, 2002).

Die signifikante Herabsetzung ($\approx 50\%$) der basalen Snapin-Phosphorylierung durch die transiente Koexpression von EBAG9 in HEK293-Zellen könnte eine mögliche Erklärung für die inhibitorische Aktivität des EBAG9-Moleküls im Prozeß der LDCV-Membranfusion sein (Abb. 4.21). Die Reduktion der Phosphorylierung von Snapin durch EBAG9 sollte in einer verminderten Rekrutierung von Synaptotagmin zum synaptischen SNARE-Komplex resultieren (Chheda *et al.*, 2001). Unerwarteterweise konnte das basale Niveau der Snapin-Phosphorylierung nicht durch eine Aktivierung der PKA durch Forskolin verstärkt werden. Obwohl im Snapin-Molekül mehrere potentielle PKC-Konsensussequenzen liegen, konnte die Snapin-Phosphorylierung auch nicht durch Phorbolster erhöht werden. Auch die *in vitro*-Phosphorylierung von rekombinant exprimiertem Snapin durch die PKA war sehr ineffizient (Abb. 4.22). Diese Diskrepanz zu Untersuchungen von Chheda *et al.* (2001) kann vielfältige Ursachen haben: zunächst wurde in der vorliegenden Arbeit

nicht das cAMP-Analogon BIMP als Induktor genutzt, welches *in vivo* eine stärkere Aktivierung der PKA als Forskolin induziert (Sandberg *et al.*, 1991). Zum anderen wurden keine „back-phosphorylation“-Experimente durchgeführt. Der wohl entscheidende Unterschied aber ist, daß im Vergleich zu den vorherigen Untersuchungen nicht die Phosphorylierung des im nativen Gewebe endogen exprimierten Snapin-Moleküls untersucht wurde. Die transiente Expression von Snapin in der nicht-neuronalen Zelllinie HEK293 spiegelt dabei möglicherweise nicht die physiologischen Bedingungen wider und könnte die Phosphorylierungskapazität der Zelle überfordern (Thakur *et al.*, 2004). Alternativ wäre es denkbar, daß die Phosphorylierung in einer zelltypspezifischen Weise reguliert ist und daher nicht in der nicht-neuronalen Zelllinie HEK293 und der neuroendokrinen PC12-Zelllinie direkt vergleichbar ist.

Im Einklang mit der beobachteten Verringerung der Snapin-Phosphorylierung führt die Anwesenheit von EBAG9 im zellfreien System, dem Retikulozytenlysat, zur funktionellen Störung der Snapin-Bindung an seinen Interaktionspartner SNAP25 (Abb. 4.23). Die maximale Inhibition der Snapin-SNAP25-Assoziation wurde dabei bei einem molaren Verhältnis von 1:1 für EBAG9 und Snapin erreicht. Es ist nicht bekannt, ob das Retikulozytenlysat Kinasen enthält und ob solche Kinasen aktiv sind. Daher kann in diesem kompetitiven Bindungsexperiment unter Verwendung von *in vitro* translatierten Proteinen nicht eindeutig geklärt werden, ob die Inhibition durch eine Herabsetzung der Snapin-Phosphorylierung oder durch eine sterische Beeinflussung der Snapin-SNAP25-Bindung durch EBAG9 hervorgerufen wird. Gleichermaßen inhibiert EBAG9 auch die Assoziation von Snapin mit dem ubiquitären t-SNARE-Homolog SNAP23 und legt damit eine Rolle für EBAG9 und Snapin im Rahmen der Ca^{2+} -abhängigen Vesikelexozytose in einer weitaus größeren Anzahl von Zelltypen nahe (s.a. Kap. 5.6).

Zusammengefaßt läßt sich aus den in dieser Arbeit gewonnenen Daten die Funktion von EBAG9 im Rahmen der Ca^{2+} -abhängigen Exozytose in neuroendokrinen Zellen durch folgendes Modell beschreiben. Das Erreichen eines Aktionspotentials führt zur Depolarisation der präsynaptischen Plasmamembran und damit zu einem Öffnen von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen. Der Einstrom von extrazellulären Ca^{2+} -Ionen in das Zytosol der Zelle ermöglicht die Bindung von Ca^{2+} -Ionen an das Ca^{2+} -Sensormolekül Synaptotagmin, wodurch Synaptotagmin an den synaptischen SNARE-Komplex - bestehend aus SNAP25, Syntaxin1 und VAMP2 – rekrutiert wird und durch die Wechselwirkung mit Phospholipiden in die Plasmamembran eintaucht. Die Bindung von Synaptotagmin an den SNARE-Komplex und an Phospholipide ist dabei unerlässlich für den finalen Schritt der Vesikelfreisetzung, der die Ca^{2+} -abhängige Membranfusion der akut freisetzbaren Vesikel des RRP umfaßt (Südhof 2004; Tucker und Chapman 2002). Das SNARE-assoziierte

Protein Snapin interagiert mit dem t-SNARE-Molekül SNAP25 und verstärkt dadurch die Rekrutierung von Synaptotagmin zum SNARE-Komplex (Ilardi *et al.*, 1999). Die Phosphorylierung von Snapin erhöht die Affinität der Interaktion zwischen Snapin und SNAP25, stabilisiert dadurch zusätzlich den SNARE-Synaptotagmin-Komplex und führt zu einer Vergrößerung des RRP (Abb. 5.2A)(Chheda *et al.*, 2001).

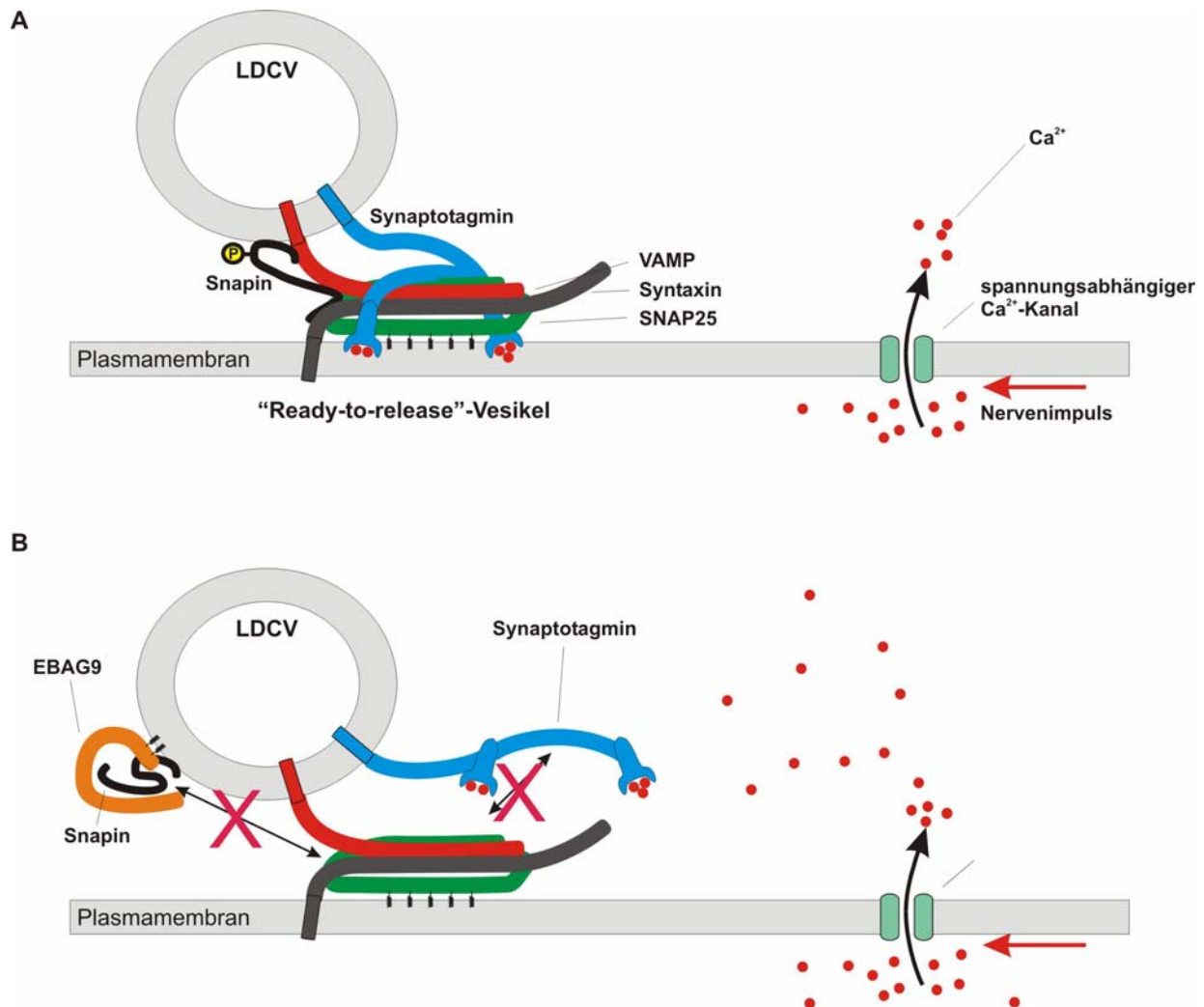


Abb. 5.2 Ein mögliches Modell für die Funktion von EBAG9 in neuroendokrinen Zellen.

Die Überexpression von EBAG9 führt zum einen zu einem reduzierten Phosphorylierungsgrad von Snapin und zum anderen zu einer verminderten Bindung von Snapin an SNAP25. Folglich kann eine reduzierte Rekrutierung von Synaptotagmin zum synaptischen SNARE-Komplex erwartet werden, was zu einer verringerten Exozytoserate von LDCV in PC12-Zellen führt (Abb. 5.2B). Ein Teil der EBAG9-Proteinpopulation ist in differenzierten PC12-Zellen peripher mit LDCV assoziiert und wäre damit prädestiniert, an diesem späten Schritt des Vesikelzyklus einzugreifen. Alternativ

wäre es denkbar, daß der im perinukleären Golgi-Bereich befindliche Anteil der EBAG9-Moleküle als Anker für Snapin fungiert und so die Verfügbarkeit von Snapin für den Prozeß der Membranfusion limitiert. Eine dritte Möglichkeit wäre, daß der Golgi-Pool als Reservoirpool fungiert und nur unter bestimmten Bedingungen zu sekretorischen Granula rekrutiert wird.

5.6 Ein Ausblick: Weitere mögliche Funktionen von EBAG9 und Snapin

5.6.1 SNAP23- und SNAP25-abhängige Fusionsprozesse

SNAP25 ist nicht nur Bestandteil des exozytoserelevanten SNARE-Komplexes in neuronalen und chromaffinen Zellen, sondern auch in Zellen endokrinen Ursprungs, wie den Pankreas β -Inselzellen (Sadoul *et al.*, 1995). Da der molekulare Mechanismus der Ca^{2+} -abhängigen Freisetzung in β -Zellen der synaptischen Exozytose in Bezug auf die involvierten SNAREs und der Schlüsselrolle des Ca^{2+} -Sensors Synaptotagmin gleicht, wäre eine Funktion von EBAG9 und Snapin in der Regulierten Exozytose von Insulin aus den β -Inselzellgranula sehr wahrscheinlich.

Snapin geht nicht nur eine Assoziation mit dem neuronalen t-SNARE-Molekül SNAP25 ein, sondern auch mit dem ubiquitär exprimierten Homolog SNAP23 und kann einen ternären Komplex mit Syntaxin4 und SNAP23 ausbilden (Buxton *et al.*, 2003). SNAP23 ersetzt in einer Vielzahl nicht-neuronaler Zellen sein Homolog SNAP25 als t-SNARE-Molekül im SNARE-Komplex. Die Ca^{2+} -regulierte Freisetzung von Effektor- oder Signalmolekülen ist ein universeller Mechanismus aller Zellen. Im Vergleich zur Exozytose von SSV und LDCV neuronaler oder chromaffiner Zellen sind die zellulären und molekularen Mechanismen der Exozytose in Zellen nicht-neuronalen Ursprungs nicht in diesem Detail bekannt (Burgoyne und Morgan 2003). Die ternären SNARE-Komplexe, bestehend aus SNAP23 und verschiedenen Isoformen der Synaptobrevin- und Syntaxin-Familie, katalysieren die Ca^{2+} -induzierte Exozytose sekretorischer Vesikel nach Erreichen eines für jede Zellart spezifischen Stimulus: (1) die Vesikelfusion von konventionellen Lysosomen mit der Plasmamembran in nicht-sekretorisch aktiven Zellen zur Membranregeneration nach einer mechanischen Verwundung oder zur Abwehr einer Bakterieninfektion (Jaiswal *et al.*, 2002; Roy *et al.*, 2004), (2) die Freisetzung von *dense-core* Vesikeln in Thrombozyten (Chen *et al.*, 2000), (3) die Ca^{2+} -abhängige Akrosom-Reaktion (Tomes *et al.*, 2002), (4) die Exozytose in polarisierten Epithelien (Huet *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2002; Low *et al.*, 1998), (5) Zymogenfreisetzung im exokrinen Pankreas (Huang *et al.*, 2001) und (6) die Freisetzung sekretorischer Lysosomen in Zellen der hämatopoetischen Zellreihe. Zu den hämatopoetischen Zelltypen zählen Mastzellen, T-

und NK-Zellen sowie neutrophile Granulozyten (Das *et al.*, 2004; Martin-Martin *et al.*, 2000; Vaidyanathan *et al.*, 2001). Da EBAG9 wie auch Snapin in einer großen Anzahl von Zelltypen exprimiert wird und EBAG9 die Assoziation von Snapin mit dem t-SNARE-Molekül SNAP23 verhindert, wäre für EBAG9 eine ubiquitäre Rolle im Rahmen der Ca²⁺-abhängigen Sekretion denkbar.

5.6.2 Rezeptorexpression und cAMP-Signaling

Weitere beschriebene Interaktionen von Snapin, u.a. mit TRPV-1 (*transient receptor potential vanilloid-1*) und Adenylatcyclase VI, deuten darauf hin, daß Snapin möglicherweise noch indirekte, SNAP25-unabhängige Rollen in der Regulierten Exozytose einnehmen könnte. In einer Studie konnte gezeigt werden, daß Snapin die SNARE-abhängige Plasmamembranexpression des Vanilloidrezeptors (TRPV-1) reguliert. Dieser erfüllt die Funktion eines Kationenkanals für Ca²⁺- und Mg²⁺-Ionen und ist für die Wahrnehmung von hitze- oder entzündungsinduzierten Schmerzen verantwortlich (Caterina *et al.*, 1997; Nilius *et al.*, 2004). Eine zentrale Rolle für die Regulation von TRPV-1 nimmt die PKC ein. Die PKC hat dabei zwei Effekte auf die Aktivität von TRPV-1, zum einen sensitiviert die PKC-abhängige Phosphorylierung den Rezeptor und zum anderen verstärkt die PKC die Exozytose von TRPV-1. Die Überexpression von Snapin führt teilweise zur Aufhebung der PKC-Wirkung auf den Vanilloidrezeptor und somit indirekt zur verringerten Zelloberflächenexpression des Rezeptors (Morenilla-Palao *et al.*, 2004). Dabei erscheint Snapin in diesen Versuchen als ebenso potenter Blocker wie Botulinusneurotoxin A. Somit könnte Snapin auch ein Teil der Signaltransduktionskaskade sein, die zur PKC-abhängigen Aktivierung der SNARE-regulierten Exozytose führt.

Damit im Einklang stehen Beobachtungen einer anderen Arbeitsgruppe, die zeigen, daß Snapin zwar spezifisch die Inhibition der Adenylatcyclase VI durch PKC moduliert, jedoch nicht die basale Aktivität oder die inhibitorischen Effekte von PKA und Ca²⁺-Ionen (Chou *et al.*, 2004). Die Familie der Adenylatcyclaseenzyme ist für die Herstellung des „second messenger“ cAMP verantwortlich, der für die Weiterleitung vieler Hormonsignale und Sinnesreize dient (Skalhegg und Tasken 2000). Des weiteren induziert bzw. verstärkt die intrazelluläre Erhöhung des cAMP-Niveaus die Exozytose von reguliert sezernierten Mediatoren in einer Vielzahl sekretorischer Gewebe, u.a. in der Hypophyse, Pankreas β -Inselzellen, Parotis, neuronalen Zellen, chromaffinen Zellen und auch PC12-Zellen (Carabelli *et al.*, 2003; Chavez-Noriega und Stevens 1994; Fujita-Yoshigaki 1998). Die Adenylatcyclasen werden über positive und negative Regulationsmechanismen mittels verschiedener G-Proteine reguliert. Dabei induziert ein primärer Stimulus, wie die Bindung eines

Neurotransmitters oder Hormons an seinen Rezeptor, den GDP-GTP-Austausch in der α -Untereinheit des G-Proteins, welche anschließend an die Adenylatcyclase bindet und diese aktiviert. Die ubiquitär exprimierte Adenylatcyclase VI zeichnet sich durch eine sehr niedrige basale Aktivität aus und wird durch die Kinasen PKA, PKC sowie Ca^{2+} -Ionen inhibiert (Lai *et al.*, 1997; Mons und Cooper 1994; Premont *et al.*, 1992). Auch die beschriebene Interaktion von Snapin mit RGS7 (*regulator of G-Protein signaling*) deutet auf eine Rolle von Snapin im Rahmen der cAMP-abhängigen Signalweiterleitung hin. RGS-Proteine verstärken die intrinsische GTPase-Aktivität von G-Proteinen und deaktivieren sie damit (Hunt *et al.*, 2003). Die funktionelle Konsequenz der Snapin-RGS7-Assoziation wurde in dieser Arbeit allerdings nicht untersucht.

5.6.3 Sekretorische Lysosomen

Eine Reihe von Zellen, meist aus der hämatopoetischen Linie, speichern ihre Sekretionsprodukte in einem endosomal-lysosomalen Kompartiment, welches auch als sekretorisches Lysosom bezeichnet wird (Blott und Griffiths 2002). Die Abb. 5.3 zeigt einige der bekanntesten Vertreter, wie z.B. zytotoxische T-Zellen (CTL), Thrombozyten und Melanozyten. Weitere Zelltypen mit sekretorischen Lysosomen stellen Osteoklasten, Makrophagen und B-Zellen dar. Im Vergleich zu konventionellen Lysosomen unterscheiden sich sekretorische Lysosomen in Morphologie und der Ausstattung an Proteinkomponenten, wohingegen der Mechanismus der Exozytose beider Lysosomenarten weitgehend identisch ist. Trotzdem existieren genetische Krankheiten, die speziell die Funktion von sekretorischen Lysosomen beeinträchtigen (Griffiths 1996). Vergleichbar der Neuroexozytose wird die Sekretion sekretorischer Lysosomen durch Mitglieder der SNARE-, Rab-, Munc- und Synaptotagmin-Familie reguliert (Stinchcombe *et al.*, 2004).

Die Beschreibung der genetischen Krankheiten Chediak-Higashi-Syndrom, Griscelli-Syndrom und Hermansky-Pudlak-Syndrom erlaubte es, die mit diesen Krankheiten assoziierten Gene zu identifizieren. Am besten charakterisiert ist das Hermansky-Pudlak-Syndrom (HPS) durch ein etabliertes Mausmodell, das sich durch einen partiellen Albinismus und Blutungsneigung klinisch manifestiert (Li *et al.*, 2003). 16 mit dieser Krankheit assoziierten Gene wurden in der Maus bisher identifiziert (Li *et al.*, 2004). Deren Genprodukte können drei verschiedene Proteinkomplexe ohne gemeinsame Komponenten bilden: BLOC-1, BLOC-2 und BLOC-3. Obwohl Mutationen in einzelnen Komponenten zu ausgeprägten Biogenese- und Transportdefekten von lysosomalen und endosomalen Vesikeln (Nazarian *et al.*, 2003; Nguyen *et al.*, 2002) führen und die typischen Syndrome von HPS zeigen, ist die Funktion der BLOC-Komplexe nicht bekannt. Der BLOC-1-Komplex besteht aus Pallidin, Muted, Cappuccino, BLOS-1, BLOS-2, BLOS-3, weiteren

unbekannten Proteinen und Snapin. In HPS-Mäusen ist die Expression all dieser Bestandteile, auch die von Snapin, reduziert. Alle Komponenten kommen zytosolisch und membranassoziiert vor und sind unter Eukaryoten hoch konserviert. Da sie nicht zur Standardausrüstung der Membranfusion gehören, sondern Bestandteil eines spezialisierten Organells höherer Eukaryoten sind, haben sie auch keine Orthologe in der Hefe (Li *et al.*, 2004; Starcevic und Dell'Angelica 2004; Wei *et al.*, 2004).

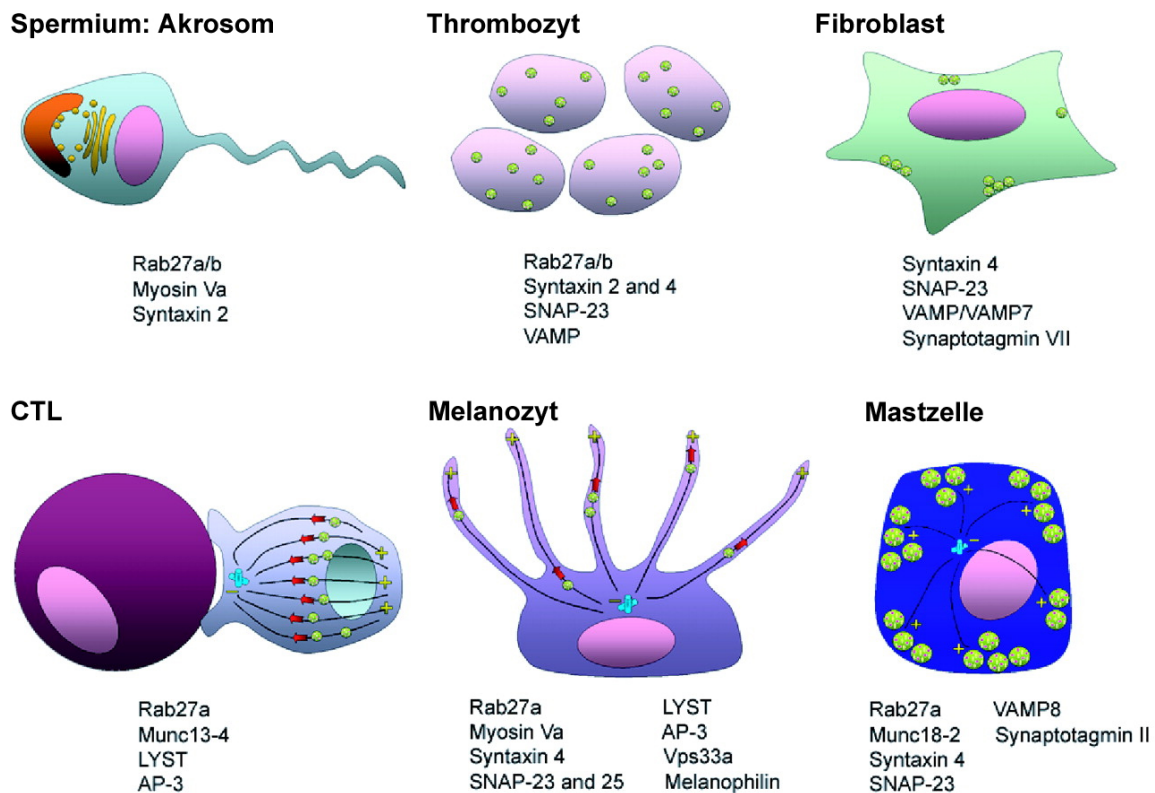


Abb. 5.3 Zellklassen mit sekretorischen Lysosomen und beteiligte Proteine an der Sekretion.
(modifiziert nach Blott und Griffiths, 2002)

Einige Komponenten des BLOC-1-Komplexes interagieren mit SNARE-Molekülen. Beispielsweise interagiert Pallidin mit Syntaxin13, welches an der Fusion von frühen Endosomen und Recycling-Endosomen beteiligt ist (McBride *et al.*, 1999; Prekeris *et al.*, 1998). Bei der Fusion der sekretorischen Lysosomen ist fast immer SNAP23 als t-SNARE-Molekül beteiligt (Stinchcombe und Griffiths 2001). Daher wäre Snapin als SNAP23-interagierendes Molekül gut positioniert, eine Rolle bei der Biogenese oder Exozytose dieser spezialisierten Organellen des endosomal-lysosomalen Systems einzunehmen. Übertragen auf die inhibitorische Aktivität auf das Snapin-Molekül wäre daher eine indirekte Funktion von EBAG9 auf den sekretorischen, lysosomalen Vesikelzyklus in der hämatopoetische Zellreihe denkbar.

5.7 EBAG9-Knockout-Mäuse als Modell zur Analyse der *in vivo*-Funktion

Zur Untersuchung der Proteinfunktion von EBAG9 *in vivo* konnten mit Hilfe der homologen Rekombination in ES-Zellen in der vorliegenden Arbeit erstmals konventionelle EBAG9-defiziente Mäuse mit einer ubiquitären Deletion des EBAG9-Proteins generiert werden. Dabei wurde ein mutiertes EBAG9-Gen hergestellt, in dem die Exons 2 bis 4 (entspricht AS 1- 107) durch eine Neomycin-Kassette ersetzt wurden. Die durchgeführten Analysen zur Beschreibung des Phänotyps konzentrierten sich zum einen auf die postulierte Funktion des tumorassoziierten 22-1-1-definierten Antigens, das bis vor kurzem noch irrtümlicherweise dem EBAG9-Genprodukt gleichgesetzt wurde (Engelsberg *et al.*, 2003; Reimer *et al.*, 2005). Zum anderen bildeten die in dieser Arbeit gewonnenen Hinweise auf eine modulatorische Rolle von EBAG9 im Rahmen der Ca²⁺-regulierten Exozytose eine maßgebliche Grundlage zur Auswahl der Phänotypisierungsexperimente.

5.7.1 EBAG9: ein apoptoseinduzierender Ligand ?

EBAG9 wurde in den ersten Beschreibungen über den 22-1-1-Antikörper definiert. Das vom 22-1-1-Antikörper erkannte Antigen wurde als neuer Todesligand beschrieben, der ähnlich der Funktionsweise des Fas/FasL-Systems (CD95/CD95L) in rezeptortragenden Zielzellen (u.a. aktivierte T-Zellen) Apoptose induzieren kann (Nakashima *et al.*, 1999). Die Eliminierung von aktivierten Lymphozyten ist zum einen eine Strategie von Tumorzellen, um sich vor dem Immunsystem zu verstecken (*immune escape*). Zum anderen ist sie aber auch essentiell für die Aufrechterhaltung der Homöostase der Lymphozytenpopulationen, um am Ende einer Immunantwort die Zahl der aktivierten Lymphozyten zu reduzieren (Baumann *et al.*, 2002; Krammer 2000). Das Verständnis der biologischen Funktion des CD95/CD95L-Systems wurde durch die Beschreibung der natürlichen Mutationen *lpr* (*lymphoproliferation*) auf der Rezeptorseite und *gld* (*generalized lymphoproliferative disease*) auf der Ligandenseite gefördert (Andrews *et al.*, 1978; Matsuzawa *et al.*, 1990; Roths *et al.*, 1984; Watanabe-Fukunaga *et al.*, 1992). Der Defekt des Fas/FasL-Systems in diesen Mausstämmen führt zum Ausbleiben der Eliminierung autoreaktiver T- und B-Zellen und zur Bildung einer großen Menge an autoreaktiven Antikörpern. Dies führt u.a. zur starken Vergrößerung von Lymphknoten und Milz, die durch eine Akkumulation von T- und B-Zellen hervorgerufen wird. Dadurch kommt es zu Lymphadenopathie, Splenomegalie und einer dem systemischem Lupus erythematoses ähnlichen Autoimmunerkrankung (Adachi *et al.*, 1995; Izui *et al.*, 1984; Nagata und Suda 1995)

Vor diesem Hintergrund und aufgrund der robusten Expression des EBAG9-Proteins im Lymphknoten (Abb. 4.30C) wurden die Lymphknotenhistomorphologie hinsichtlich der B- und T-

Zellzonen (Abb. 4.31) und die Verteilung der Lymphozytensubpopulationen ($CD4^+$, $CD8^+$ und $B220^+$) im Blut untersucht (Daten nicht gezeigt). Diese Analysen zeigten, daß keiner dieser Parameter durch das Fehlen von EBAG9 signifikant verändert war. Schließlich wurde vorgeschlagen, daß EBAG9 die maternale Immunantwort während der Schwangerschaft unterdrückt und somit zur Aufrechterhaltung der Toleranz gegenüber dem Fetus beiträgt (Ohshima *et al.*, 2001). Hirn, Ovar, Hoden, Plazenta, und Uterus während der Schwangerschaft sowie das Auge sind Gewebe, die von der normalen Immunerkennung ausgenommen sind. Die Zellen dieser Gewebe exprimieren CD95L und gewinnen dadurch einen immunologisch privilegierten Status (Barker und Billingham 1977; Bossi *et al.*, 2000). Die Auswertung der Häufigkeiten, mit denen die drei Genotypen (+/+, +/- und -/-) unter heterozygoten Eltern vorkamen, ergab keine Abweichung vom erwarteten Mendelschen Vererbungsmuster. Zudem zeigten weder männliche noch weibliche *knockout*-Tiere eine verminderte Fertilität (Tab. 4.3). Obwohl für EBAG9 keinerlei Isoformen oder Homologe im murinen oder auch humanen System existieren, kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, daß andere Proteine diese apoptosevermittelnde Funktion übernehmen. Dies würde beinhalten, daß die EBAG9-Funktion redundant ist und diese Funktion in genetisch deletierten Tieren ersetzt werden kann. Dagegen spricht allerdings, daß die EBAG9-Deletion im Rahmen der Vesikelexozytose in $CD8^+$ -T-Zellen (Abb. 4.33) oder beim Reifungsprozeß der Zymogengranula im Pankreas (Abb. 4.39) zu einem signifikanten Phänotyp führt. Aus diesen Gründen erscheint eine Rolle von EBAG9 als apoptoseinduzierender Ligand – vergleichbar dem Fas-Liganden - eher unwahrscheinlich. Vielmehr bestätigen die Resultate in der vorliegenden Arbeit jüngere Untersuchungen, wonach das EBAG9-Protein und das 22-1-1-definierte Antigen strukturell und funktionell nicht identisch sind (Engelsberg *et al.*, 2003; Reimer *et al.*, 2005).

5.7.2 Die Bedeutung von EBAG9 als Modulator der zytotoxischen Aktivität von $CD8^+$ -T-Zellen

Um den *in vivo*-Nachweis für die modulatorische Aktivität von EBAG9 im Rahmen der Regulierten Exozytose zu führen, wurde die Exozytose von lytischen Granula aus zytotoxischen $CD8^+$ -T-Zellen untersucht. Dieses Modellsystem wurde gewählt, da die zytotoxischen Granula von T-Zellen, die zu den „Sekretorischen Lysosomen“ zählen, über den klassischen Ca^{2+} -abhängigen Exozytoseweg freigesetzt werden, ähnlich den LDCV in PC12-Zellen (Blott und Griffiths 2002; Burkhardt *et al.*, 1990; Peters *et al.*, 1991; Stinchcombe und Griffiths 1999). Die zytotoxischen Granula liegen in den T-Zellen gespeichert vor und werden erst nach Stimulation des T-Zell-Rezeptors freigesetzt. Durch Quervernetzung mit anti- $CD3\epsilon$ -Antikörpern und damit Aktivierung des T-Zellrezeptors kann die

Freisetzung der lytischen Granula in CD8⁺-T-Zellen initiiert werden. Der T-Zellrezeptor liegt in einem Multiproteinkomplex vor und interagiert unter physiologischen Bedingungen mit körperfremden Peptiden, die im Komplex mit Molekülen des Haupthistokompatibilitäts-Komplexes (MHC; *major histocompatibility complex*) auf Antigen-Präsentierenden-Zellen (APC) präsentiert werden. Nach einer solchen Interaktion beginnt eine Kaskade von Phosphorylierungsereignissen, in deren Verlauf eine Reihe von Adaptermolekülen, Tyrosinkinase und Phosphatasen an der Amplifikation und Regulation der Signale beteiligt sind (u.a. ZAP-70, Fyn, Lck) und an deren Ende eine Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration steht. Dabei kommt es sowohl zu einem Einstrom von extrazellulären Ca²⁺-Ionen als auch zur Freisetzung von Ca²⁺ aus dem Endoplasmatischen Retikulum (Badou *et al.*, 2005; Gray *et al.*, 1987; Zweifach und Lewis 1993). Nach der Aktivierung des T-Zellrezeptors erfolgt eine Umorientierung von Rezeptoren, Signalmolekülen, Adhäsionsmolekülen und der lytischen Granula hin zur Kontaktstelle zwischen T-Zelle und APC, der sogenannten „Immunologischen Synapse“ (Grakoui *et al.*, 1999; Monks *et al.*, 1998; Stinchcombe und Griffiths 1999). Entscheidend für diese Polarisierung ist die Umorganisation des Aktin-Zytoskeletts, welche die Bewegung des Mikrotubuli-Organisationszentrums (MTOC), der Mitochondrien und des Golgi-Apparates hin zur Immunologischen Synapse ermöglicht (Kupfer *et al.*, 1987; Wulfing *et al.*, 1998). Diese Polarisierung des Vesikelverkehrs an die Kontaktstelle zur APC erlaubt dann den T-Zellen eine schnelle und zielgerichtete Antwort auszuführen. Im Falle von zytotoxischen T-Zellen gewährleistet diese Polarisierung eine lokale Freisetzung von Perforin und Granzymen aus ihren lytischen Vesikeln, wobei benachbarte Zellen geschont werden. Hierbei ermöglicht Perforin mit seinen porenbildenden Eigenschaften das Eindringen der Granzyme in die Zielzelle, die dann über Caspase-abhängige und -unabhängige Apoptosemechanismen den Zelltod der Zielzelle induzieren (Henkart *et al.*, 1997; Podack und Hengartner 1989; Young *et al.*, 1986).

Im Vergleich zu neuronalen und neuroendokrinen Zellen sind die exakten molekularen Mechanismen der regulierten Vesikelfusion von T-Zellen allerdings nicht bekannt. Es gibt allerdings Hinweise darauf, daß SNAP23, Syntaxin4 und VAMP3 oder VAMP8 den SNARE-Komplex bilden, der für Tetanustoxin-sensitive, Ca²⁺-abhängige Freisetzung der zytotoxischen Mediatoren verantwortlich ist (Das *et al.*, 2004). Das Ca²⁺-Sensormolekül für CTL konnte bisher nicht identifiziert werden, es wird aber vermutet, dass Synaptotagmin VII, der Ca²⁺-Sensor für konventionelle Lysosomen, diese Rolle übernimmt (Lyubchenko *et al.*, 2001; Martinez *et al.*, 2000). Viele regulatorische Proteine des Vesikelzyklus neuronaler und neuroendokriner Zellen wie die Complexine, die Munc13-Familie oder auch Rab27a erfüllen dieselben Funktionen in Zellen der

hämatopoetischen Zellreihe und auch in T-Zellen. Hieraus läßt sich ableiten, daß die molekularen Grundprinzipien des Vesikeltransportes über die unterschiedlichen Zelltypen und auch Spezies hinweg konserviert sind (Feldmann *et al.*, 2003; Haddad *et al.*, 2001; Stinchcombe *et al.*, 2001a; Tadokoro *et al.*, 2005).

Im Einklang mit den *in vitro*-Untersuchungen in PC12-Zellen herrschen in den EBAG9-deletierten CD8⁺-T-Zellen reziproke Verhältnisse vor. Im Vergleich zu Wildtypzellen war die Ca²⁺-abhängige Freisetzung von Granzym A und der β -Hexosaminidase aus den lytischen Granula um den Faktor 2 erhöht (Abb. 4.33). Demgegenüber hatte die Deletion von EBAG9 keinen Einfluß auf den konstitutiven Vesikeltransport von IFN γ sowie auf die Freisetzung des Chemokinliganden RANTES (Abb. 4.34 und 4.35). Diese Beobachtungen bekräftigen die Spezifität dieser Experimente und schließen einen indirekten Effekt durch Unterschiede im Reifungsgrad der Effektor-T-Zellen aus. Damit im Einklang steht der vergleichbare Aktivierungsgrad- bzw. Reifungsgrad von allogenen stimulierten zytotoxischen T-Zellen (Abb. 4.32), der anhand der CD25-Expression (IL-2-Rezeptor α -Kette) bestimmt werden kann (Lowenthal *et al.*, 1985). Die physiologische Relevanz der effizienteren Exozytose der zytotoxischen Vesikel bleibt allerdings offen und kann nur *in vitro* in zellulären Zytotoxizitätsversuchen sowie *in vivo* in Infektionsmodellen oder Tumorabstoßungsmodellen ermittelt werden. Diese Zielvorgaben werden in weiterführenden Analysen der *in vivo*-Funktion von EBAG9 im Vordergrund stehen.

5.7.3 Der Einfluß von EBAG9 auf die Biogenese und Reifung sekretorischer Granula

Die Deletion von EBAG9 führte im exokrinen Pankreas zu einer durchschnittlichen Vergrößerung des Zymogengranuladurchmessers um 20%, was einer 60%igen Vergrößerung des Vesikelvolumens entspricht (Abb. 4.39). Der exokrine Pankreas ist eine tubulo-azinöse Drüse, die den Verdauungsaft mit einer Vielzahl von Proteasen, Lipasen, Glukosidasen und Nukleasen produziert, bestehend aus 15-20 Verdauungsenzymen und verschiedenen Proenzymen (Zymogenen). Die Enzyme sind in großen Vesikeln, den sogenannten Zymogengranula, gespeichert. Die molekularen Mechanismen der Proteinsortierung, Formierung und Reifung der Zymogengranula sind bisher wenig verstanden (Zur Übersicht: Wäsle und Edwardson 2002). Die Trennung der reguliert sezernierten Zymogene von den Proteinen des konstitutiven Transportweges erfolgt im TGN. Derzeit werden für die Proteinsortierung zwei Modelle diskutiert: das *sorting-for-entry* und das *sorting-for-retention* Modell (Zur Übersicht: Arvan und Castle 1998). Die Granulabiogenese in den Azinuszellen beginnt mit der Abschnürung von kondensierenden Vakuolen am TGN, die ein saures Milieu haben. Die elektronenmikroskopische Analyse zeigte, daß

die Vakuolen nach der Abknospung ein flockiges Material enthalten und größer sind als reife Zymogengranula. Während der Reifung kondensiert/aggregiert der Granulainhalt pH-Wert- und Ca^{2+} -abhängig, so daß er elektronendichter wird und die Granula ihre endgültige Größe erreichen (Dartsch *et al.*, 1998). Zur Reifung der Granula müssen schließlich verschiedene Substanzen entfernt werden, z.B. Mannose-6-Phosphatrezeptoren und gebundene lysosomale Proteine, sowie Proteine, die für die konstitutive Sekretion bestimmt sind. Diese Proteine werden in clathrinumhüllten, konstitutiven Vesikeln von den reifenden Granula abgeschnürt. Dieser sogenannte „constitutive-like“-Transportweg wird auch für die stimulusunabhängige, unregulierte Sekretion neu-synthetisierter Proteine verantwortlich gemacht (Fernandez *et al.*, 1997; Kuliawat und Arvan 1992; Tooze 1998; Tooze *et al.*, 2001). Durch einen neuronalen (Acetylcholin) oder hormonellen (Cholecystokinin) Reiz, der jeweils zur Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus dem ER führt, wird die Exozytose der Zymogengranula über einen SNARE-Komplex, bestehend aus SNAP23, Syntaxin4 und VAMP8, mit der apikalen Plasmamembran induziert (Wang *et al.*, 2004); (Thevenod 2002; Williams 2001).

Wie könnte EBAG9 die Größe der sekretorischen Granula im exokrinen Pankreas regulieren? Zwei Möglichkeiten kommen dafür in Betracht: zunächst könnte die Abwesenheit von EBAG9 dazu führen, daß die vom TGN abknospende kondensierende Vakuole vergrößert ist und diese Volumenzunahme auch nach der vollständigen Reifung und Kondensation der Zymogengranula erhalten bleibt. Alternativ könnte EBAG9 die Maturierung der unreifen Granula regulieren, also in die Prozesse der Kondensation und Aggregation des Vesikelinhaltes und/oder der Reduzierung des Vesikelvolumens durch Abschnürung kleiner Vesikel eingreifen. EBAG9 könnte somit als positiver Modulator in den Prozeß des „constitutive-like“-Transportweges eingreifen. Andere Moleküle, deren Deletion in der Maus zu einer Dysregulation der Vesikelreifung führt, sind Rab3D, das LYST-kodierte Genprodukt, Noc2 oder AP-3. Die physiologische Bedeutung des Vesikelvolumens für die Kinetik der Vesikelfreisetzung bzw. für die Menge der sezernierten Mediatoren im jeweiligen Zellsystem wird derzeit noch diskutiert (Barbosa *et al.*, 1996; Cheviet *et al.*, 2004). Die Abwesenheit von Rab3D führt z.B. zu einer signifikanten Volumenzunahme der Zymogengranula, hat aber keine Auswirkung auf die Menge der Zymogenfreisetzung im exokrinen Pankreas (Riedel *et al.*, 2002). Im starken Kontrast dazu stehen die ungewöhnlich großen lytischen Vesikel der zytotoxischen T-Zellen, die defizient für das Adaptorprotein AP-3 sind und nicht mehr in der Lage sind, mit der Plasmamembran zu fusionieren. Daher wurde vermutet, daß die Größe der Vesikel die Mobilität und damit die Polarisierung hin zur Immunologischen Synapse limitiert. Ein direkter Zusammenhang zwischen der Größe sekretorischer Vesikel und deren Migrationsfähigkeit ist

allerdings hypothetischer Natur (Clark *et al.*, 2003). Um Aussagen über die zellbiologischen Konsequenzen und vor allem die physiologische Relevanz der vergrößerten Zymogengranula in den EBAG9-defizienten Mäusen machen zu können, bedarf es daher einer weiteren Untersuchung zum Einfluß der EBAG9-Deletion auf die Zymogengranulafreisetzung. Eine andere offene Frage bleibt, ob die Deletion von EBAG9 auch in anderen Zellsystemen, wie neuroendokrinen Zellen oder CD8⁺-T-Zellen, zu einer Dysregulation der Vesikelbiogenese und -reifung führt und diese somit indirekt die Effizienz der Vesikelexozytose reguliert.

5.8 Die Bedeutung von EBAG9 für den Gesamtorganismus: Ein Ausblick

Die synaptische Transmission kann auf prä- als auch postsynaptischer Seite auf vielfältige Art und Weise moduliert werden, was allgemein als Ursache für die Plastizität unseres Gehirns angesehen wird und die Basis für die integrativen Leistungen, also Lernen, Gedächtnis und Denken, bildet (Bliss und Collingridge 1993; Nicoll und Malenka 1995). Für das Funktionieren des neuronalen Netzwerkes des zentralen und peripheren Nervensystems sowie von peripheren Körperfunktionen ist - neben der monosynaptischen Verbindung mit einer Quelle (präsynaptisches Neuron) und einem Ziel (postsynaptisches Neuron) - die „Volumentransmission“ von biogenen Aminen von entscheidender Bedeutung. Die Katecholamine (Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin) sowie andere biogene Amine und Neuropeptide nehmen dabei eine zentrale Stellung ein. Sie werden vorwiegend durch LDCV in verschiedenen Neuronen (vor allem im sympathischen Nervensystem) und neuroendokrinen Zellen entlassen und wirken nicht alleine auf postsynaptische Zellen, sondern können auch weit entfernte Zellen mittels Diffusion im extrazellulären Raum oder durch Zirkulation im Blutstrom erreichen (Torrealba und Carrasco 2004; Zoli *et al.*, 1999). Nur die strenge Kontrolle und strikte Regulation der Effizienz der Signalübertragung während der Entwicklung, aber auch unter bestimmten physiologischen und pathologischen Bedingungen, gewährleistet die Homöostase verschiedenster Körperfunktionen und Aufrechterhaltung des Neurotransmittergleichgewichtes (Rettig und Neher 2002; Zucker 1999). Die Katecholamine regulieren u.a den Wach-Schlaf-Rhythmus, das Herzkeislaufsystem und die Nahrungsaufnahme sowie die Synthese und Sekretion verschiedenster Neurotransmitter. Die Dysregulation der Katecholaminfreisetzung führt zu einer Vielzahl von neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen wie der Parkinson-Krankheit, Schizophrenie und Depression. In der vorliegenden Arbeit konnte EBAG9 als ein neues Mitglied im komplexen Proteinnetzwerk identifiziert werden, welches - indirekt über die Interaktion mit Snapin - die Effizienz der Ca²⁺-induzierten Freisetzung von LDCV reguliert. EBAG9 könnte somit

regulativ in neuronale und neuroendokrine Vesikelkreisläufe eingreifen und so das Funktionieren des Organismus unter bestimmten physiologischen oder pathologischen Bedingungen ermöglichen. Die Funktion von EBAG9 als Modulator der Regulierten Exozytose ist allerdings nicht auf Zellen neuronalen Ursprungs beschränkt. Die konstitutive Deletion von EBAG9 in der Maus führt zu einer enthemmteren Freisetzung zytotoxischer Mediatoren aus Effektor-CD8⁺-T-Zellen. Zytotoxische T-Zellen setzen normalerweise nur ca. 15% ihrer Granula ein, um eine virusinfizierte Zelle oder Tumorzelle zu eliminieren und behalten den Großteil ihrer zytotoxischen Mediatoren in Reserve, um für spätere Begegnungen mit Zielzellen noch genügend zytotoxische Kraft zur Verfügung zu haben (Faroudi *et al.*, 2003; Lyubchenko *et al.*, 2001; Stinchcombe *et al.*, 2001b). EBAG9 könnte durch die Restriktion der Vesikelfreisetzung somit die Effizienz der zytotoxischen Immunantwort auf eine Virusinfektionen oder einer Tumorentwicklung optimieren und so der Erschöpfung der T-Zellimmunität entgegenwirken (*prevention of CD8+ T cell exhaustion*)(Critchfield *et al.*, 1994; Moskophidis *et al.*, 1993).

Wie läßt sich die vorgeschlagene physiologische Rolle von EBAG9 im Rahmen der Regulierten Exozytose vor dem Hintergrund der publizierten Tumorassoziation einordnen? Die maligne Transformation einer Zelle geht einher mit der Modulation des sekretorischen Vesikeltransportapparates und begünstigt so die Entwicklung, Proliferation sowie Metastasierung karzinogener Gewebe und entzieht sich so der lokalen Wachstumskontrolle und Apoptosesignalen. Dabei kommt es sowohl zu veränderten Expressionsprofilen von Zelloberflächenmolekülen sowie zu einer Dysregulation der Synthese und Freisetzung verschiedenster Wachstumsfaktoren und Zytokinen wie PDGF, FGF, EGF, IL-1 und VEGF (Chan und Weber 2002). Ein direkter Zusammenhang zwischen der Modulation des Membranfusionsprozesses und der Tumorentwicklung konnte erst kürzlich durch die Identifizierung des tumorassoziierten BAIAP3-Proteins (*brain-specific angiogenesis inhibitor associated protein 3*) gezeigt werden, einem Homolog des Munc-13-1-Proteins (Palmer *et al.*, 2002). Die Proteine der Munc13-Familie sind essentielle Proteine für die Bereitstellung (*priming*) exozytosekompetenter Vesikel in neuronalen, endokrinen und exokrinen Zellen sowie Zellen hämatopoetischen Ursprungs (Ashery *et al.*, 2000; Feldmann *et al.*, 2003). Obwohl EBAG9 ein physiologisch vorkommendes Protein ist, zeigen jüngere Untersuchungen, daß die Expression von EBAG9 in verschiedenen karzinogen Geweben wie Eierstock-, Prostata-, Leber- und Nieren-Tumoren mit der Tumorproliferation korreliert und spiegelt damit möglicherweise eine Rolle von EBAG9 in der Regulation von Exozytoseereignissen in malignen Geweben wider (Akahira *et al.*, 2004; Aoki *et al.*, 2003; Ogushi *et al.*, 2005; Takahashi *et al.*, 2003; Tsuneizumi *et al.*, 2001). Es wäre denkbar, daß EBAG9 durch Hemmung der Sekretion

anti-inflammatorischer Zytokine bzw. hemmender (antiangiogener) Wachstumsfaktoren - wie Angiostatin, Endostatin und Thrombospondin - die Tumorprogression fördert und so zur Störung des Gleichgewichts zwischen negativen und positiven Angiogenesefaktoren führt (Folkman 1995; Gohongi *et al.*, 1999; O'Reilly *et al.*, 1997; O'Reilly *et al.*, 1994).