

7. Anhang

Zusammenfassung

Das östrogeninduzierbare Protein EBAG9 (*estrogen receptor-binding fragment-associated gene 9*) wurde ursprünglich als ein neues tumorassoziiertes Antigen eingeführt, dessen Überexpression zu einer Generierung von Vorläufermolekülen der O-Glykosylierung in nicht-neuronalen Zellen führt. Inzwischen konnten allerdings weitere Untersuchungen nachweisen, daß das EBAG9-kodierte Genprodukt in nahezu allen humanen und murinen Geweben exprimiert wird.

Da die physiologische Funktion des EBAG9-Moleküls weitgehend unklar ist, wurde in der vorliegenden Dissertation unter Verwendung des Hefe-2-Hybrid-Systems nach EBAG9-interagierenden Proteinen gesucht. So konnte das SNARE-assoziierte Protein Snapin, ein modulatorisches Molekül im Prozeß der Ca^{2+} -regulierten Exozytose in neuronalen und chromaffinen Zellen, als Interaktionspartner von EBAG9 identifiziert werden. Snapin interagiert phosphorylierungsabhängig mit dem t-SNARE-Molekül SNAP25 und verstärkt dadurch die Rekrutierung des Ca^{2+} -Sensormoleküls Synaptotagmin zum SNARE-Komplex.

Die Spezifität der direkten Interaktion von EBAG9 mit Snapin konnte im Hefesystem, *in vitro* in GST-Bindungsstudien und *in vivo* durch Koimmunpräzipitationsexperimente verifiziert werden. Weitere Hinweise für eine *in vivo*-Assoziation von EBAG9 und Snapin sind (1) die Koelution der endogen exprimierten Proteine nach einer Gelfiltration von PC12-Zellysaten und (2) die partielle Kolokalisation beider Moleküle an perinukleären Membranen in HEK293-Zellen. Durch Deletionsanalysen konnten die relevanten Proteinbereiche der EBAG9-Snapin-Assoziation bestimmt werden, wobei die N-terminale *coiled-coil*-Domäne von Snapin sowie die N-terminale Domäne (AS 8-27) im EBAG9-Molekül essentiell für die Proteininteraktion waren. Zudem dienten die drei Cysteinreste der Snapin-interagierenden Domäne im EBAG9-Molekül als Akzeptorstellen für Palmitinsäurereste und waren essentiell für die periphere Membranassoziation des EBAG9-Proteins. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen und subzelluläre Fraktionierungsexperimente von PC12-Zellen zeigten, daß EBAG9 im Verlauf der neuronalen Differenzierung einer dynamischen Umverteilung von einem perinukleären Kompartiment hin zu sekretorischen Vesikeln, darunter sind „small synaptic vesicles“ und „large dense-core vesicles“, unterliegt. Damit wäre EBAG9 als Snapin-interagierendes Molekül gut positioniert, eine Rolle bei der Ca^{2+} -regulierten Exozytose sekretorischer Granula einzunehmen. Die funktionelle Relevanz der EBAG9-Snapin-

Assoziation konnte durch die Überexpression von EBAG9 in der neuroendokrinen Zelllinie PC12 gezeigt werden, die zu einer signifikanten Reduktion ($\approx 50\%$) der Ca^{2+} -abhängigen Freisetzung des Neurotransmitters Neuropeptid Y und des Katecholamins Norepinephrin führte. Intrazelluläre, konstitutive Transportwege hingegen blieben durch die EBAG9-Überexpression unbeeinflusst. Die durch EBAG9 bewirkte Reduktion der basalen Snapin-Phosphorylierung sowie funktionelle Störung der Snapin-Bindung an seinen Interaktionspartner SNAP25 könnte dabei die mechanistische Grundlage für die inhibitorische Aktivität von EBAG9 im Prozeß der Vesikelexozytose bilden. Gleichmaßen inhibiert EBAG9 auch die Assoziation von Snapin mit dem ubiquitären t-SNARE-Homolog SNAP23 und legt damit eine Rolle für EBAG9 im Rahmen der Ca^{2+} -abhängigen Vesikelexozytose in einer weitaus größeren Anzahl von Zelltypen nahe.

Mit Hilfe der homologen Rekombination in ES-Zellen konnten erstmals konstitutive EBAG9-defiziente Mäuse generiert werden, die es ermöglichten, die *in vivo*-Funktion von EBAG9 im Rahmen von Vesikeltransport- und Exozytoseprozessen zu untersuchen. Als Modellsystem wurde die Ca^{2+} -abhängige Freisetzung lytischer Granula aus zytotoxischen CD8^+ -T-Zellen untersucht. Im Einklang mit den *in vitro*-Untersuchungen in PC12-Zellen war in den EBAG9-deletierten Mäusen die Ca^{2+} -abhängige Freisetzung der lytischen Vesikelmarkerproteine Granzym A und β -Hexosaminidase signifikant erhöht (\approx Faktor 2). Andere Transportwege immunologisch relevanter Zytokine waren in den CD8^+ -T-Zellen nicht durch das Fehlen von EBAG9 beeinflusst. Die Bestimmung der Zymogengranulavolumina im exokrinen Pankreas deutet auf eine indirekte Funktion von EBAG9 im Rahmen der Vesikelexozytose hin. Die Deletion von EBAG9 führt dort zu einer durchschnittlichen Vergrößerung des Zymogengranulavolumens ($\approx 60\%$) und legt eine Rolle von EBAG9 in der Biogenese und Reifung sekretorischer Granula nahe. Zusammengefaßt konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß das physiologisch vorkommende Protein EBAG9 neben einer putativen Rolle in Tumoren auch eine physiologische Rolle in der Regulation von Vesikelkreisläufen in eukaryotischen Zellen einnimmt.

Summary

The estrogen-responsive protein EBAG9 (*estrogen receptor-binding fragment-associated gene 9*) was originally described as a novel tumor-associated antigen, which causes the occurrence of normally cryptic O-linked glycans in non-neuronal cells. However, this molecule is expressed physiologically in most mammalian and murine tissues.

Since the physiological function of the EBAG9-encoded gene-product is largely unknown, I scored for interaction partners employing the yeast two-hybrid system. In the present study, the SNARE-associated protein Snapin was identified as the first interaction partner of EBAG9. Snapin is thought to have a positive modulatory role in the process of Ca^{2+} -dependent exocytosis in neuronal and chromaffin cells. Snapin interacts with the t-SNARE protein SNAP25 in a phosphorylation-dependent manner and subsequently improves the binding affinity of the putative Ca^{2+} sensor Synaptotagmin to the SNARE-complex.

The specificity of the EBAG9-Snapin association was confirmed in the yeast system, *in vitro* by GST-pulldown assays and *in vivo* by coimmunoprecipitation experiments. Further observations support an *in vivo* interaction of EBAG9 and Snapin: (1) coelution of the endogenously expressed proteins EBAG9 and Snapin after gel filtration of PC12 cell extracts and (2) partial colocalisation of both proteins at perinuclear membranes. Using binding assays with truncated fusion proteins, the interaction domains essential for EBAG9-Snapin association were mapped to the N-terminal domain of EBAG9 and the N-terminal coiled-coil domain of Snapin. Furthermore, the Snapin-interacting domain of EBAG9, which contains three cysteine residues, was shown to be palmitoylated and thus provides a lipid anchor for peripheral membrane association of EBAG9. Immunofluorescence analysis and subcellular fractionation experiments revealed that EBAG9 is subject to a dynamic redistribution upon NGF-induced differentiation in neuroendocrine PC12 cells. More specifically, a population of EBAG9 molecules redistributed differentiation-dependent from a perinuclear compartment to secretory granules, among them small synaptic vesicles and large dense-core vesicles. Thus, I conclude that the Snapin-interacting protein EBAG9 in all likelihood has an important role in Ca^{2+} -dependent exocytosis of secretory vesicles. Overexpression of EBAG9 inhibited regulated release of neuropeptide Y and norepinephrine from PC12 cells, thus demonstrating the functional relevance of the EBAG9-Snapin association. In contrast, intracellular constitutive trafficking pathways remained unaffected upon EBAG9 overexpression. Mechanistically, EBAG9 decreased basal phosphorylation of Snapin, which subsequently attenuated Snapin binding to SNAP25. Likewise EBAG9 impeded association of Snapin and

SNAP23, the widely expressed homologue of SNAP25. This observation suggests a more general role for EBAG9 in membrane fusion events in non-neuronal cells as well.

To examine the function of the EBAG9-encoded gene product *in vivo*, I generated a targeted null mutation of the EBAG9 gene in the mouse by homologous recombination in embryonic stem cells. In agreement with the results from overexpression of EBAG9 in neuroendocrine PC12 cells, I observed a reverse phenotype in EBAG9 deficient mice since regulated release of the lytic granule mediators granzyme A and β -hexosaminidase is enhanced twofold in cytotoxic T-lymphocytes. In contrast, the trafficking of other immunological relevant molecules was not affected by the deletion of the EBAG9 protein. In addition, the size and volume of secretory granules were significantly increased in the exocrine pancreas of EBAG9-deficient mice. This observation suggests a more indirect role for EBAG9 in the process of vesicle exocytosis, possibly mediated by interference with the granule biogenesis or maturation pathway. In conclusion, the present study shows that in addition to a putative function in tumor cells, the ubiquitously expressed protein EBAG9 has a physiological role in the regulation of the secretory vesicle cycle in eukaryotic cells.

Eidstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben und alle Hilfsmittel und Inhalte aus anderen Quellen als solche gekennzeichnet zu haben. Des weiteren versichere ich, daß die vorliegende Arbeit nie Gegenstand eines früheren Promotionsverfahrens war.

Berlin, August 2005

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Constantin Rüder, Tatiana Reimer, Ignacio Delgado Martinez, Ricardo Hermosilla, Arne Engelsberg, Ralf Nehring, Bernd Dörken und Armin Rehm (2005).

EBAG9 Adds a New Layer of Control on Large Dense-Core Vesicle Exocytosis via Interaction with Snapin.

Molecular Biology of the Cell, 16 (3): 1245-57

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Constantin Rüder
geboren am: 25.08.1975 in Lübeck
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung und Studium

1982-1986 Grund- u. Hauptschule Klosterhofschule der Hansestadt Lübeck

1986-1995 Gymnasium Ernestinenschule der Hansestadt Lübeck
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

1995-2000 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität zu Halle-Wittenberg
Diplomprüfungen Biochemie, Organische Chemie, Pflanzenphysiologie und Immunologie

1999-2000 Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. C. Wasternack am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle.
Thema: „Untersuchungen zu Interaktionspartnern Jasmonat-induzierter Proteine mit Hilfe des Hefedibridsystems“

2001-2005 Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von Dr. Armin Rehm am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin (Forschungsgruppe Hämatologie, Onkologie und Tumorummunologie, Leiter: Prof. Dr. Bernd Dörken)

2002-2004 Stipendium im Rahmen des Förderprogramms für den wissenschaftlichen Nachwuchs am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin

Berlin, August 2005

Publikationen

Manuskripte:

Constantin Rüder, Tatiana Reimer, Ignacio Delgado Martinez, Ricardo Hermsilla, Arne Engelsberg, Ralf Nehring, Bernd Dörken und Armin Rehm (2005).

EBAG9 Adds a New Layer of Control on Large Dense-Core Vesicle Exocytosis via Interaction with Snapin.

Molecular Biology of the Cell, 16 (3): 1245-57

Armin Rehm, **Constantin Rüder**, Hidde L. Ploegh und Domenico Tortorella.

Modulation of endoplasmic reticulum calcium stores reveals a calnexin-dependent proteolytic pathway for a membrane protein. FEBS Journal (in Revision).

Posterpräsentationen:

Constantin Rüder, Tatiana Reimer, Ricardo Hermsilla, Arne Engelsberg, Bernd Dörken, and Armin Rehm

“EBAG9 has a modulatory function in regulated exocytosis in mammalian cells”

German Society for Cell Biology 2004, Berlin

Armin Rehm, Tatiana Reimer, Ricardo Hermsilla, Arne Engelsberg, Bernd Dörken, and **Constantin Rüder**

“Cell biological characterization of the tumor-associated antigen EBAG9”

European Association for Cancer Research 2004, Innsbruck

Danksagung

Besonderen Dank schulde ich Herrn Dr. Armin Rehm für die Bereitstellung des interessanten Themas, seine ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft sowie die hervorragende praktische Betreuung.

Herrn Prof. Dr. Bernd Dörken danke ich für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit und Bereitstellung eines hervorragenden Arbeitsumfeldes.

Bei Herrn Prof. Dr. Fritz G. Rathjen möchte ich mich für die Vertretung dieser Arbeit am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin bedanken.

Für die beratenden und praktischen Hilfestellungen möchte ich Frau Dr. Uta Höpken danken.

Prof. Dr. Carmen Birchmeier und ihrer Gruppe möchte ich für die Gastfreundschaft und Hilfe bei der ES-Zellkultur danken. Besonderen Dank gilt dabei Frau Kathrin Rudolph für die Blastozysteninjektion und den Uterustransfer. Bei Fr. Dr. Bettina Erdmann möchte ich mich für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen bedanken.

Frau Dr. Tatiana Reimer danke ich für die konfokale Analyse der EBAG9-Lokalisation in PC12-Zellen.

Bei meinen jetzigen und ehemaligen Laborkollegen Insa Lehmann, Arne Engelsberg, Tatiana Reimer, Jana Droese und Kerstin Gerlach möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit, Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft bedanken.

Nicht unerwähnt sollen bleiben Nicole Hübener und Sören Panse, die das Korrekturlesen auf sich genommen haben.

Mein besonderer Dank gilt meinen lieben Eltern für ihre selbstlose Unterstützung während meines gesamten Daseins.