1. Einleitung

1.1 Das tumorassoziierte 22-1-1-definierte Antigen

Die Identifizierung von tumorspezifischen Antigenen hat in den letzten Jahrzehnten immer mehr an Bedeutung gewonnen und ist zu einem wichtigen Bestandteil der Tumorimmunologie geworden. Die Isolierung und Charakterisierung tumorassoziierter Moleküle ermöglicht die Entwicklung neuer Vakzinierungsstrategien, mit dem Ziel, eine tumorspezifische Immunantwort zu induzieren, ohne dabei eine Autoimmunantwort hervorzurufen. Beispielsweise können Vakzine basierend auf Peptiden oder Glykopeptiden von Mucin 1, HER2/NEU, CEA, MAGE-3 (*melanoma-associated antigen 3*) oder anderen Mitgliedern der MAGE-Familie eine humorale oder T-Zell-abhängige Immunantwort induzieren (Finn 2003). Auch als diagnostische Markermoleküle werden diese tumorassoziierten Antigene verwendet und finden ihre Anwendung in der Früherkennung von Prostatakrebs (PSA) oder bei der Überwachung eines Therapieansatzes (AFP, CEA, HCG, NSE) (Aquino *et al.,* 2004; Ebert *et al.,* 1996; Gregory und Finlay 1999; Moul *et al.,* 2002).

Die Isolierung eines neuen tumorassoziierten Antigens, das durch den monoklonalen Antikörper 22-1-1 definiert wurde, hat in der jüngsten Vergangenheit große Aufmerksamkeit erlangt. Dieser Antikörper vom IgM-Isotyp wurde durch Immunisierung von Mäusen mit der humanen uterinen Adenokarzinom-Zellinie SiSo generiert (Sonoda *et al.,* 1996). In einer großen Anzahl verschiedener Tumorgewebe konnte das 22-1-1-Antigen immunhistochemisch auf der Plasmamembran nachgewiesen werden, und in einigen Tumorentitäten korreliert die Expression des 22-1-1-definierten Antigens mit einer schlechteren Prognose (Izumi *et al.,* 2001; Nakakubo *et al.,* 2002; Oizumi *et al.,* 2002; Okada *et al.,* 2003; Oshikiri *et al.,* 2001). Eine lösliche Form des 22-1-1-Antigens konnte im Überstand von SiSo- und MCF7-Zellkulturen nachgewiesen werden (Rousseau *et al.,* 2002; Sonoda *et al.,* 1996).

Durch „expression cloning“ wurde die vermeintliche cDNA des 22-1-1-definierten Antigens identifiziert und RCAS1 genannt (*receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells*) (Nakashima *et al.,* 1999). Dabei zeigte sich, daß das Genprodukt identisch mit dem östrogeninduzierbaren Protein EBAG9 (*estrogen receptor-binding fragment-associated gene 9*) ist (Ikeda *et al.,* 2000; Nakashima *et al.,* 1999; Watanabe *et al.,* 1998). Basierend auf Strukturvorhersagen wurde für EBAG9 eine TypII-Transmembranorientierung mit einer kurzen N-terminalen Transmembrandomäne und einem großen extrazellulär orientierten C-Terminus vorgeschlagen. Bindungsstudien mit rekombinant exprimiertem EBAG9 zeigten eine Interaktion

mit einem 25 kD großen Protein, welches auf humanen peripheren Lymphozyten (T-, B- und NK-Zellen) exprimiert wird. Es wurde vermutet, daß dieses Protein den Rezeptor für EBAG9 darstellt. Bisher ist dieser putative Rezeptor von EBAG9 allerdings nicht kloniert und daher auch nicht näher charakterisiert worden. Die Inkubation mit dem für das 22-1-1-Antigen positiv getesteten Überstand von SiSo Zellen führte bei aktivierten T-Zellen bzw. rezeptortragenden Zellen (K562, NIH3T3, u.a.) zur Proliferationsinhibition und Apoptoseinduktion. Diese Beobachtung ließ vermuten, daß EBAG9 als ein ausschließlich auf der Plasmamembran von Tumorzellen exprimierter Ligand mit einem putativen Todesrezeptor auf Immunzellen interagiert und somit zum „immune escape“ von Tumoren beiträgt (Nakashima *et al.,* 1999).

Nachfolgende Arbeiten erweiterten die Rolle von EBAG9 zu einem allgemeinen apoptoseinduzierenden Ligand/Rezeptor-System, vergleichbar dem FasL/Fas-System (Itoh *et al.,* 1991). Dem *EBAG9*-kodierten Genprodukt wurde sowohl eine Beteiligung bei der Aufrecherhaltung der Schwangerschaft durch die Suppression der maternalen Immunantwort als auch bei der Regulation der Homöostase im Rahmen der normalen Hämatopoese durch die Steuerung der Apoptose von erythroiden Vorläuferzellen im Knochenmark zugeschrieben (Matsushima *et al.,* 2001; Ohshima *et al.,* 2001; Wicherek *et al.,* 2003).

In den publizierten Untersuchungen wurde vorwiegend der 22-1-1-Antikörper bzw. der Zellkulturüberstand von SiSo-Zellen verwendet. Jüngste Studien zeigen nun jedoch, daß das *EBAG9-kodierte* Genprodukt und das vom 22-1-1-Antikörper erkannte Antigen strukturell und funktionell nicht identisch sind (Engelsberg *et al.,* 2003; Reimer *et al.,* 2005). Diese Diskrepanz wird im folgenden nun näher erläutert und stellt die Rolle von EBAG9 als apoptoseinduzierenden Liganden von Tumorzellen in Frage.

1.2 Das ubiquitär exprimierte Protein EBAG9

Die 1060 bp lange cDNA-Sequenz von EBAG9 enthält einen Bereich von 639 bp, der für ein aus 213 Aminosäuren (AS) bestehendes Protein mit einem vorhergesagten Molekülgewicht von 24 kD kodiert. Unter Verwendung eines polyklonalen Serums gegen rekombinantes EBAG9 stellt sich das Protein in Westernblot-Analysen und Immunpräzipitationen allerdings als spezifische Doppelbande mit einer Größe von ca. 32 kD dar (Engelsberg *et al.,* 2003; Tsuchiya *et al.,* 2001). Dieser Größenunterschied rührt dabei weder von N- noch O-Glykosylierungen des EBAG9-Proteins her (Engelsberg *et al.,* 2003).

Im humanen System wird EBAG9 auf dem langen Arm von Chromosom 8 (8q23) kodiert. Die Transkriptionsrate wird durch ein *estrogen-responsive element* (ERE) im Promotorbereich reguliert

und kann durch Östrogene um das 0.5-3.2-fache gesteigert werden (Ikeda *et al.*, 2000; Watanabe *et al.*, 1998). Das Vorhandensein putativer Bindungsmotive (*GC-boxes* und *E-boxes*) für Transkriptionsfaktoren läßt zudem vermuten, daß andere, östrogenunabhängige Mechanismen für die Regulation der EBAG9-Transkription möglich sind (Takahashi *et al.*, 2001).

Ein EBAG9-Homolog im murinen System konnte inzwischen identifiziert werden, welches auf mRNA-Ebene eine Identität von 80% im Vergleich zum humanen EBAG9 aufweist und auf Proteinebene bis auf den Austausch von fünf Aminosäuren (davon vier konservative) identisch ist. Es konnte die Proteinexpression mit einem Serum gegen rekombinantes EBAG9 in allen getesteten murinen und humanen Zellinien und Mausgeweben sowie im sich entwickelnden Embyro gezeigt werden (Engelsberg *et al.*, 2003; Tsuchiya *et al.*, 2001). EBAG9 ist sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene ubiquitär exprimiert und keineswegs tumorspezifisch wie ursprünglich angenommen wurde (Engelsberg *et al.*, 2003; Ikeda *et al.*, 2000; Nakashima *et al.*, 1999; Reimer *et al.*, 2005; Tsuchiya *et al.*, 2001). Evolutionär hoch konservierte EBAG9-Orthologe finden sich des weiteren in Ratte (*Rattus norvegicus*), Hund (*Canis familiaris*), Krallenfosch (*Xenopus laevis*) und Zebrafisch (*Danio rerio*). Interessanterweise gibt es in der Hefe kein Homolog.

Strukturvorhersagen schlagen für EBAG9 eine Domänenstruktur mit einer N-terminalen Transmembrandomäne (AS 8-27) und einer C-terminalen *coiled-coil*-Domäne (AS 179-206) (Abb. 1.1A) vor. Anfänglich wurde eine plasmamembranständige TypII-Transmembranorientierung postuliert (basierend auf Strukturvorhersagen), in der der große Bereich C-terminal der Transmembrandomäne (AS 28-213) in den extrazellulären Raum reicht und so EBAG9 als Ligand für seinen putativen Todesrezeptor wirken kann (Nakashima *et al.*, 1999). In einem biochemischen Ansatz wurde allerdings gezeigt, daß der Großteil des EBAG9-Moleküls ins Zytoplasma gerichtet ist, was eine TypIII-Transmembranorientierung nahe legt (Abb 1.1B)(Engelsberg *et al.*, 2003).

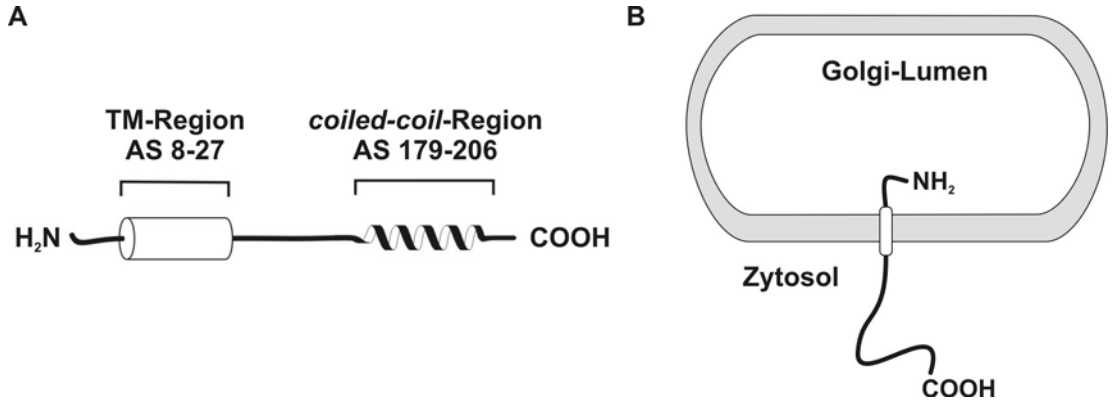

Abb. 1.1 Die Proteinstruktur und Membranorientierung von EBAG9.
Die Vorhersage der Proteinstruktur erfolgte mit Hilfe des „TMbase Server“ (Hofmann und Stoffel 1993) und „Coiled-coil prediction Server“ (Lupas *et al.*, 1991). **(B)** Die Membrantopologie ist nach Engelsberg *et al.* (2003) dargestellt.

1.3 Die subzelluläre Lokalisation von EBAG9 und des 22-1-1-definierten Antigens

Die Analyse der subzellulären Lokalisation deckte auf, daß EBAG9 und das vom 22-1-1-Antikörper detektierte Epitop unterschiedliche Antigene sind (Abb. 1.2). In HEK293- und MCF7-Zellen ist EBAG9 überwiegend perinukleär im Golgi-Apparat lokalisiert und kolokalisiert dort mit Golgi-Markerproteinen, während das 22-1-1-Antigen hauptsächlich auf der Plasmamembran exprimiert wird (Engelsberg *et al.*, 2003; Reimer *et al.*, 2005). Ein direkter Vergleich von EBAG9 und dem 22-1-1-definierten Antigen in Westernblot-Analysen oder Immunpräzipitationen ist nicht möglich, da der 22-1-1-Antikörper nur für Immunhistologien und Immunfluoreszenzfärbungen sowie FACS-Analysen und ELISA-Anwendungen geeignet ist (Engelsberg *et al.*, 2003).

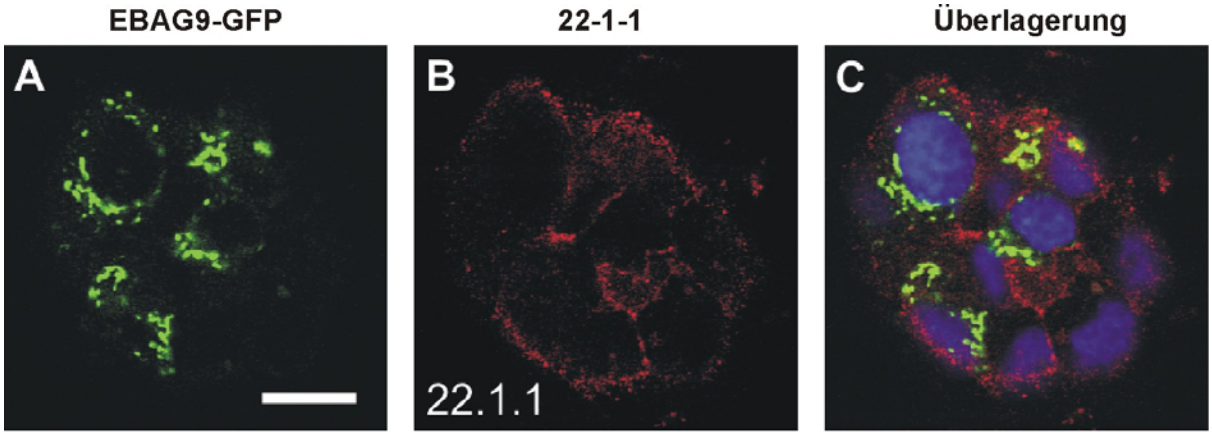

Abb. 1.2 Die subzelluläre Lokalisation von EBAG9 im Vergleich zum 22-1-1-definierten Antigen.
Mit EBAG9-GFP transfizierte MCF7-Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und mit dem 22-1-1-Antikörper gefärbt. Das 22-1-1-Antigen (rot) ist auf der Plasmamembran und in Vesikeln nahe dieser vorzufinden, wohingegen EBAG9 (grün) im perinukleären Bereich lokalisiert ist. Die Zellkerne (blau) wurden mit DAPI angefärbt (entnommen aus Engelsberg *et al.*, 2003).

Eine Gegenüberstellung der zellulären Verteilung der beiden Antigene *in situ* am Beispiel eines gesunden humanen Magengewebes und eines korrelierenden Tumorgewebes zeigen die immunhistologischen Analysen in den Abbildungen 1.3 und 1.4.

Im normalen Magengewebe wird das 22-1-1-definierte Antigen ausschließlich von den apikalen Mucosazellen exprimiert, währenddessen das EBAG9-Protein überwiegend in tieferen Zellschichten in den Haupt- und Belegzellen vorzufinden ist (Abb. 1.3).

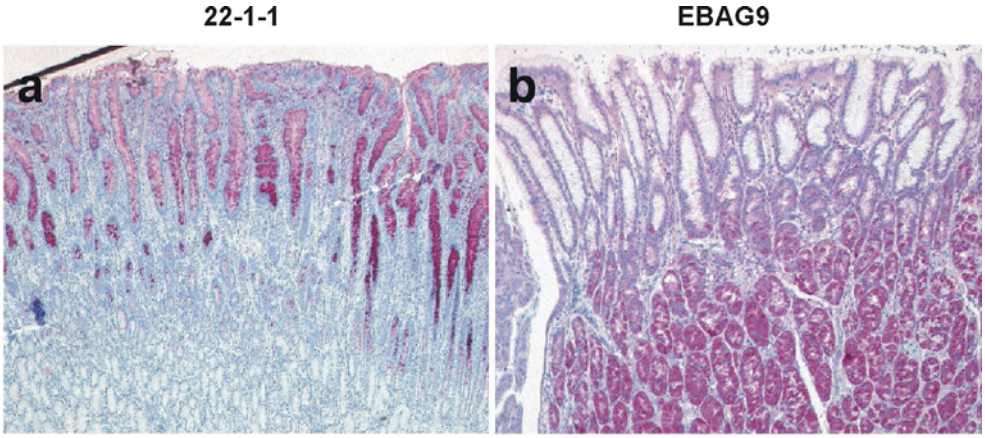

Abb. 1.3 Lokalisation des 22-1-1-definierten Antigens und des EBAG9-Proteins in normalem humanen Magengewebe.
Immunhistologische Analyse eines humanen, gesunden Magengewebes mit den monoklonalen Antikörpern 22-1-1 (a) und Ab-1 (b), der gegen rekombinantes EBAG9 gerichtet ist. Als Chromophor diente Fuchsin (rot) (entnommen aus Reimer *et al.*, 2005).

Im korrelierenden Tumorgewebe des Magens ist das EBAG9-Protein nur gering nachweisbar. Im Gegensatz dazu steht eine starke Expression des 22-1-1-definierten Antigens in den Siegelringzellen und im Sekret (Abb. 1.4)(Reimer *et al.*, 2005).

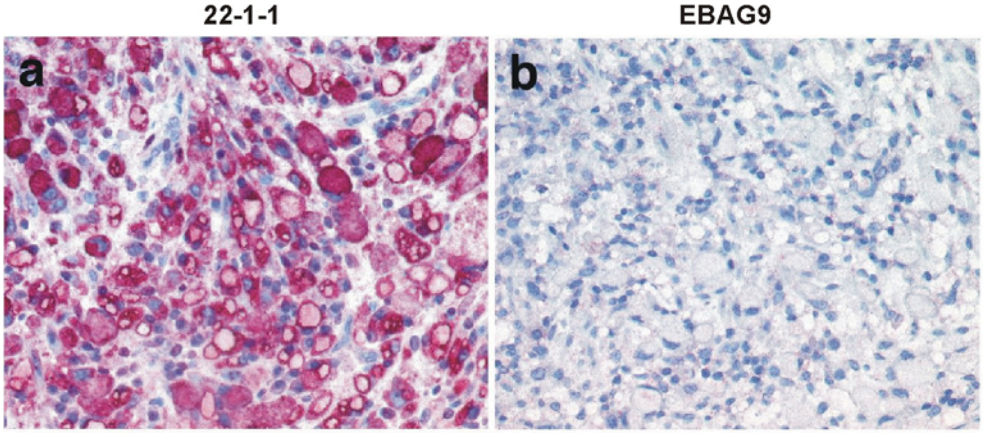

Abb. 1.4 Lokalisation des 22-1-1-definierten Antigens und des EBAG9-Proteins in einem Magenkarzinom.
Immunhistologische Analyse eines Siegelringzellkarzinoms des Magens mit den monoklonalen Antikörpern 22-1-1 (a) und Ab-1 (b) (entnommen aus Reimer *et al.*, 2005).

Diese unterschiedliche zelluläre Lokalisation *in situ* legt die Vermutung nahe, daß EBAG9 und das 22-1-1-definierte Antigen strukturell und funktionell distinkte Antigene sind und stellt die postulierte Funktion von EBAG9 als apoptoseinduzierendem Liganden in Frage. Diese Diskrepanz der Expressionsprofile zwischen dem 22-1-1-definierten Antigen und dem EBAG9-Protein wurde bereits zuvor in einer Arbeit von Aoki *et al.* aufgezeigt, ohne daß die Autoren zu diesem Zeitpunkt eine Erklärung liefern konnten (Aoki *et al.*, 2003; Noguchi *et al.*, 2001).

1.4 Der monoklonale Antikörper 22-1-1 erkennt das tumorassoziierte O-gekoppelte Glykan Tn

Mittels eines glykanspezifischen ELISA konnte die Identität des 22-1-1-definierten Antigens gezeigt werden (Engelsberg *et al.,* 2003). Es handelt sich um das Tn-Antigen (N-Acetyl-D-Galactosamine, GalNAc; CD175). Dagegen wird das sialylisierte Tn-Antigen (sTn) oder andere Glykanepitope nicht vom 22-1-1-Antikörper erkannt. Die Zuckernatur des 22-1-1-definierten Antigens konnte durch die chemische Deglykosylierung mit Periodat bestätigt werden, wodurch jegliche Reaktivität des 22-1-1-Antikörpers eliminiert wurde. Interessanterweise führte eine starke Überexpression von EBAG9 zu einer dosisabhängigen Generierung des 22-1-1-definierten Antigen sowie des komplexeren TF-Antigens (Galactoseβ1-3GalNAc) auf der Oberfläche von HEK293-Zellen. Den gleichen Effekt hatte auch die Behandlung der Zellen mit einem Inhibitor der O-Glykosylierung (Benzyl-α-GalNAc). Diese Beobachtung könnte erklären, warum EBAG9 durch „expression cloning“ in HEK293-Zellen als kodierende cDNA für das 22-1-1-definierte Antigen identifiziert wurde (Engelsberg *et al.,* 2003; Nakashima *et al.,* 1999). Außer in frühen Embryonalstadien und einigen Epithelgeweben (u.a. Magen und Ovar) werden die Vorläufermoleküle der O-Glykosylierung, wie es die Antigene Tn und TF sind, nicht in normalen und gesunden, sondern nur in malignen Geweben exprimiert (Springer 1984; Zhang *et al.,* 1997). Es wird vermutet, daß diese Antigene im Zusammenhang mit Zelladhäsion, -invasion und Metastasierung von Tumorzellen stehen (Cao *et al.,* 1995). Genauere Wirkungsweisen und Funktionen dieser Glykanantigene sind bisher nicht bekannt.

Ein direkter physiologischer oder pathophysiologischer Zusammenhang zwischen der Expression von EBAG9 und dem 22-1-1-definierten Antigen bzw. der Generierung von trunkierten O-Glykanen ist allerdings weiterhin unklar, da eine Korrelation zwischen der Expression von EBAG9 und dem 22-1-1-definierten Antigen in den bisher untersuchten humanen Tumor- und Normalgeweben sowie Zellinien nicht erkennbar ist. Wo das 22-1-1-definierte Antigen überwiegend tumorspezifisch exprimiert wird, vergleichbar dem Expressionsmuster des tumorassoziierten Tn-Antigens, ist die Expression von EBAG9 in den untersuchten Geweben vorwiegend ubiquitär und in Tumorgeweben im Vergleich zu normalen Geweben nicht erhöht (s.a. Abb. 1.3 und 1.4)(Engelsberg *et al.,* 2003; Reimer *et al.,* 2005; Tsuchiya *et al.,* 2001). Demgegenüber zeigen andere Studien eine Korrelation der EBAG9-Expression mit der Tumorprogression in Eierstock-, Prostata-, Leber- und Nieren-Tumoren sowie eine Duplizierung des *EBAG9*-Genlokus bei Brustkrebspatienten und legen eine Rolle für EBAG9 in der Tumorproliferation nahe (Akahira *et al.,* 2004; Aoki *et al.,* 2003; Ogushi *et al.,* 2005; Takahashi *et*

al., 2003; Tsuneizumi *et al.*, 2001). Es bedarf weiterer Analysen, um zu bestimmen, welche Funktion EBAG9 bei der malignen Transformation und Tumorprogression sowie der Entstehung von trunkierten O-Glykanen einnimmt. Sicher ist nur, daß dieses ubiquitär exprimierte Protein neben einer putativen Rolle in Tumorgeweben auch eine physiologische Rolle in normalen Geweben haben muß.

1.5 Vesikeltransport in eukaryotischen Zellen

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte das SNARE-assoziierte Protein Snapin als Interaktionspartner von EBAG9 identifiziert werden. Da Snapin über die Assoziation mit SNAP25 eine regulatorische Rolle in Ca^{2+}-regulierten Transportvorgängen einnimmt, wird im folgenden der Vesikeltransport im allgemeinen und der Mechanismus der Regulierten Exozytose im besonderen erläutert.

Ein Hauptmerkmal der eukaryotischen gegenüber den prokaryotischen Zellen ist die funktionelle Organisation der Stoffwechselwege in durch Lipiddoppelmembranen abgegrenzte Kompartimente, den Organellen. Um die Funktionsfähigkeit und Integrität der Zellen aufrechtzuerhalten ist der zielgerichtete Transport von neugebildeten und nicht membranpermeablen Substanzen zu bestimmten Kompartimenten erforderlich (Palade 1975). Die in membranumschlossenen Transportvesikeln verpackte Fracht, das können sowohl lösliche Substanzen im Inneren als auch in der Lipiddoppelschicht inkorporierte Transmembranproteine und Lipide sein, wird nach Transport zum Zielkompartiment mit diesem fusioniert und damit die Ladung in das Zellorganell eingebracht. Der Schlüsselschritt des Transportes ist die Fusion der vesikulären Membran mit der Zielmembran, da hierbei die elektrostatischen Abstoßungskräfte der elektrisch geladenen Lipiddoppelmembranen überwunden und hydrophobe Phospholipide in einer wässrigen Umgebung miteinander gemischt werden müssen. Die hohe zu überwindende Energiebarriere benötigt eine komplexe Maschinerie von Fusionsproteinen, den SNARE-Proteinen (*soluble NSF attachment protein receptors)* (Sutton *et al.*, 1998).

Die Fusion eines Transportvesikels mit der Plasmamembran, auch Sekretion oder Exozytose bezeichnet, kann durch zwei bekannte Mechanismen erfolgen und ermöglicht die Kommunikation in vielzelligen Organismen. Der eine bekannte Mechanismus ist die Ca^{2+}-unabhängige konstitutive Sekretion, bei der neusynthetisierte Membranproteine oder –lipide sowie Serumproteine und Komponenten der extrazellulären Matrix zur Plasmamembran transportiert und dort kontinuierlich ohne bestimmte Signale aus der Zelle ausgeschleust oder in die Membran eingebaut werden. Der andere Mechanismus ist die Ca^{2+}-regulierte Exozytose: Sie findet vermehrt in spezialisierten

polarisierten Zellen, wie Drüsen- und Nervenzellen, statt. Hier werden mit Hormonen, Verdauungsenzymen oder Neurotransmittern gefüllte Transportvesikel solange in der Zelle gespeichert, bis ein extrazelluläres Signal einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration induziert, wodurch schließlich die Fusion mit der Plasmamembran initiiert wird (Abb. 1.5) (Burgess und Kelly 1987; Kelly 1985).

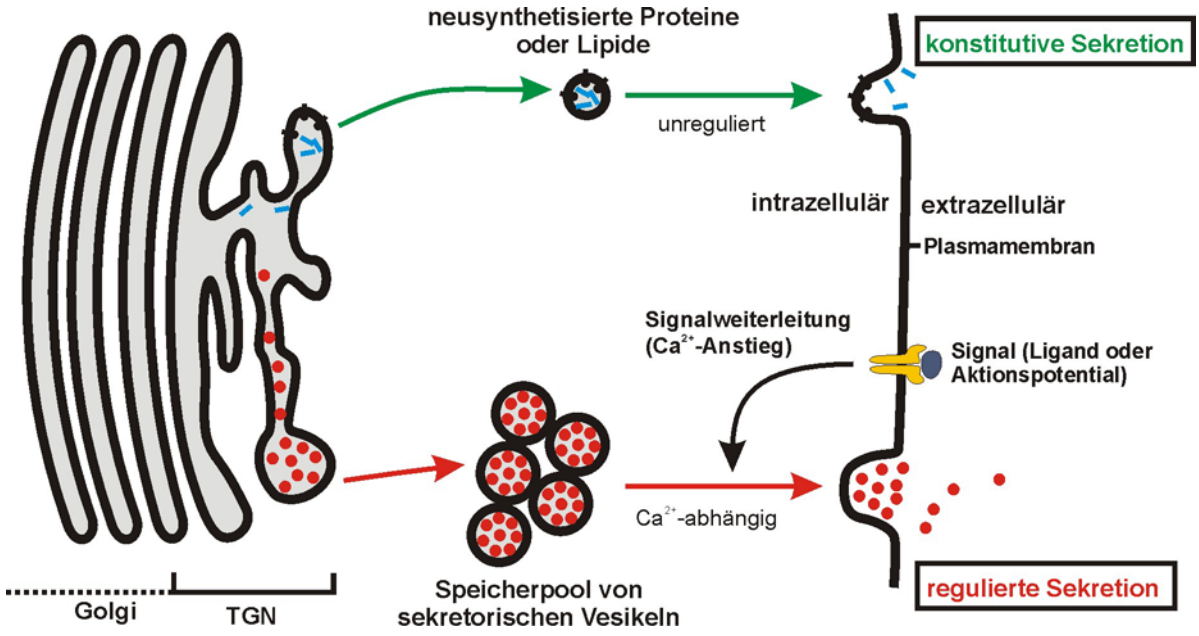

Abb. 1.5 Überblick über den sekretorischen Transportweg in eukaryotischen Zellen.
Dargestellt ist der Proteintransport vom TGN (Trans-Golgi-Netzwerk) zur Plasmamembran. Proteine oder Lipide können kontinuierlich sezerniert werden (konstitutive Sekretion) oder werden solange in Vesikeln gespeichert, bis ein Stimulus zu einem Anstieg der Ca^{2+}-Konzentration führt und somit die regulierte Sekretion auslöst (modifiziert nach Alberts *et al*., 2002).

1.6 Die Ca^{2+}-regulierte Exozytose ist ein universeller Mechanismus in einer Vielzahl von Zellen

Die stimulusabhängige Freisetzung von klassischen Neurotransmittern (z.B. Acetylcholin, GABA, Glutamat, und Glycin) und Katecholaminen (Dopamin, Adrenalin und Noradrenalin) durch kleine synaptische Vesikel (SSV: *small synaptic vesicles*) und große elektronendichte Vesikel (LDCV: *large dense-core vesicles)* in Neuronen bzw. neuroendokrinen Zellen sind die bekanntesten Beispiele für den Mechanismus der Ca^{2+}-regulierten Exozytose.

Das Prinzip der Ca^{2+}-abhängigen Freisetzung sekretorischer Granula ist aber nicht nur neuronalen und neuroendokrinen Zellen vorbehalten, sondern ist ein konservierter Mechanismus in einer

großen Zahl von Zelltypen nicht-neuronalen Ursprungs. Die Tab. 1.1 zeigt eine kleine Auswahl. Diese spezialisierten sekretorischen Zellen sind dabei nicht nur in sekretorisch aktiven Geweben lokalisiert, sondern finden sich auch in vorwiegend nicht-sekretorisch aktiven Geweben (z.B. Herz, Lunge oder Niere) (zur Übersicht: Burgoyne und Morgan 2003).

Tab. 1.1 Zelltypen mit Regulierter Exozytose

Zellart	Zelltypen	freigesetzte Mediatoren
Neuronale	verschiedene	Neurotransmitter, Katecholamine, Peptide
Neuroendokrine/ endokrine	Chromaffinzellen der Nebenniere Pankreas β-Inselzellen	Katecholamine, Neuropeptide Insulin
Exokrine	Brustdrüse Pankreas Azinuszellen Parotis	Casein Zymogene Zymogene
Hämatopoetische	Mastzellen Zytotoxische T-Zellen/NK-Zellen Thrombozyten	Histamin, Serotonin Granzym, Perforin Serotonin, von Willebrand-Faktor
andere	Spermazelle Eizelle alle Zelltypen (Lysosomen)	Fertilisationsenzyme (*acrosome reaction*) Fertilisationsmembran lysosomale Enzyme, Membranbestandteile

Von großer physiologischer Relevanz ist beispielsweise die regulierte Freisetzung von Insulin durch Pankreas β-Inselzellen zur Aufrechterhaltung der Glucose-Homöostase oder die Ca^{2+}-abhängige Sekretion von Mediatoren von Zellen der hämatopoetischen Zellreihe (z.B. Mastzellen, CTL, NK-Zellen) im Rahmen der Immunabwehr.

Die Ca^{2+}-stimulierte Fusion findet sich nicht nur in sekretorischen Zellen, sondern ist ein ubiquitärer Mechanismus eukaryotischer Zellen (Chavez *et al.,* 1996; Coorssen *et al.,* 1996; Ninomiya *et al.,* 1996). Inzwischen sehr gut charakterisiert ist beispielsweise die Ca^{2+}-induzierte Fusion von Lysosomen mit der Plasmamembran nach einer mechanischen Verwundung oder nach Bakterienbefall. Die freigesetzten lysosomalen Enzyme bzw. neuen Membranbestandteile dienen der Membranregeneration oder der Abwehr einer Bakterieninfektion (Chakrabarti *et al.,* 2003; Martinez *et al.,* 2000; McNeil und Steinhardt 1997; Reddy *et al.,* 2001; Roy *et al.,* 2004).

1.7 Mechanismus der Membranfusion am Beispiel der Neuroexozytose

Am besten verstanden ist der Prozeß der Regulierten Exozytose in neuronalen und neuroendokrinen Zellen. Der Mechanismus ist ein Spezialfall des allgemeinen Transportmechanismus, da er zusätzlich einen Ca^{2+}-Sensorapparat zur kontrollierten Freisetzung benötigt (Bennett *et al.*, 1997). Ein derzeitiges Modell des Ablaufs der Membranfusion zeigt die Abb. 1.6 am Beispiel der Neurotransmitterfreisetzung durch SSV. Eine zentrale Rolle nimmt dabei die Formierung des ternären SNARE-Komplexes ein, von der angenommen wird, daß sie die Fusion beider Membranen und die Ausbildung einer Fusionspore katalysiert (Zur Übersicht: Chen und Scheller 2001; Fernandez-Chacon und Südhof 1999; Jahn und Südhof 1999; Südhof 2004).

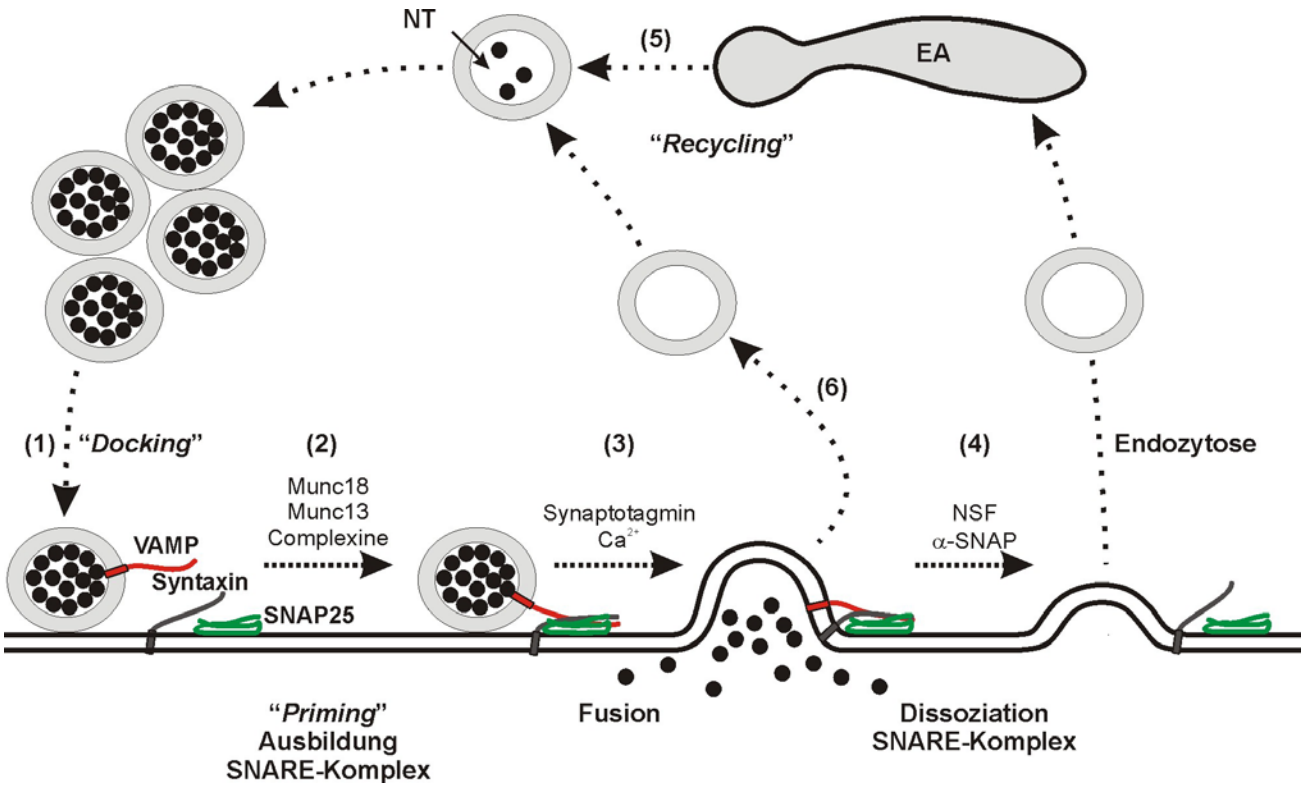

Abb. 1.6 Schematische Darstellung des Ablaufs der Exozytose durch synaptische Vesikel.
(1) Die mit Neurotransmitter (NT) gefüllten synaptischen Vesikel werden zur „aktiven Zone" transportiert und „docken" an die Plasmamembran. **(2)** ATP-abhängig wird der fusionskompetente SNARE-Komplex ausgebildet (*priming*). **(3)** Auf einen Ca^{2+}-Einstrom hin fusionieren Vesikel- und Plasmamembran. **(4)** Nach Dissoziation des SNARE-Komplexes erfolgt die Endozytose und Regenerierung des Fusionsapparates über das Endosom (EA). **(5)** Neue Vesikel knospen vom Endosom ab, werden erneut mit Neurotransmitter (NT) beladen und stehen anschließend einem neuen Vesikelzyklus zur Verfügung. **(6)** Alternativ kann bei einer „kiss-and run"-Fusion das Vesikel endosomen-unabhängig mit NT beladen werden.

Zunächst werden die mit Neurotransmitter gefüllten SSV zur „aktiven Zone" transportiert und treten dort SNARE-unabhängig in Kontakt mit der Plasmamembran (*docking*). Die an diesem initialen Schritt der Membranfusion beteiligten Proteine sind bisher nicht bekannt. Im Anschluß

kommt es zur Ausbildung des SNARE-Komplexes durch die Zusammenlagerung der SNARE-Proteine VAMP2 auf der Vesikelmembran und Syntaxin1 sowie SNAP25 auf der Plasmamembran. Mehrere regulatorische Proteine, u.a. Munc18-1, Munc13-1 und die Complexine unterstützen oder kontrollieren dabei die Ausbildung des exozytosekompetenten ternären SNARE-Komplexes. Dieser ATP-abhängige Reifungsprozeß wird auch als „Priming“ bezeichnet. Nur ein kleiner Anteil der in der aktiven Zone angedockten Vesikel ist fusionskompetent, d.h. akut freisetzbar und wird als „readily releasable pool“ (RRP) definiert.

Nach Erreichen eines Aktionspotentiales in der Präsynapse kommt es zur Depolarisation der präsynaptischen Membran und dadurch zum Öffnen spannungsabhängiger Ca^{2+}-Kanäle und zu einem Ca^{2+}-Einstrom aus dem extrazellulären Raum. Das vesikelassoziierte Protein Synaptotagmin erkennt wahrscheinlich als Ca^{2+}-Sensormolekül die lokale Erhöhung der Ca^{2+}-Konzentration und induziert durch die Wechselwirkung mit dem ternären SNARE-Komplex und Phospholipiden der Plasmamembran die Fusion der beiden Membranen und damit die Freisetzung der Neurotransmitter in den „Synaptischen Spalt“. Die Bindung der Neurotransmitter an Rezeptoren der postsynaptischen Zelle stimuliert wiederum die Entstehung eines neuen Aktionspotentials oder hat andere Auswirkungen abhängig vom Transmitter- und Rezeptortyp.

Der SNARE-Komplex wird anschließend durch die Chaperonwirkung der ATPase NSF (*N-ethylmaleimide sensitive factor*) unter Verbrauch von ATP im Zusammenspiel mit den NSF-Adapterprotein α-SNAP dissoziiert, und die freien Komponenten des SNARE-Komplexes werden auf diese Weise regeneriert. Die Wiederaufbereitung (*recycling*) der Komponenten des Fusionsapparates erfolgt nach clathrinabhängiger Endozytose über Endosomen. Neue Vesikel entstehen anschließend durch Knospung von Endosomen, werden mit Neurotransmitter beladen und können dann wieder in den Zyklus eintreten.

Die Fusion von Vesikel- mit der Plasmamembran kann auf mindestens zwei verschiedene Arten erfolgen. Zum einen als „volle Fusion“, bei der die Vesikelmembran in der Plasmamembran vollständig aufgeht, wonach der Fusionsapparat anschließend außerhalb der „aktiven Zone“ durch clathrinabhängige Endozytose über das Endosom regeneriert wird (s.o.). Bei der „kiss-and–run“-Fusion dagegen bleibt die Integrität des Vesikels erhalten und die Neurotransmitter werden über eine transiente Fusionspore in den Synaptischen Spalt entlassen, ohne daß eine Vermischung von Proteinen und Lipiden des synaptischen Vesikels und der Plasmamembran stattfindet. Anschließend können die Vesikel endosomenunabhängig regeneriert und mit Neurotransmitter beladen werden.

1.8 Die Proteinkomponenten der Membranfusion

Die am Membranfusionsprozeß beteiligten Proteine haben bei verschiedenen Schritten der Exozytose eine spezifische Funktion. Das Zusammenspiel aller Komponenten gewährleistet die Spezifität und zeitliche Koordination der Ca^{2+}-regulierten Exozytose.

1.8.1 Die SNARE-Proteine

Die Superfamilie der SNAREs umfaßt inzwischen mehr als 60 Mitglieder. Anhand der Proteinstruktur und Lokalisation lassen sich die SNAREs in zwei Klassen unterteilen. Die vorwiegend auf der Vesikelmembran befindlichen Homologen der Synaptobrevin-Familie werden als v-SNARE (*vesicle*-SNARE) bezeichnet, wohingegen die plasmamembranständigen Homologen der Syntaxin- und SNAP25-Familie als t-SNARE (*target*-SNARE) bezeichnet werden (Rothman 1994; Söllner *et al.,* 1993; Sutton *et al.,* 1998). Jeweils homologe Proteine der drei SNARE-Familien sind in analogen intrazellulären Transportschritten zwischen verschiedenen Zellkompartimenten beteiligt (Jahn und Südhof 1999; Südhof 1995).

Ein Merkmal aller SNARE-Proteine ist eine ca. 60-70 AS umfassendes SNARE-Motiv, welches durch in regelmäßiger Abfolge von hydrophoben und hydrophilen Aminosäureseitengruppen die Ausbildung von α-Helices, sog. *coiled-coils*, begünstigt (Weimbs *et al.,* 1997; Weimbs *et al.,* 1998). Diese untereinander interagierenden α-Helices begünstigen die Zusammenlagerung von Syntaxin1, VAMP2 (*vesicle-associated membrane protein*) und SNAP25 (*synaptosomal-associated protein of 25kDa*) zu einem parallelen Vier-Helixbündel und werden als *core*-Komplex des ternären SNARE-Komplex bezeichnet, an dessen Enden die Transmembrandomänen bzw. Membrananker herausragen. Das Zentrum, der sog. O-*layer*, wird durch die ionische Wechselwirkung von drei Glutaminresten (Q)- und einem Argininrest (R) gebildet. Diese hoch konservierten Aminosäuren sind die Grundlage für eine alternative Klassifikation der SNARE-Proteine in R-SNAREs (für die v-SNAREs) und Q-SNAREs (für die t-SNAREs) (Fasshauer *et al.,* 1998b; Sutton *et al.,* 1998).

Die Entdeckung der clostridiellen Neurotoxine Botulinustoxin und Tetanustoxin zeigte die fundamentale Bedeutung der exozytosevermittelnden SNARE-Proteine für die Neurotransmitterfreisetzung. Diese Zn^{2+}-Proteasen schneiden spezifisch die synaptischen SNARE-Proteine Syntaxin1, Synaptobrevin2/VAMP2 und SNAP25 und inhibieren die Neuroexozytose (Blasi *et al.,* 1993a; Blasi *et al.,* 1993b; Schiavo *et al.,* 1992).

Im synaptischen *core*-Komplex liegen VAMP2, Syntaxin1 und SNAP25 im äquimolaren Verhältnis vor, wobei SNAP25 zwei α-Helices zur Ausbildung der Vier-Helixbündel beiträgt. SNAP25 ist durch Palmitylierung von zentralen Cysteinseitenketten an der Plasmamembran verankert, wobei

sich beidseitig der Cysteinreste jeweils ein SNARE-Motiv befindet. VAMP2 und Syntaxin1 besitzen jeweils C-terminale Transmembranregionen, an die sich N-terminal ein SNARE-Motiv anschließt. Dieser sehr stabile heterotrimere Komplex kann im Gegensatz zu den nicht-komplexierten SNARE-Proteinen nicht von clostridiellen Neurotoxinen gespalten werden. Die besondere Stabilität des SNARE-Komplexes zeigt sich auch in der äußerst hohen Thermostabilität und SDS-Resistenz (Fasshauer *et al.*, 1998a; Fasshauer *et al.*, 1997; Hayashi *et al.*, 1994). Aufgrund dieser Eigenschaften wird der SNARE-Komplex auch als SDS-resistenter Komplex bezeichnet.
Es wird vermutet, daß die Ausbildung des energiearmen SNARE-Komplexes die Energie liefert, um die Abstoßungskräfte bei der Zusammenführung der fusionierenden Membranen zu überwinden (Brunger 2000; Fasshauer 2003; Jahn und Hanson 1998; McNew *et al.*, 2000; Sutton *et al.*, 1998). Bekräftigt wird diese Hypothese durch die Beobachtung, daß die isolierten SNAREs ohne weitere Faktoren in der Lage sind, künstlich hergestellte Liposomenmembranen zu fusionieren, und bilden somit die minimale Fusionsmaschinerie (Weber *et al.*, 1998). Allerdings erfolgt die Fusion in diesem *in vitro*-Membranfusionsexperiment mit einer Halbwertzeit von 10 min, also mit einer viel langsameren Kinetik als in der Zelle. Daher müssen *in vivo* weitere Proteine regulativ in den Prozeß der Membranfusion eingreifen, um eine schnelle Reaktion auf ein Ca^{2+}-Signal zu gewährleisten (Brunger 2001).

1.8.2 Die Sec1/Munc18-Proteinfamilie

Die Sec1/Munc18-Proteine (SM-Proteine) sind zumeist zytosolische Proteine, die unabhängig in Hefe (SEC1, SLY1, VPS33, VPS45), *D. melanogaster (*ROP*), C. elegans* (unc-18) und Säugern (Munc18) identifiziert wurden. Vergleichbar den SNARE-Proteinen existieren verschiedene evolutionär hoch konservierte SM-Homologe und nehmen essentielle Rollen in unterschiedlichen Transportvorgängen ein. Die Inaktivierung der SM-Gene in allen Spezies führt zu einer vollständigen Blockade der jeweiligen Transportvorgänge (Jahn und Südhof 1999).
In höheren Organismen konnten neben ubiquitär exprimierten SM-Proteinen auch neuronenspezifische, exozytoserelevante Isoformen identifiziert werden, wie das Munc18-1-Protein in Säugern. Trotz der fundamentalen Bedeutung ist die Funktionsweise der SM-Proteine bisher wenig verstanden, obwohl die Assoziation verschiedener SM-Proteine mit Mitgliedern der Syntaxin-Familie einen Hinweis auf die Funktionsweise der SM-Proteine zu liefern scheint. Beispielsweise interagiert Munc18-1 ausschließlich mit monomerem Syntaxin1 und nicht mit Syntaxin1-Molekülen, die bereits im Komplex mit SNAP25 oder im ternären SNARE-Komplex vorliegen. Dieser Munc18-1/Syntaxin1-Komplex stabilisiert die sogenannte *closed* Konformation

von Syntaxin1, in der das SNARE-Motiv abgeschirmt ist und somit die Assoziation von Syntaxin1 mit VAMP2 und SNAP25 verhindert wird. Es wurde ein Modell postuliert, in dem Munc18-1 die Verfügbarkeit von Syntaxin1 für die SNARE-Komplexbildung kontrolliert und somit eine negative regulatorische Rolle bei der Ausbildung des SNARE-Komplexes einnimmt (Pevsner *et al.,* 1994; Yang *et al.,* 2000). Eine rein inhibitorische Funktion von Munc18-1 in der Membranfusion ist jedoch angesichts des essentiellen Charakters des Proteins unwahrscheinlich. Dies zeigt auch die Deletion von Munc18-1 in Mäusen, die kurz nach der Geburt sterben und keinerlei synaptische Aktivität besitzen (Verhage *et al.,* 2000). Obwohl Munc18-1 und Syntaxin1 *in vivo* interagieren, ist die biologische Relevanz des Munc18-1/Syntaxin1-Komplexes weiterhin ungeklärt und läßt vermuten, daß sich die Munc18-1-Funktion nicht auf die Interaktion mit Syntaxin1 beschränkt. Der Schlüssel zum Verständnis der Funktionsweise der SM-Proteine könnte in anderen mit Munc18-1 interagierenden Proteinen liegen, wie Munc13-1, Tomosyn, DOC2, Mint1 und den Rab-Proteinen (Li und Chin 2003).

1.8.3 Die Rab-Proteine

Eine zentrale Rolle im Prozeß der Anlagerung von Vesikeln an die Zielmembran (*docking*) wird den Rab-Proteinen zugeschrieben. Diese kleinen GTPasen sind in ihrer aktiven GTP-gebundenen Form durch Geranylierung in Membranen verankert. Nach Hydrolyse von GTP zu GDP und Verlust ihres Geranylgeranylrestes wechseln sie in die zytosolische, GDP-gebundene inaktive Form.

Die bekanntesten Vetreter sind die auf sekretorischen Vesikeln lokalisierten Säugetierhomologe Rab3A und die Isotypen Rab3B, Rab3C und Rab3D. Überexpressionsmodelle postulieren für die Rab3-Proteine eine Funktion im „Docking“-Prozeß und in der Vesikelbiogenese, also einen Schritt vor der eigentlichen Membranfusion (Pfeffer 2001; Zerial und McBride 2001). Die Deletion aller vier Isoformen in der Maus zeigt hingegen, daß die Rab3-Proteine nicht essentiell für die regulierte Neurotransmitterfreisetzung sind und stattdessen eine modulatorische Rolle zeitlich nach der Ausbildung des SNARE-Komplexes einnehmen und nicht an der Vesikelbiogenese, am Vesikeltransport, „Docking“ oder „Priming“ beteiligt sind (Geppert *et al.,* 1994a; Schluter *et al.,* 2004). Dies steht im starken Kontrast zu den Erkenntnissen in Hefezellen. Dort wird die essentielle Rolle der Rab-Proteine am zielgerichteten Transport nicht angezweifelt (Cao *et al.,* 1998; Ungermann *et al.,* 1998). Diese Unterschiede in der Funktionsweise von Rab-Proteinen in Hefen und Säugern lassen vermuten, daß die Rab-Proteine im Verlauf der Evolution ihre essentielle Funktion hin zu einem rein modulatorischen Effekt gewandelt haben (Jahn und Südhof 1999).

1.8.4 Die Synaptotagmine

Im Gegensatz zur konstitutiven Sekretion benötigt die Ca^{2+}-regulierte Membranfusion ein Kopplungsprotein, welches das Ca^{2+}-Signal in Membranfusion übersetzt. Der zurzeit beste Kandidat als Ca^{2+}-Sensor ist Synaptotagmin.

Die Familie der Synaptotagmine (Syts) umfaßt in Säugerzellen mindestens 15 Mitglieder von integralen Transmembranproteinen, die vorwiegend auf sekretorischen Vesikeln lokalisiert sind. Einige Isoformen wie Syt I, II, III, V, IX und X werden ausschließlich in Neuronen und neuroendokrinen Zellen exprimiert, andere wiederum wie Syt VI, VII, VIII sind ubiquitär verteilt (Hudson und Birnbaum 1995; Marqueze *et al.,* 2000; Tucker und Chapman 2002). Kein Mitglied konnte allerdings in Hefen identifiziert werden, was vermuten läßt, daß die Synaptotagmine nicht an fundamentalen Membrantransportprozessen beteiligt sind. Alle Synaptotagmine sind charakterisiert durch eine N-terminale Transmembrandomäne und eine große zytosolische Domäne. Der zytosolische Bereich besitzt zwei Calcium- und Phospholipid-bindende sogenannte C2-Domänen, die C_2A und C_2B genannt werden (Schiavo *et al.,* 1998; Ubach *et al.,* 1998). C2-Domänen wurden zuerst in einigen Isoformen der Proteinkinase C beschrieben und sind für die Ca^{2+}-abhängige Bindung an Membranen verantwortlich (Perin *et al.,* 1990).

Die unterschiedlichen Synaptotagminisoformen sind in verschiedene Ca^{2+}-abhängige Fusionsprozesse involviert. Syt I, II, III, IV und VII und IX nehmen eine regulatorische Rolle bei der Freisetzung von SSV und LDCV ein (Bai und Chapman 2004), Syt I und II bei der Histaminfreisetzung in Mastzellen (Baram *et al.,* 2001), die Syts III, V, VII, VIII und IX in der Insulinsekretion von Pankreas β-Inselzellen (Gao *et al.,* 2000; Gut *et al.,* 2001; Iezzi *et al.,* 2004), Syt VIII bei der Akrosomreaktion (Hutt *et al.,* 2002) und die ubiquitär exprimierte Isoform Syt VII bei der Fusion von Lysosomen mit der Plasmamembran (Reddy *et al.,* 2001)(s.a. Kap. 1.6).

Am besten charakterisiert ist Synaptotagmin I, das als Ca^{2+}-Sensormolekül auf SSV und LDCV lokalisiert ist (Matthew *et al.,* 1981; Walch-Solimena *et al.,* 1993). Durch Wechselwirkungen mit einer Vielzahl von Komponenten des Fusionsapparates kommt diesem Protein eine Schlüsselrolle bei der Regulierten Exozytose zu. Es bindet in Gegenwart von Ca^{2+} an Membranphospholipiden mit einer halbmaximalen Bindung bei Ca^{2+}-Konzentrationen von 6-60 µM. Die Bindung führt zu einem Eintauchen des Synaptotagmin I-Moleküls in die Membran (Davis *et al.,* 1999). Die Ca^{2+}-Affinität korreliert mit der durch ein Aktionspotential in Synapsen freigesetzten Konzentration an Ca^{2+}-Ionen, die je nach Typ der Synapse zwischen 5-200 µM liegt (Bollmann *et al.,* 2000; Heidelberger *et al.,* 1994; Schneggenburger und Neher 2000). Des weiteren geht Syt I sowohl homomere und heteromere Oligomerisierungen mit anderen Synaptotagminisoformen ein, aber auch Assoziationen

mit monomerem Syntaxin1 und SNAP25 sowie dem ternären SNARE-Komplex wurden gefunden (Brose *et al.,* 1992; Chapman *et al.,* 1995; Davis *et al.,* 1999; Perin *et al.,* 1991; Zhang *et al.,* 2002). Die Bindungsaffinitäten dieser Interaktionen werden dabei in Gegenwart von Calcium stark erhöht.
Die physiologische Bedeutung von Synaptotagmin als Ca^{2+}-sensitive Komponente der Exozytose zeigt der Phänotyp deletierter Mäuse. Diese Tiere sind nur zwei Tage lebensfähig, und es fehlt ihnen die schnelle, synchrone Komponente der Neurotransmitterfreisetzung. Der langsame, asynchrone sowie spontane Freisetzungsprozeß ist hingegen nicht betroffen. Diese Interpretation wird durch die Analyse von Mäusen gestützt, die eine Synaptotagmin I-Variante mit erniedrigter Ca^{2+}-Affinität exprimieren und denselben Phänotyp zeigen (Fernandez-Chacon *et al.,* 2001; Geppert *et al.,* 1994b; Voets *et al.,* 2001). Für die exakte Funktion von Synaptotagmin werden derzeit verschiedene Modelle beschrieben. Es wäre denkbar, daß Syt I zunächst Ca^{2+}-unabhängig an den partiell assemblierten SNARE-Komplex bindet und erst der durch ein Aktionspotential hervorgerufene Anstieg der Ca^{2+}-Konzentration den Weg zu einer vollständigen Assemblierung des SNARE-Komplexes freimacht und so die Fusion im Zusammenspiel mit dem Eindringen von Syt I in die Plasmamembran einleitet (Südhof 2004; Tucker und Chapman 2002). Die modulatorischen Effekte der Überexpression von Syt I und Syt IV auf die Ausbildung, Ausdehnung und Stabilität der Fusionspore stehen damit im Einklang (Wang *et al.,* 2001).
Neben der Rolle als Ca^{2+}-Sensor sind mehrere Synaptotagminisoformen außerdem am Prozeß der clathrinvermittelten Endozytose beteiligt - sowohl im Verlauf der Neurotransmitterexozytose, aber auch bei Endozytoseprozessen in nicht-neuronalen Zellen. Die Syts fungieren dabei als Akzeptor für AP2 und vermitteln die Bildung von Clathrinkomplexen (Haucke und De Camilli 1999; Haucke *et al.,* 2000; Nicholson-Tomishima und Ryan 2004; von Poser *et al.,* 2000; Zhang *et al.,* 1994).

1.8.5 Snapin, ein Modulator der regulierten Membranfusion

Der in dieser Arbeit identifizierte Interaktionspartner von EBAG9, Snapin, ist ein modulatorisches Molekül der synaptischen Transmission, aber auch der Exozytose von LDCV in chromaffinen Zellen. Die modulatorische Eigenschaft wird durch die Assoziation von Snapin mit dem t-SNARE-Molekül SNAP25 vermittelt, wobei die Bindung von Snapin an SNAP25 zu einer verstärkten Rekrutierung des Ca^{2+}-Sensormoleküls Synaptotagmin I zum synaptischen SNARE-Komplex führt. Die Bindungsaffinität der Snapin-SNAP25-Assoziation kann dabei durch PKA-abhängige Phosphorylierung von Snapin an Aminosäureposition 50 erhöht werden und resultiert damit auch in

einer erhöhten Rekrutierung von Synaptotagmin zum SNARE-Komplex (Chheda *et al.*, 2001; Ilardi *et al.*, 1999).

Funktionell führt die Expression einer phosphomimetischen Mutante (S50D) zu einer erhöhten Freisetzung von LDCV in chromaffinen Zellen, wobei sowohl der exozytotische „Burst“ als auch die Kinetik der langsamen, verzögerten Freisetzung (*sustained component*) erhöht ist. Die erhöhte Anzahl der akut freisetzbaren Vesikel des „readily releasable pool“ (RRP) läßt vermuten, daß Snapin zur Ausreifung des exozytosekompetenten SNARE-Komplexes beiträgt und ließe sich mit einer verstärkten Rekrutierung von Synaptotagmin zum SNARE-Komplex erklären (Chheda *et al.*, 2001).

Die Erkenntnisse über die Beteiligung von Snapin an der Ca^{2+}-abhängigen Freisetzung von SSV hingegen sind zurzeit nicht einheitlich. In einem „loss of function“-Ansatz führt die Injektion der SNAP25-Bindungsdomäne von Snapin oder davon abgeleiteter Peptide zu einer reduzierten synaptischen Transmission in kultivierten Neuronen (*superior cervical ganglion*). Sowohl die SNAP25-Bindungsdomäne als auch die abgeleiteten Peptide unterbinden die Bindung der Wildtypvariante von Snapin an SNAP25. Dieser dominant-negative Effekt führt dann folgerichtig zu einer Inhibition der Assoziation von Synaptotagmin und dem synaptischen SNARE-Komplex in der Gegenwart der SNAP25-Bindedomäne von Snapin (Ilardi *et al.*, 1999). Die Überexpression der phosphomimetischen S50D-Snapinvariante hat in hippokampalen Neuronen hingegen nicht den erwarteten gegenteiligen Effekt, sondern führt zu einer Erniedrigung der akut freisetzbaren Vesikel des RRP. Dieser negative Effekt auf die Exozytose wird durch eine Erhöhung der durchschnittlichen Ausschüttungswahrscheinlichkeit (*probability of release*) der Vesikel kompensiert, so daß schließlich kein Effekt auf die EPSC-Amplitude (*evoked postsynaptic currents*) beobachtet wird. Die erhöhte Freisetzungswahrscheinlichkeit und damit schnellere Erschöpfung des RRP führt jedoch bei einer hochfrequenten repetitiven Stimulierung zu einer erhöhten Depressionsrate der EPSC-Amplituden (*synaptic depression*) (Thakur *et al.*, 2004).

Zunächst wurde Snapin als neuronenspezifisch charakterisiert mit einer spezifischen Lokalisation auf sekretorischen Vesikeln (SSV und LDCV) (Ilardi *et al.*, 1999). Nachfolgende Arbeiten zeigten derweil, daß Snapin ein ubiquitär exprimiertes Protein ist und zumindest in Zellen nicht-neuronalen Ursprungs (COS-7, 3T3 Adipocyten) vorwiegend im Zytosol lokalisiert ist. Dieses Molekül ist allerdings auch membranassoziiert auf der Plasmamembran und in bisher nicht näher charakterisierten intrazellulären Kompartimenten vorzufinden. Des weiteren ist Snapin in der Lage, mit dem ubiquitären Homolog von SNAP25, SNAP23, zu interagieren und einen ternären Komplex mit Syntaxin4 auszubilden (Buxton *et al.*, 2003). Eine eher allgemeinere Rolle von Snapin in

Membrantransportprozessen wird auch durch jüngere Untersuchungen gestützt, die Snapin als Interaktionspartner des BLOC-1-Komplex (*biogenesis of lysosome-related organelles complex-1*) oder der Adenylatcyclase VI identifizierten (Chou *et al.*, 2004; Starcevic und Dell'Angelica 2004).

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Anfänglich wurde das *RCAS1/EBAG9*-Genprodukt über den tumorspezifischen Antikörper 22-1-1 definiert. Inzwischen gilt es als gesichert, daß das ubiquitär exprimierte EBAG9-Protein und das vorwiegend in Tumorzellen vorkommende 22-1-1-definierte Antigen strukturell und funktionell nicht identisch sind.

Bei dem 22-1-1-definierten Antigen handelt es sich nicht um ein Protein/Peptidepitop, sondern um das Tn-Antigen (N-Acetyl-D-Galactosamine, GalNAc), einem Vorläufermolekül der O-Glykosylierung. Die Überexpression von EBAG9 führt in HEK293-Zellen zwar zu einer Generierung solcher zumeist tumorassoziierter, trunkierter O-Glykane (wie das Tn-Antigen), die Expression von EBAG9 und des 22-1-1-Antigens korrelieren *in situ* allerdings nur partiell. Während das 22-1-1-definierte Antigen vorwiegend nur von Tumorzellen exprimiert wird, ist EBAG9 ein ubiquitär exprimiertes Molekül. Eine alleinige Rolle von EBAG9 als Modulator der O-Glykosylierung ist daher eher unwahrscheinlich. Die physiologische Rolle dieses in allen Geweben vorkommenden Genprodukts ist vollständig ungeklärt.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit sollte die Identifizierung von Bindungspartnern des EBAG9-Proteins unter Verwendung des Hefe-2-Hybrid-Systems sein. Daran anschließend sollten die Interaktionen charakterisiert und mögliche funktionelle Konsequenzen untersucht werden. Das Wissen über bekannte Interaktionspartner könnte einen Einblick in die physiologische Funktion von EBAG9 geben und möglicherweise einen Hinweis liefern, wie diese im Zusammenhang mit der Entstehung des 22-1-1-definierten Antigens stehen.

Um die Funktion von EBAG9 *in vivo* analysieren zu können, sollte des weiteren das EBAG9-Gen in der Maus durch die Methode der homologen Rekombination in embryonalen Stammzellen inaktiviert werden. Aufgrund der ubiquitären Expression von EBAG9 sollte neben einer konstitutiven auch eine induzierbare/konditionelle *Knockout*-Linie unter Verwendung des Cre/loxp-Systems generiert werden. Die anschließende Charakterisierung der EBAG9-deletierten Mäuse sollte vor dem Hintergrund der identifizierten Interaktionspartner von EBAG9 sowie der daraus vermuteten Funktionen erfolgen.