

Nikolas Haaß

Dr. med.

Genstruktur, Expression und intrazelluläre Lokalisierung von Pantophysin

Geboren am 19.09.1969 in Mannheim

Reifeprüfung am 11.05.1989 am Karl-Friedrich-Gymnasium in Mannheim

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1990/1991 bis WS 1998/1999

Physikum am 03.09.1992 an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Klinisches Studium im Universitäts-Klinikum Mannheim / Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Praktisches Jahr im Universitäts-Klinikum Mannheim / Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Staatsexamen am 17.11.1998 an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Promotionsfach: Zell- und Tumorbioogie / Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)

Doktorvater: Prof. Dr. med. Rudolf E. Leube

Die Publikation von cDNA-Sequenzen für Pantophysin der Ratte und des Menschen, die Ähnlichkeiten mit denen für das synaptische Vesikelprotein Synaptophysin aufwiesen, deren mRNA aber ubiquitär in verschiedenen Zell- und Gewebetypen nachgewiesen werden konnte, bildete den Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit. Ziel war es, die Genstruktur und Proteinexpression von Pantophysin zu untersuchen, um die Verwandtschaft mit Synaptophysin näher zu charakterisieren und um Hinweise auf mögliche Funktionen des Polypeptids für den konstitutiven zellulären Membrantransport zu erhalten.

Aus einer λ -Phagen-Genbibliothek wurde das gesamte murine Pantophysin-Gen auf mehreren überlappenden Klonen isoliert. Der Genloкус wurde komplett kartiert, und es wurde die vollständige Nukleinsäuresequenz des Pantophysin-Gens und benachbarter Regionen von über 23 kbp bestimmt. Aus dem Vergleich der Gensequenz mit der murinen cDNA, die durch RT-PCR isoliert wurde, und mit den bekannten cDNA-Sequenzen von Ratte und Mensch

ergab sich, daß das Gen aus sechs Exons besteht. Die Intron/Exon-Übergänge entsprechen exakt den korrespondierenden Positionen in Synaptophysin, weisen aber in Länge und Sequenz keine signifikanten Ähnlichkeiten auf. Allerdings fehlt Intron 6, das bei Synaptophysin die 3'-nicht-kodierende Region unterbricht. In der GC-reichen Promoterregion fehlt eine TATA-Box.

Das Pantophysin-Gen kodiert für ein 261 Aminosäuren langes Polypeptid mit einem errechneten Molekulargewicht von 28.926 (einschließlich Start-Methionin). Ebenso wie bei Synaptophysin fallen bei Pantophysin vier hydrophobe Regionen auf, die vermutlich Transmembrandomänen ausbilden. Diese stellen, ebenso wie die intravesikulär gelegenen Schleifenregionen mit ihren paarweise vorliegenden Cysteinen und einer potentiellen N-Glykosylierungsstelle, die Bereiche höchster Konservierung dar. Im Gegensatz zu diesen sehr ähnlichen Bereichen weisen die zytoplasmatischen Enden keine Ähnlichkeiten zwischen den Physin-Isoformen auf. Unterschiede bestehen außerdem im errechneten isoelektrischen Punkt (9,00 für Pantophysin der Maus bzw. 8,45 für Pantophysin des Menschen gegenüber 4,74 für Synaptophysin der Ratte bzw. 4,49 für Synaptophysin des Menschen) und in der geringen Wahrscheinlichkeit, α -Helices im Bereich der vermuteten Transmembranregionen auszubilden.

In Northern-Blot-Experimenten konnte bestätigt werden, daß Pantophysin der Maus ähnlich wie die Pantophysine anderer Spezies ubiquitär in nicht-neuroendokrinen Zellen und in etwas geringerer Menge in neuroendokrinen Zellen exprimiert wird. Zur Untersuchung der Proteinexpression wurden in Kaninchen, Meerschweinchen und Hühnern Antikörper gegen Peptidomänen von Pantophysin des Menschen und der Maus generiert und anschließend affinitätsgereinigt. Mit ihrer Hilfe wurde an verschiedenen Zelllinien immunfluoreszenzmikroskopisch gezeigt, daß sich Pantophysin in multiplen punktförmigen Strukturen im Zytoplasma befindet, die sich deutlich von Lysosomen abgrenzen lassen, eine partielle Überlappung mit Golgi- und Endozytose-Vesikeln aufweisen und besonders große Übereinstimmung mit SCAMP- und Brevin-positiven Strukturen, d.h. konstitutiven Transport-Sekret-Vesikeln, zeigen. In transfizierten Zellen konnte zudem eine deutliche Überlappung der Fluoreszenzmuster zwischen Pantophysin und Synaptophysin nachgewiesen werden. In immunelektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß es sich bei den Pantophysin-positiven Strukturen um Vesikel handelt. Obwohl sich der Großteil der Immunogoldpartikel in elektronenoptisch leer erscheinenden Vesikeln mit einer glatten

Oberfläche und einem Durchmesser von unter 100 nm befand, konnten auch andere größere membranhaltige Strukturen identifiziert werden, die sich mit Pantophysin-Antikörpern markieren ließen. Mit Hilfe von Immunisolierungsexperimenten in kultivierten Zelllinien, transfizierten Zelllinien und nativen Geweben konnte gezeigt werden, daß Pantophysin-Vesikel sowohl die ubiquitären Vesikelmarker Cellubrevin und SCAMP als auch den neuronalen Verwandten Synaptophysin enthalten.

Mit den immunologischen Reagenzien für Pantophysin und Antikörpern, die gegen eine konservierte Domäne der Brevine generiert wurden, wurde in immunhistologischen Untersuchungen an Geweben gezeigt, daß gewisse Ähnlichkeiten in der Expression der Brevine und von Pantophysin bestehen, wobei insbesondere eine starke Expression in den *Tubuli seminiferi* des Hoden auffiel. Beim Vergleich zwischen der Expression von Synaptophysin mit Pantophysin bzw. mit den Brevinen stellte sich heraus, daß Synaptophysin erwartungsgemäß nur in neuroendokrinen Zellen nachweisbar ist, daß hier aber eine partielle Überlappung mit den konstitutiven Vesikelmarkern besteht, die sich auch biochemisch in Immunisolierungsexperimenten von Pantophysin-Vesikeln bestätigen ließ.

Um die Bedeutung von Pantophysin für den konstitutiven Membrantransport zu untersuchen, wurde zum Abschluß der Arbeit ein Gen-“Targeting“-Konstrukt hergestellt, mit dem in der Zwischenzeit das murine Pantophysin-Gen in embryonalen Stammzellen inaktiviert werden konnte.