

Aus dem Institut für klinische Zytobiologie und Zytopathologie  
Direktor: Prof. Dr. Roland Lill  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

# **Die Rolle von Galectin-3 während der Prozessierung von pre-mRNA**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie  
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Medizin  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Katharina Fritsch**  
aus Sonneberg

Marburg, 2016



Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am 23.09.2016

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Prof. Dr. Ralf Jacob

1. Koreferent: Prof. Dr. Uwe Maier

**Für meine Familie,  
vor allem für meine Eltern und Oma Ilse**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
	Summary	2
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>3</b>
2.1	Das pre-mRNA Spleißen	3
2.1.1	pre-mRNA Spleißen, Introns und Exons	3
2.1.2	Die Spleißreaktion	4
2.1.3	Der Zusammenbau des Spleißosoms und die U snRNPs	5
2.1.4	Das alternative Spleißen	8
2.1.5	Erkrankungen	9
2.2	Die Spleißkomponenten hnRNPA2B1, U2AF65 und U1 70k	10
2.2.1	hnRNPA2B1	10
2.2.2	U1 snRNP und U1 70k	13
2.2.3	U2AF65 und U2 snRNP	15
2.3	Galectine	17
2.3.1	Galectin-3	18
2.4	Fragestellung der Arbeit	25
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>26</b>
3.1	Geräte, Chemikalien und Materialien	26
3.1.1	Geräte	26
3.1.2	Chemikalien und Materialien	27
3.2	Allgemeine Puffer	29
3.3	Zellkultur	30
3.3.1	verwendete Zelllinien	30
3.3.2	Medien und Lösungen	30
3.3.3	Kultivierung	30
3.3.4	Passagieren	31
3.3.5	Einfrieren und Auftauen	31
3.3.6	Zellen zählen	31
3.3.7	Transfektion	32

3.4	Molekularbiologische Methoden	33
	3.4.1 RNA-Isolierung	33
	3.4.2 RNA-Sequenzierung	33
3.5	Zellbiologische Methoden	34
	3.5.1 Zellkern-Extraktion	34
	3.5.2 Herstellung von Zelllysaten	35
3.6	Allgemeine proteinbiochemische Methoden	36
	3.6.1 Bestimmung der Proteinkonzentration	36
	3.6.2 Co-Immunpräzipitation	36
	3.6.3 Saccharid-Immunpräzipitation	39
	3.6.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	39
	3.6.5 Native Gelelektrophorese ( <i>Blue Native PAGE</i> )	40
	3.6.6 Western Blot Verfahren	43
	3.6.7 Coomassie-Färbung	44
	3.6.8 Massenspektrometrie: MALDI-TOF	45
3.7	spezielle proteinbiochemische Methoden	47
	3.7.1 Herstellung von rekombinalem Galectin-3	47
	3.7.2 Herstellung einer Affinitätssäule mit rekombinatem Galectin-3	48
	3.7.3 Laktose-abhängige Aufreinigung von Interaktionspartnern über eine Galectin-3-Affinitätssäule	49
	3.7.4 Glycerol Gradient	50
3.8	Fluoreszenzmikroskopische Methoden	51
	3.8.1 Vorbereiten der Zellen mit Immunfluoreszenz-Markierung	51
	3.8.2 <i>Proximity Ligation Assay</i>	52
	3.8.3 Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung (FISH)	54
	3.8.4 konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (KLSM)	55
	3.8.5 Quantifizierung PLA	56
	3.8.6 Quantifizierung FISH	56
3.9	Statistik	56
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>57</b>
	4.1 Galectin-3 interagiert mit der Spleißkomponente hnRNPA2B1	57
	4.1.1 hnRNPA2B1 immunpräzipitiert gemeinsam mit Galectin-3	57
	4.1.2 hnRNPA2B1 kolokalisiert mit Galectin-3 in vivo	60

4.1.3	Galectin-3 und hnRNPA2B1 befinden sich im selben Komplex	62
4.1.4	Galectin-3 scheint keine Affinität für N-Acetylglucosamin zu besitzen	64
4.2	Galectin-3 interagiert mit weiteren Spleißosomkomponenten im Zellkern	65
4.2.1	Galectin-3 interagiert mit U2AF65 <i>in vitro</i>	69
4.2.2	Galectin-3 kolokalisiert mit U2AF65 <i>in vivo</i>	71
4.2.3	Galectin-3 und U2AF35 scheinen sich in einem Abstand $\geq 40$ nm voneinander entfernt zu befinden	73
4.2.4	Galectin-3 scheint weiter als 40 nm vom U2 snRNP SAP155 entfernt zu sein	76
4.2.5	Galectin-3 interagiert mit U1 70k	78
4.2.6	Galectin-3 kolokalisiert mit Speckles in verschiedenen Zelllinien	80
4.3	Galectin-3/Galectin-1 und hnRNPA2B1 sind an der Prozessierung von mRNA beteiligt	82
4.3.1	Die Verminderung von hnRNPA2B1 führt zur Akkumulation von mRNA im Zellkern	82
4.3.2	Der Doppel-knockdown von Galectin-1 und Galectin-3 führt zu einer Akkumulation von mRNA im Zellkern	84
4.4	RNA-Sequenzierung	87
4.5	Die Analyse der Bindung der Galectin-3-Interaktionspartner untereinander	94
4.5.1	hnRNPA2B1 präzipitiert gemeinsam mit U2AF65 und U1 70k	94
4.5.2	Die untersuchten Spleißkomponenten befinden sich in einem Maximalabstand von 40 nm zueinander	96
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>99</b>
5.1	Galectin-3 interagiert mit Komponenten des Spleißosoms	99
5.1.1	Galectin-3 kolokalisiert mit dem Speckles-Marker Sc35 und ist selbst eine Komponente des Spleißosoms	99
5.1.2	Galectin-3 interagiert mit hnRNPA2B1 im Zellkern	99
5.1.3	Galectin-3 interagiert mit U2AF65, aber nicht mit dessen direkten Bindepartnern	101
5.1.4	Galectin-3 interagiert mit U1 70k	103
5.1.5	Galectin-3 im E/A-Komplex des Spleißosoms	103
5.2	Galectin-3 und Galectin-1 sind an der Prozessierung der mRNA beteiligt	106

5.3	Die Spleißkomponenten hnRNPA2B1, U2AF65 und U1 70k interagieren untereinander	107
5.4	Galectin-3 und seine Rolle im Spleißen der pre-mRNA	108
5.5	Ausblick	110
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>112</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>132</b>
7.1	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	132
7.2	Abkürzungsverzeichnis	134
7.3	Publikationen	137
7.4	Verzeichnis der akademischen Lehrer	137
7.5	Danksagung	138

# 1 Zusammenfassung

Galectin-3 ist ein Vertreter der Galectine, welche durch ihre Bindungsaffinität an  $\beta$ -Galactoside gekennzeichnet sind. Speziell Galectin-3 ist durch seinen chimären Aufbau, bestehend aus N-terminaler Oligomerisierungsdomäne, der C-terminalen Kohlenhydrat-Binderegion, und seinem ubiquitären Vorkommen im adulten Gewebe gekennzeichnet. Abhängig vom Zelltyp oder dem Proliferationsstadium ist es vermehrt extrazellulär, im Zytoplasma oder im Zellkern zu finden. Diese diffuse Verteilung führt auch zu einer Vielzahl an Funktionen für Galectin-3, die bisher noch nicht ausreichend aufgeklärt sind. Die subzelluläre Verteilung ist auch in verschiedenen Tumorvarianten sehr unterschiedlich. In Zellen des klarzelligeren Nierentumors wird das Lektin verstärkt in den Zellkern transportiert. Basierend auf dieser Beobachtung stellte sich die Frage nach möglichen Galectin-3-Interaktionspartnern im Zellkern und der Funktion dieser Interaktion.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst hnRNPA2B1 als Interaktionspartner von Galectin-3 identifiziert. Es konnte mittels biochemischer Methoden nachgewiesen werden, dass diese Interaktion Laktose-abhängig und RNA-unabhängig ist. Außerdem wurde die Interaktion mit Hilfe des *Proximity Ligation Assay* bestätigt. Weitere mikroskopische Untersuchungen zeigten nukleäre Kollokationen in punktförmigen Strukturen. Anhand einer Affinitätschromatographie konnte nicht nur die Interaktion zum hnRNPA2B1 identifiziert werden, es wurden auch weitere Interaktionspartner von Galectin-3 gefunden, wie die Spleißkomponenten U2AF65 oder U1 70k.

In zusätzlichen Experimenten konnte gezeigt werden, dass Galectin-3 an der Prozessierung von mRNA beteiligt ist, da es nach gemeinsamer Depletion von Galectin-3 und Galectin-1 zur Akkumulation von mRNA im Zellkern kam. Darüber hinaus wurde durch RNA-Sequenzierung nach Galectin-3 knockdown demonstriert, dass das Lektin das alternative Spleißen einzelner Gene beeinflusst. Diese Beobachtungen werden durch die hier identifizierten Galectin-3-Interaktionspartner unterstützt, da es sich dabei um Komponenten des alternativen Spleißapparates handelt.

## 1 Summary

Galectin-3 is a member of the galectin family, which is characterized by its binding affinity to  $\beta$ -galactosides. Galectin-3 contains a chimeric structure composed of an N-terminal oligomerization domain and a C-terminal carbohydrate recognition domain. The protein is also characterized by its ubiquitous distribution in adult tissues. Depending on cell type and proliferation state, galectin-3 can accumulate in the extracellular milieu, in the cytoplasm or in the nucleus. This diffuse distribution leads to a multiplicity of functions for galectin-3 which are until now not clarified. The subcellular distribution is also diverse in various kinds of cancer cells. Renal clear cell carcinoma cells show an increased transport of the lectin into the nucleus. Based on these observations questions about putative nuclear interaction partners of galectin-3 and the function of these interactions arise.

In this work the heterogeneous ribonucleoprotein hnRNPA2B1 was identified as an interaction partner of galectin-3. Biochemical methods reveal that the interaction between hnRNPA2B1 and galectin-3 is RNA-independent but lactose-dependent. Moreover subcellular interaction of the two binding partners was confirmed by using the proximity ligation assay. Fluorescence microscopic analysis showed colocalizations in dot-like structures. Additional interaction partners of galectin-3, like the spliceosomal components U2AF65 or U1 70k, were found by affinity chromatography.

Further experiments showed an involvement of galectin-3 in mRNA processing and nuclear exit, since mRNA accumulated in the nucleus following a combined depletion of galectin-3 and galectin-1. RNA-sequencing then demonstrated that depletion of galectin-3 affected alternative splicing of several genes. These observations were supported by the identity of galectin-3 interaction partners identified in this work, which are all components of the alternative splicing machinery.

## 2 Einleitung

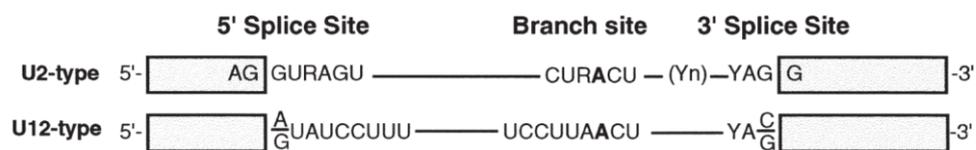
### 2.1 Das pre-mRNA Spleißen

#### 2.1.1 pre-mRNA Spleißen, Introns und Exons

Die Transkription der genetischen Information von der DNA zur Vorläufer-mRNA (*precursor messenger RNA* - pre-mRNA) ist der erste Schritt in der Genexpression eukaryotischer Zellen. Die pre-mRNA besteht zum größten Teil aus nicht-kodierenden Sequenzen, den Introns. Diese Introns werden auf dem Weg zur mRNA aus dem Transkript durch einen Prozess namens Spleißen entfernt (zusammengefasst in (Will und Lührmann 2011)). Das Spleißen erfolgt in großen molekularen Maschinen von mehreren Mega-Dalton, den Spleißosomen. Diese bestehen aus verschiedenen Untereinheiten aus stabilen RNA-Molekülen in Assoziation mit vielen Proteinen. Die Untereinheiten sind Uridin-reiche *small nuclear ribonucleoproteins* (snRNPs) zusammen mit nicht-snRNP Proteinfaktoren, welche zur Identifizierung der Intron-Enden, gefolgt vom Zusammenbau eines aktiven Spleißosoms zur Katalyse der Intron-Entfernung fungieren (Burge *et al.* 1999; Staley und Guthrie 1998). Der spleißosomale Zusammenbau, die Aktivierung und der Abbau involviert ebenfalls viele ATP-abhängige Konformationsänderungen unterstützt durch die DExD/H-Box RNA Helikasen (zusammengefasst in (Zhang *et al.* 2013)). Man unterscheidet zwischen zwei Spleißosom-Arten, zum einen gibt es das U2-abhängige Spleißosom, welches das am häufigsten vorkommende Spleißosom ist und zuständig ist für das Spleißen von U2-Typ Introns (siehe unten). Und zum anderen gibt es das selten vorkommende U12-abhängige Spleißosom, welches die U12-Typ Introns spleißt (zusammengefasst in (Will und Lührmann 2011)). Ein humanes Gen besitzt typischerweise kurze Exons (50 – 250 bp) und lange Introns (> 100 bp), d.h. dass die Introns insgesamt mehr als 90 % des pre-mRNA-Transkripts einnehmen (zusammengefasst in (Wang und Burge 2008)). Introns werden anhand bestimmter Merkmale definiert, dazu zählen die konservierten Sequenzen an der 5' und 3' Spleißseite (ss), das Verzweigungsstellenadenosin (*branch site adenosine*, BS), sowie der Polypyrimidintrakt (eine Pyrimidinreiche Region) (Abb. 2-1) Die BS ist dabei der 3' ss um 18 – 40 Nukleotide vorgelagert und in höheren Eukaryoten folgt darauf der Polypyrimidintrakt (PPT) (Abb. 2-1). Die Spleißseiten und die BS unterscheiden sich in den U2- und U12-Typ Introns (zusammengefasst in (Will und Lührmann 2011)) (Abb. 2-1), U12-Typ Introns zum Beispiel besitzen AT-AC Termini, anstelle von GT-AG Termini bei U2-Typ Introns. Im humanen System wurden ca. 300 Gene mit U12-Typ Introns identifiziert. Diese Gene sind aus den Bereichen der DNA Replikation und Reparatur; Transkription, RNA Prozessierung und Translation; sowie Organisation des Zytoskeletts, vesikulärer Transport und Ionenkanal-Aktivität (zusammengefasst in (Turunen *et al.* 2013)).

Evolutionär gesehen wird vermutet, dass die Introns Nachfahren der selbst-spleißenden Gruppe-II-Introns sind. Ebenso wie die Introns verfügen die Gruppe-II-Introns über einen 2-Schritte-Spleißmechanismus. Auch signifikante Ähnlichkeiten in der Sequenz und der Sekundärstruktur weisen auf die evolutionäre Verwandtschaft hin. Hierzu zählt die U6 snRNA, die als katalytische Einheit sehr große Ähnlichkeit mit dem katalytischen Zentrum der Domäne V der Gruppe-II-Introns aufweist (zusammengefasst in (Valadkhan 2010)).

Auf den Introns und Exons sind zusätzlich noch *cis*-agierende pre-mRNA Elemente mit Spleißverstärkern (ESE – *exon splicing enhancer* und ISE – *intron splicing enhancer*) sowie –hemmern (ESS – *exon splicing silencer* und ISS – *intron splicing silencer*) zu finden. Im Normalfall sind diese Sequenzen sehr kurz und verschieden. Durch die Bindung regulatorischer Proteine an diese Sequenzen wird das konstitutive und alternative Spleißen verändert. Diese regulatorischen Proteine bzw. *trans*-Faktoren wirken entweder stimulierend oder hemmend auf das Spleißosom (zusammengefasst in (Will und Lührmann 2011)).



**Abb. 2-1 U2-Typ-Introns und U12-Typ-Introns.**

Die Übereinstimmungssequenzen der U2-Typ- und U12-Typ-Introns. Konservierte Sequenzen befinden sich an den 5' und 3' Spleißseiten sowie an der Verzweigungsstelle (*branch site*). Y – Pyrimidin, R – Purin, Yn – Polypyrimidintrakt, **A** – Verzweigungsadenosin. Exons sind als Boxen dargestellt. (Will und Lührmann 2006)

### 2.1.2 Die Spleißreaktion

Die eigentliche Spleißreaktion sind 2 aufeinanderfolgende Transesterifikationen. Bei der ersten startet die 2'OH-Gruppe des BS-Adenosin einen nukleophilen Angriff auf die Phosphatgruppe am 5' ss, dies führt zur Abspaltung des 5' Exons und durch die Ligation des 5' Ende vom Intron mit dem BS-Adenosin zu einer Lassostruktur im Intron (Abb. 2-2). Die zweite Transesterifikationsreaktion ist gekennzeichnet durch den nukleophilen Angriff der 3'OH-Gruppe vom 5' Exon auf die Phosphatgruppe am 3' ss (Abb. 2-2). Dadurch kommt es zur Ligation der zwei Exons, also zur mRNA und das Intron wird in Form eines Lassos frei (zusammengefasst in (Will und Lührmann 2011)) (Abb. 2-2). Die Introns können im Anschluss degradiert werden. Neben weiteren Entstehungsmöglichkeiten können auch auf diesem Weg die Introns zu nicht kodierenden RNAs werden (snoRNA, lncRNA, *circular RNA*) und unter anderem die Genexpression regulieren (zusammengefasst in (Yang 2015)).

Untersuchungen in *S. cerevisiae* zeigten, dass beide Transesterifikationsreaktionen vermutlich durch die U6 snRNA katalysiert werden, indem diese die Metalle (Magnesium) positioniert (Fica *et al.* 2013).

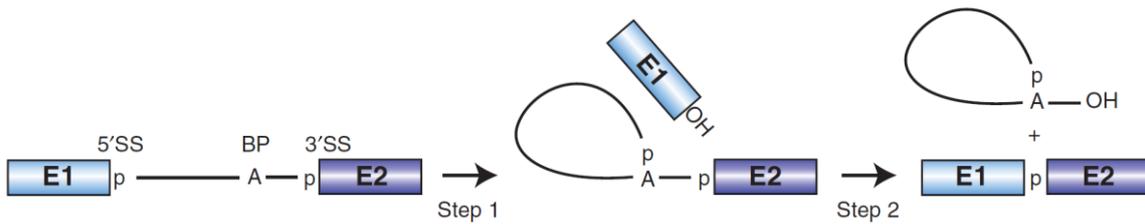


Abb. 2-2 Der 2-Schritte Mechanismus des pre-mRNA-Spleißens. (Will und Lührmann 2011)

### 2.1.3 Der Zusammenbau des Spleißosoms und die U snRNPs

Das pre-mRNA Spleißen wird katalysiert durch eine große molekulare RNP-Maschinerie, dem Spleißosom (zusammengefasst in (Will und Lührmann 2006)). Das Spleißosom ist eine dynamische Maschine, deren Komposition nicht statisch ist und deren Struktur während jedes Zykluses des Spleißens mehrere Umgestaltungen durchläuft. Der größte Umgestaltungsschritt hierbei ist während der Transformation vom Komplex B zum aktivierten Spleißosom (zusammengefasst in (Makarov *et al.* 2002)). Während

sich das U2-abhängige Spleißosom aus U1, U2, U5 und U4/U6 snRNPs mit nicht-snRNP Komplexen zusammensetzt, besteht das U12-abhängige Spleißosom aus U11, U12, U5 und U4atac/U6atac snRNPs. Die U1, U2 und U5 snRNPs bestehen aus einer snRNA zusammen mit 7 Sm Proteinen (B/B', D3, D2, D1, E, F und G) und einer variab-

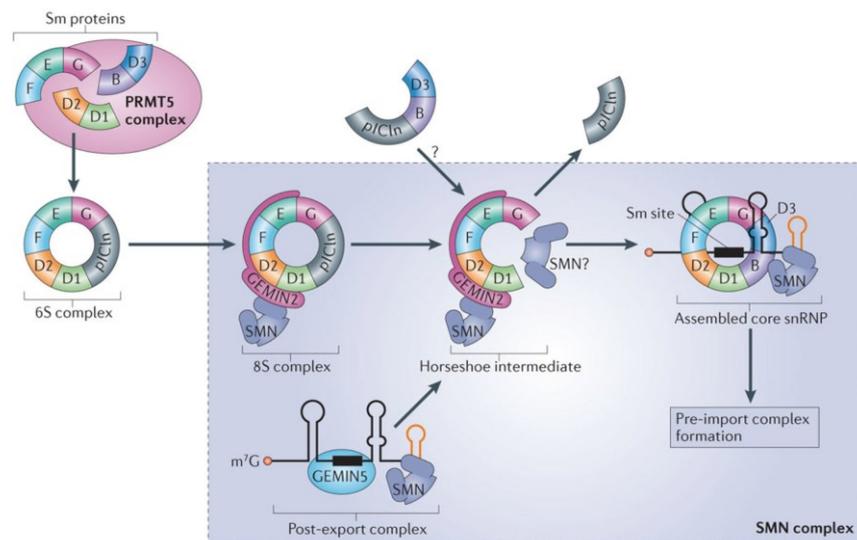
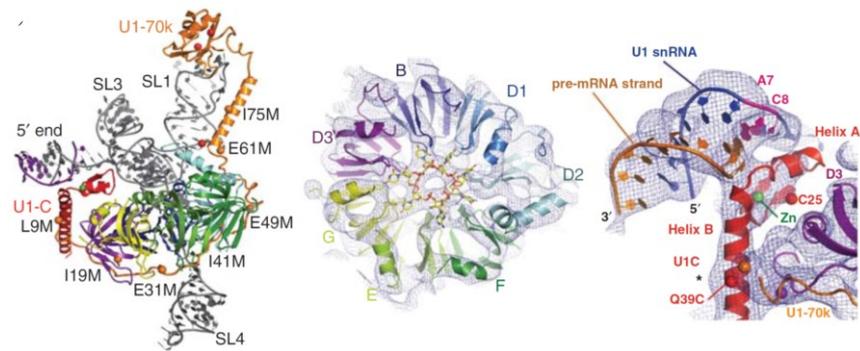


Abb. 2-3 Zusammenbau der Sm-Klasse snRNPs.

Im Anschluß an die Translation werden die snRNAs im Zytoplasma mit den Sm-Proteinen zum snRNP zusammengebaut. Dies erfolgt unter Mithilfe des SMN/Gemin-Komplexes. (Matera und Wang 2014)

len Anzahl an spezifischen Proteinen. Die U4/U6 snRNP besteht aus zwei snRNAs (zusammengefasst in (Will und Lührmann 2011)). Die snRNAs sind eine Gruppe von reichlich vorkommenden, nicht-kodierenden und nicht-polyadenylierten Transkripten im Nukleoplasma. Nach deren Transkription werden die snRNAs zunächst ins Zytoplasma exportiert, wo sie zusätzlichen Reifungsprozessen unterzogen

und anschließend wieder in den Zellkern importiert werden. Der SMN (*survival motor neuron*) Proteinkomplex inklusive der GEMINE reguliert die zytoplasmatische Phase der snRNPs, diese rekrutieren die snRNAs und kombinieren sie mit den 7 Sm Proteinen (Abb. 2-3). Der Sm-Kern stabilisiert die snRNAs und schützt sie vor Nukleasen, außerdem ist er wichtig für den nukleären Import in den Zellkern (zusammengefasst in (Matera und Wang 2014)). Die U1 snRNP zum Beispiel besteht aus 4 Stammschleifen



**Abb. 2-4 Aufbau der U1 snRNP.**

Links: Strukturdiagramm der U1 snRNP mit den Sm-Proteinen, U1 70k und U1-C. Die Stammschleifen 1, 3 und 4 sowie das 5' Ende sind angedeutet in grau. Mitte: Strukturdiagramm der Sm-Proteine und 7 Nukleotide der RNA. Rechts: Interaktion der U1 snRNA mit der 5' Spleißseite der pre-mRNA. (Will und Lührmann 2011)

(I – IV). Die Sm Proteine bilden einen heptameren Ring um die snRNA, wobei jedes Sm-Protein dabei ein Nukleotid der U snRNA kontaktiert (Abb. 2-4). Die assoziierten Proteine sind U1 70k, U1-C und U1-A. Der N-Terminus von U1 70k und der C-Terminus von SmD3 erstellen eine Bindetasche für U1-C (Abb. 2-4). U1-C stabilisiert die Interaktion der Basenpaarung von U1 snRNA mit der 5' Spleißseite.

Die pre-mRNA zusammen mit der snRNA können sich nicht selbst in eine katalytisch aktive Struktur umbauen, dazu sind die spleißosomalen Proteine notwendig. Diese Proteine sind essentiell für die Erkennung und Paarung von Spleißseiten, außerdem vermitteln sie RNA-RNA-, RNA-Protein- und Protein-Protein-Interaktionen und sie positionieren die pre-mRNA für die Katalyse. Insgesamt sind mehr als 170 Proteine am Zusammenbau des Spleißosoms und am Spleißen beteiligt, dabei kommt es zum größten Proteinwechsel zwischen dem Zusammenbau und der Katalyse. Einige Proteine sind nur locker mit dem Spleißosom assoziiert und/oder haben nur redundante Funktionen, daher sind sie nicht für jedes pre-mRNA-Substrat notwendig (zusammengefasst in (Will und Lührmann 2011)).

Noch während der Transkription lagern sich hnRNP Proteine um die pre-mRNA und bilden den H-Komplex (Das *et al.* 2000). Dann folgt der Zusammenbau des Spleißosoms mit der Erkennung und Bindung der 5'ss durch die U1 snRNP über Basenpaarung. Weiterhin erfolgt die Interaktion der nicht-snRNP Proteine SF1 und U2AF mit dem PPT und der 3'ss, wobei das SF1/BBP die BS und U2AF65 den Polypyrimidintrakt bindet. SF1/BBP und U2AF65 interagieren miteinander während der Erkennung und Bindung. Außerdem bindet U2AF35 die AG-Dinukleotide der 3'ss. Diese Formation bildet den E-Komplex. Im A-Komplex kommt es zur Assoziation von U2 snRNP mit der BS über Basenpaarung und unter ATP-Verbrauch, wobei sich das Adenosin vorwölbt und bereit ist für den nukleophilen Angriff während der ersten Transesterifikationsreaktion. Die Basenpaarung zwischen der BS und der U2 snRNP wird durch

die U2 snRNP assoziierten Proteine SF3a und SF3b sowie durch die Bindung mit U2AF65 stabilisiert, dadurch dissoziiert SF1/BBP. U2 snRNP positioniert sich schon im E-Komplex in der Nähe von der U1 snRNP und die räumliche Organisation ändert sich beim Übergang von E-Komplex zum A-Komplex nur sehr wenig (zusammengefasst in (Will und Lührmann 2011) und (Wahl *et al.* 2009)). Die U4/U6 und U5 snRNPs bilden zuvor einen tri-snRNP-Komplex und interagieren daraufhin mit dem Spleißosom, dies bildet den B-Komplex. Im B-Komplex kommt es zu Umgestaltungen in RNA-RNA- und RNA-Protein-Interaktionen und dies führt zur Destabilisierung der U1 snRNP und der Basenpaarung der U4 snRNP mit der U6 snRNP und es kommt zur Dissoziation von U4 snRNP. Dadurch entsteht der aktive B\*-Komplex, indem die U6 snRNP mit 5'ss eine Basenpaarung eingeht, welches zur Dissoziation von U1 snRNP führt. Dies ist Ort der ersten Transesterifikationsreaktion. Durch die Basenpaarung zwischen U6 und U2 snRNP kommen die BS und die 5'ss zusammen. Die U5 snRNP interagiert mit Exonnukleotiden

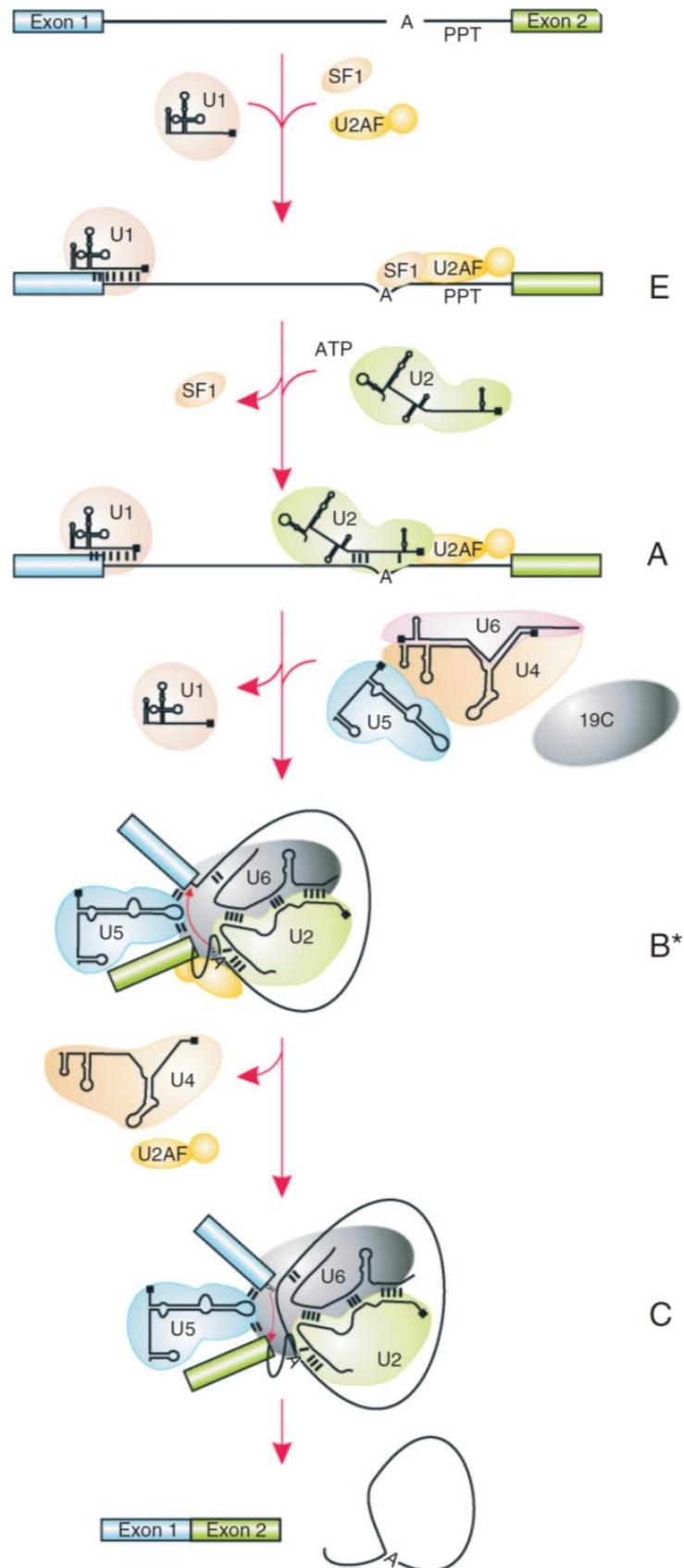


Abb. 2-5 Zusammenbau des Spleißosoms. (Turunen *et al.* 2013)

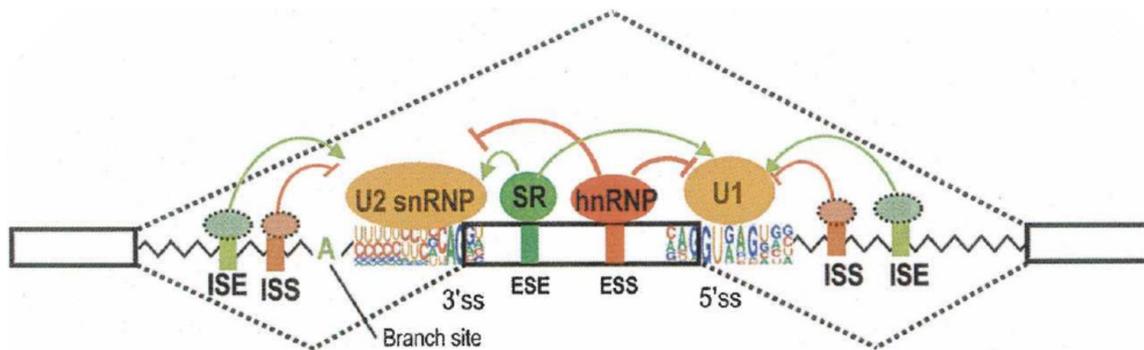
in der Nähe der 5'ss. Der C-Komplex schließt sich an und ist Ort der zweiten Transesterifikationsreaktion. Nach Abschluss der Transesterifikationen und der Ligation der Exons sowie Freilassung der Introns löst sich das Spleißosom wieder auf und die Bestandteile nehmen wieder an einer neuen Spleißrunde teil (zusammengefasst in (Will und Lührmann 2011)). Alle Schritte während des Zusammenbaus des Spleißosoms inklusive der katalytischen Spleißschritte sind reversibel (zusammengefasst in (Matera und Wang 2014)). Der Zusammenbau des Spleißosoms findet durch geordnete Interaktionen der spleißosomalen snRNPs und vieler anderer Spleißfaktoren statt. Es wurden aber auch Spleißosomen gefunden, die sich in Abwesenheit von pre-mRNA zusammenbauen und erst durch die Anwesenheit von pre-mRNA aktiviert werden (zusammengefasst in (Will und Lührmann 2011)).

#### 2.1.4 Das alternative Spleißen

Alternatives Spleißen ist vorherrschend in Eukaryoten zu finden und durch diesen Prozess wird es möglich aus einem Gen mehrere Proteinisoformen herzustellen. Gleichzeitig dient es als quantitative Genkontrolle, indem unbrauchbare mRNA als *nonsense mediated decay* markiert wird (zusammengefasst in (Matlin *et al.* 2005)). Durch das alternative Spleißen können Exons übersprungen oder einbezogen werden. Durch Änderungen der 5'ss oder 3'ss können Exons verlängert oder verkürzt werden. Ebenso können auch Introns einbezogen oder übersprungen werden (Ast 2004; Black 2003). Die Effekte auf das entsprechende Protein sind sehr verschieden, es kann zum Beispiel zu einer Proteinisoform führen, die eine andere Funktion ausübt oder eine veränderte subzelluläre Lokalisation aufweist. Zu dem können auch Änderungen in der Bindungsspezifität auftreten (Black 2000). Aufgrund der Häufigkeit der alternativen Spleißevents ist diese Variante eher eine Regel als eine Ausnahme, da mehr als 50 % der humanen Gene alternativ gespleißt werden.

Der alternative Spleißvorgang wird durch regulatorische Elemente, den Verstärkern (*Enhancer*) und Hemmern (*Silencer*), reguliert. Diese Regulation ist spezifisch für jeden Zelltyp, Entwicklungsstadium und Signalweg. Während des Spleißens sind vor allem der H-, E- und A-Komplex Orte fürs alternative Spleißen. Die Regulatoren sind *cis*- Elemente bestehend aus Sequenzen der pre-mRNA. Man unterscheidet bei den *cis*- agierenden Faktoren zwischen positiven und negativen Regulatoren. Die *Enhancer* (ESE) sind Purinreiche und Adenosin/Cytosin-reiche Sequenzen, die ca. 6 – 8 Nukleotide kurz sind (Smith *et al.* 2006). Sie vermitteln ihre regulatorischen Funktionen über die Rekrutierung von *trans*- agierenden Faktoren, welches meistens Mitglieder der SR-Proteinfamilie sind (Abb. 2-6) (Wang und Burge 2008). SR-Proteine können so die 3' oder 5' Spleißseite aktivieren und unter Anderem den Spleißfaktor U2AF65 zum Polypyrimidintrakt rekrutieren (zusammengefasst in (Matlin *et al.* 2005)). Die *Silencer* (ESS) sind eine weitere Klasse von regulierenden Spleißsequenzen. Diese interagieren mit den hnRNPs, was dazu führt, dass Exons, Spleißseiten oder *Enhancer* nicht mehr erreichbar sind (Abb.

2-6) (zusammengefasst in (Matlin *et al.* 2005)). Auch auf den Introns gibt es diese regulatorischen Spleißelemente (ISE und ISS) (Abb. 2-6) (Yeo *et al.* 2007).



**Abb. 2-6 Reguliertes Spleißen.**

Exons sind als Boxen und Introns als gezackte Linien dargestellt. Zwei alternative Spleißwege, indem das mittlere Exon entweder eingeschlossen oder entfernt wird (gestrichelte Linien). Spleißen wird durch die cis-Elemente (ESE, ESS, ISS, ISE) und trans-agierende Spleißfaktoren (SR Proteine, hnRNPs) reguliert. (Wang und Burge 2008)

### 2.1.5 Erkrankungen

Fehler beim pre-mRNA Spleißen bilden die Basis vieler humaner Erkrankungen (zusammengefasst in (Will und Lührmann 2011)). So kann es durch Fehler im Spleißen zu folgenden humanen genetischen Erkrankungen kommen: Retinitis pigmentosa, Wirbelsäulen-Muskelatrophie und Myotone Dystrophie. Auch Veränderungen im alternativen Spleißen können zu Erkrankungen führen, dazu gehören vor allem der neoplastische Umbau und die Metastasierung von Tumoren (zusammengefasst in (Zhang *et al.* 2013)). Das Spleißen kann durch erbliche Krankheitsallele verändert werden, indem Spleißelemente unterbrochen, toxische RNA hergestellt oder Spleißfaktoren beeinflusst werden. Es kann aber auch durch Änderungen in den *cis*-Sequenzelementen und *trans*-agierenden RNA-Bindeproteinen zu Veränderungen im Spleißen kommen (zusammengefasst in (Fredericks *et al.* 2015)). Progerie, einige Formen des Brusttumors oder zystische Fibrose, gehen auf Punktmutationen zurück, die das Spleißen so beeinflussen, dass Spleißseiten abgeschwächt oder zerstört werden, aber auch indem kryptische Spleißseiten entstehen. Dies führt zu *nonsense mediated decay* oder zu fehlerhaften Proteinen (zusammengefasst in (Chabot und Shkreta 2016)). Andere Erkrankungen wie die chronische lymphozytische Leukämie und Myelodysplasie entstehen durch Mutationen in SF3B1 und U2AF35 bzw. U2 snRNP-assoziierten Proteinen. Bei spinaler Muskelatrophie ist ein reduzierter SMN-Proteinlevel vorhanden und bei der Retinitis pigmentosa sind Mutationen in spleißosomalen Proteinen wie zum Beispiel dem Brr2 zu finden (zusammengefasst in (Matera und Wang 2014)).

## 2.2 Die Spleißkomponenten hnRNPA2B1, U2AF65 und U1 70k

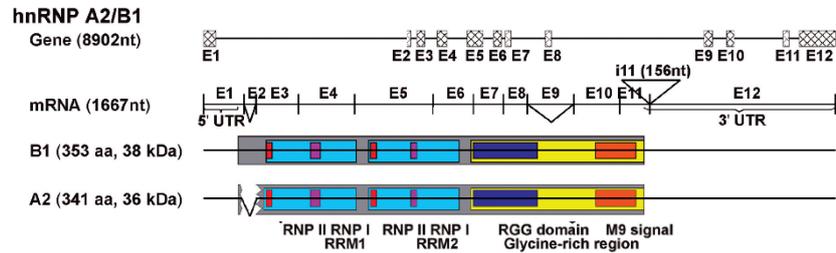
### 2.2.1 hnRNPA2B1

Das heterogene nukleäre Ribonukleoprotein A2B1 (hnRNPA2B1) zählt zur Untergruppe der hnRNP A/B Proteinen der hnRNPs. Die hnRNPs sind eine Familie von Proteinen bestehend aus ca. 20 Polypeptiden, von hnRNPA1 (34 kDa) bis hnRNPU (120 kDa), und es sind die am häufigsten vorkommenden Komponenten des Zellkerns (Dreyfuss *et al.* 1993; Dreyfuss *et al.* 2002; Pinol-Roma *et al.* 1988). Diese Proteine sind RNA-Bindeproteine, die Komplexe mit Polymerase II-Transkripten bilden. Dabei startet die Assoziation mit der RNA wenn die frei werdende pre-mRNA aus der RNA Polymerase II Transkriptionsmaschine austritt und bleibt während der Prozessierung sowie dem Export der mRNA bestehen (Dreyfuss *et al.* 1993). Währenddessen ist ihre Konstellation auf der mRNA dynamisch und abhängig von bestimmten Faktoren, wie die mRNA-Sequenz und das Repertoire an hnRNP Proteinen im Zellkern während der Transkription. Durch die Bindung an die mRNA beeinflussen sie die Struktur und die Interaktion der pre-mRNA, und dies wiederum beeinflusst das Schicksal sowie die Prozessierung der pre-mRNA (zusammengefasst in (Dreyfuss *et al.* 2002)). Man findet sie im Nukleoplasma und im Zytoplasma, jedoch sind sie nicht in Nucleoli zu finden (Pinol-Roma 1997). Einige der hnRNP Proteine pendeln zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma (hnRNPA1 und K), während andere ausschließlich im Zellkern verbleiben (hnRNPC1/C2 und hnRNPU) (Pinol-Roma und Dreyfuss 1992). Die meisten hnRNP Proteine bestehen aus einem oder mehreren RNA-Bindemotiven, dazu zählen die RNA-Bindedomänen (RBD oder RRM), die hnRNPK (KH)-Domänen und die Arginin/Glycin-reichen Boxen (RGG-Boxen). Ihre Struktur ist dabei bausteinartig aufgebaut, d.h. zu den RNA-Bindemotiven kommen noch ein oder mehrere Domänen, die die Protein-Protein-Interaktionen vermitteln um regulatorische Proteine zur pre-mRNA zu rekrutieren und dessen Lokalisation in der Zelle festzulegen. Die hnRNP Proteine besitzen eine Vielzahl an Funktionen, dazu gehören die Regulation der Transkription, die DNA-Replikation, die Biogenese der Telomere, die Genrekombination der Immunglobuline sowie die Prozessierung der pre-ribosomalen RNA und des 3'-Endes. Außerdem sind sie am konstitutiven und alternativen Spleißen, dem Transport, der Lokalisation, der Translation und der Stabilität der mRNA beteiligt (zusammengefasst in (Dreyfuss *et al.* 2002) und (He und Smith 2009)).

Die Untergruppe hnRNP A/B setzt sich aus den Proteinen A0, A1, A2, A3, AB, B1 und B2 zusammen, welche sich in einem Größenradius von 34 – 39 kDa befinden. Alle Proteine dieser Untergruppe sind Glycin-reiche Proteine (zusammengefasst in (He und Smith 2009); (Kumar *et al.* 1986; Leser *et al.* 1984; Wilk *et al.* 1985)) und evolutionär gesehen stammen sie von einem einzigen RNA-Bindeprotein ab, wobei sie durch Genduplikation entstanden sind (zusammengefasst in (He und Smith 2009)). Zusammen mit den hnRNP C1/C2 bilden sie die Kern-Proteine der HeLa 40S Ribonucleoprotein Partikel. Diese bestehen aus mehreren Kopien von den 6 Proteinen A1, A2, B1, B2, C1 und C2 (Beyer *et al.* 1977). Die Proteine A1, C1 und C2 sitzen in diesen Partikeln peripher, während A2, B1 und B2 intern positioniert

sind und als Tetramere  $(A2)_3(B1)$  oder Pentamere  $(A2)_3(B1)(B2)$  vorliegen (Lothstein *et al.* 1985). Die monomeren 40S hnRNP Partikel verpacken  $700 \pm 20$  Nukleotide der pre-mRNA (Pullman und Martin 1983; Wilk *et al.* 1983).

Das hnRNPA2B1 umfasst zwei Isoformen, die identisch bis auf eine Insertion von 12 Aminosäuren bei B1 in der Nähe des N-Terminus sind (Abb. 2-7) (Burd *et al.* 1989). Daher werden beide Isoformen gleich behandelt und zu einem Protein zusammengefasst.



**Abb. 2-7 Struktur und Isoformen von hnRNPA2B1.**

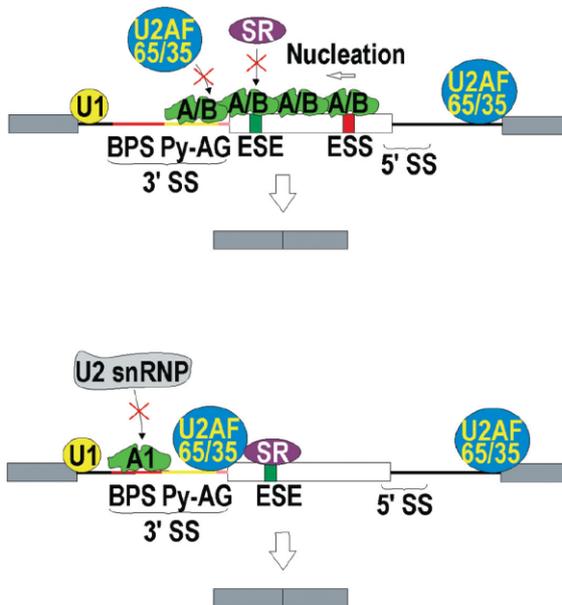
Strukturell gesehen besteht hnRNPA2B1 aus zwei RNA-Bindedomänen (RRM – RNA recognition motif) und einer

Die RNA-Erkennungsmotive (RRM) sind als hellblaue Kästchen und die Glycin-reiche Region als gelbes Kästchen dargestellt. Das dunkelblaue Kästchen steht für die RGG-Box. E – Exon, i – Intron, nt – Nukleotide, UTR – *untranslated region*. (He und Smith 2009)

weniger konservierten Glycin-reichen Domäne (Abb. 2-7) (Dreyfuss *et al.* 1993). Das hnRNPA2B1 wird kodiert durch das A2-Gen auf Chromosom 7p15, welches aus 12 Exons besteht und durch alternatives Spleißen entstehen die Isoformen A2 und B1 (Burd *et al.* 1989). Beim Vergleich mit dem A1-Gen konnte gezeigt werden, dass die Intron-Exon-Organisation identisch ist und dies könnte auf einen gemeinsamen Ursprung durch Genduplikation zurückzuführen sein (Biamonti *et al.* 1994). Außerdem weist hnRNPA2B1 eine hohe Sequenzähnlichkeit zu hnRNPA1 auf (Kumar *et al.* 1986; Wilk *et al.* 1985), dabei zeigte sich, dass die RNA-Bindedomäne beider Proteine zu 80 % identisch ist und auch der C-terminale Glycin-reiche Bereich hoch konserviert ist (Burd *et al.* 1989).

Die Funktionen von hnRNPA2B1 liegen im Spleißen und im mRNA Transport (Burd und Dreyfuss 1994; Krecic und Swanson 1999; Mayeda *et al.* 1994; Pinol-Roma und Dreyfuss 1992). Außerdem ist es wichtig für die Zellproliferation und Differenzierung, den Glukosetransport sowie die Aufrechterhaltung der Telomerlänge (Ainger *et al.* 1997; Camacho-Vanegas *et al.* 1997; Minoo *et al.* 1989). Die hnRNP A/B Proteine sind zentrale Komponenten des alternativen Spleißens. So kann zum Beispiel hnRNPA1 mit den ESS und den ISS assoziieren und auf diesem Weg die 3' Spleißseite inhibieren oder die Verwendung fernerer 5' Spleißseiten beeinflussen (Abb. 2-8). Durch die Bindung der ISS kann es die Assoziation von U2snRNP mit der pre-mRNA verhindern und somit den Zusammenbau des Spleißosoms inhibieren (Abb. 2-8). Das hnRNPA2B1 scheint während des alternativen Spleißens ähnlich wie hnRNPA1 zu agieren und scheint noch effektiver im Wechsel der Spleißseiten zu sein (zusammengefasst in (He und Smith 2009)). HnRNPA2B1 vermittelt den Tumorzell-Phänotyp über alternatives Spleißen, indem es an *cis*-agierende Sequenzen, die 3'-UTR mRNA von einigen tumorrelevanten Genen bindet (Stockley *et al.* 2014). Hierzu zählen Schlüsseltranskripte, die in die Onkogenese, den Tumorstoffwechsel und die

invasive Zellmigration involviert sind (David *et al.* 2010; Golan-Gerstl *et al.* 2011; Moran-Jones *et al.* 2009). Hinsichtlich der Tumorbilogie dient das hnRNPA2B1 aufgrund seiner Überexpression auch als früher Marker für die Detektion von Lungen- und Pankreastumoren (Satoh *et al.* 2000; Snead *et al.* 2003; Sueoka *et al.* 1999; Yaginuma und Westphal 1992; Yan-Sanders *et al.* 2002; Zhou *et al.* 1996). Ebenfalls ist es in Tumoren der Brust, der Leber und des Magen-Darm-Traktes überexprimiert (Lee *et al.* 2005; Lee *et al.* 2003; Yan-Sanders *et al.* 2002; Zhou *et al.* 2001). Die Gruppe um Golan-Gerstl konnte 2011 zeigen, dass hnRNPA2B1 auch als prognostischer Marker für Glioblastome verwendet werden kann, da das Protein hier ebenso überexprimiert wird. Dabei wurde gezeigt, dass hnRNPA2B1 das alternative Spleißen des Tumor-Suppressors BIN1, WWOX, sowie der anti-apoptischen Proteine c-FLIP und Caspase-9B in den Glioblastomzellen verändert, indem es die Expression der onkogenetischen Isoformen verstärkt (Golan-Gerstl *et al.* 2011).



**Abb. 2-8 hnRNP A/B Proteine im alternativen Spleißen.**

Oben: Bindung von hnRNP A/B Proteinen an die ESS führt zum Zusammenbau weiterer hnRNP A/B Proteine entlang der Intron-Exon-Verbindung und limitiert die Zugänglichkeit der ESS im Spleißosom. Unten: Das Spleißen wird durch hnRNP A/B Proteine unterdrückt, welche mit der BPS assoziieren und so den Zugang für die U2 snRNP blockieren. A/B – hnRNP A/B Proteine, BPS – branchpoint sequence, SR – SR Proteine, Py- Polypyrimidintrakt, ESE – exon splicing enhancer, ESS – exon splicing silencer, ss – Spleißseite, A1 – hnRNPA1. (He und Smith 2009)

### 2.2.2 U1 snRNP und U1 70k

Die U1 snRNA ist eine der am häufigsten vorkommenden nicht-kodierenden RNAs in humanen Zellen (zusammengefasst in (Guiro und O'Reilly 2015)). Diese snRNA ist am Spleißen von pre-mRNA beteiligt (Maniatis und Reed 1987). Sie besteht aus 164 Nukleotiden und ist assoziiert mit 10 Proteinen, welche zusammen die U1 snRNP bilden (Bringmann und Lührmann 1986). Zu den 10 Proteinen zählen die 7 Sm-Proteine und die 3 spezifischen U1 snRNP Proteine: U1 70k, U1-C und U1-A. (zusammengefasst in (Will und Lührmann 2011)). Die U1 snRNA besteht aus 4 Stammschleifen, wobei die Sm-Proteine zwischen Stammschleife 3 und 4 sitzen und U1 70k sowie U1-A mit ihren RNA-Bindedomänen an die Stammschleifen 1 und 2 bin-

den (Bach *et al.* 1990; Bringmann und Lührmann 1986; Oubridge *et al.* 1994; Patton und Pederson 1988; Query *et al.* 1989 a; Scherly *et al.* 1990; Yu *et al.* 1999). U1-C besitzt keine RNA-Bindedomäne und kann somit nicht direkt mit der U1 snRNA interagieren. Das Protein gelangt über Protein-Protein-Interaktionen mit U1 70k und SmD3 zur U1 snRNA (zusammengefasst in

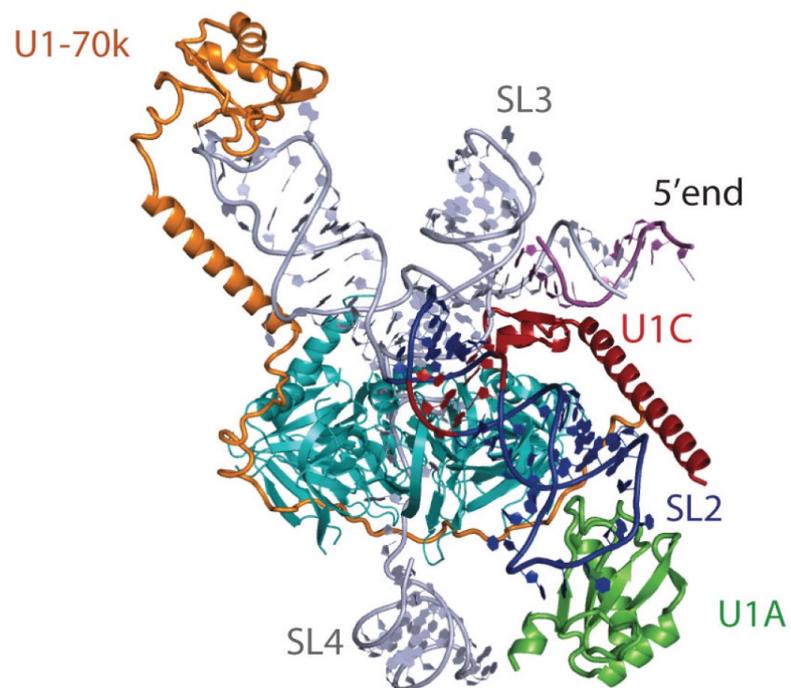


Abb. 2-9 Model der humanen U1 snRNP. (Pomeranz Krummel *et al.* 2009)

SL – Stammschleife.

(Guiro und O'Reilly 2015)). U1-C stabilisiert die Basenpaarung der U1 snRNA mit der 5' Spleißseite (zusammengefasst in (Will und Lührmann 2011)). Dabei sind die Proteine U1-70k und U1-C funktionell voneinander abhängig. Ihre Abhängigkeit kennzeichnet sich zum einen durch die notwendige Anwesenheit von U1 70k für eine stabile Verbindung von U1-C mit der U1 snRNP (Muto *et al.* 2004; Nelissen *et al.* 1994) und zum anderen stimuliert die Interaktion von U1 70k mit dem Spleißfaktor SF2/ASF die Bindung der U1 snRNP an die 5' Spleißseite nur wenn U1-C anwesend ist (Jamison *et al.* 1995; Kohtz *et al.* 1994).

Das U1 70k ist ein RNA-Bindeprotein, dessen Gen auf Chromosom 19q13.3 sitzt und 11 Exons besitzt (Spritz *et al.* 1990). Es besitzt eine RNA-Bindedomäne, welche spezifisch an die 5' Stammschleife (Stammschleife 1) der U1 snRNA bindet (Query *et al.* 1989 a, b). Außerdem besteht es aus 437 Aminosäuren mit einer langen sich wiederholenden Sequenz zwischen den Aminosäuren 231 und 393 mit 41

% basischen Arginin-Resten und 30 % sauren Aminosäuren, dies ist die Serin/Arginin-reiche Region (Query *et al.* 1989 a; Spritz *et al.* 1987; Theissen *et al.* 1986). Der C-Terminus des Proteins dient als Bindestelle zahlreicher konstitutiver und alternativer Spleißfaktoren (Graveley 2000; Smith und Valcárcel 2000). Dazu zählt der Spleißfaktor SF2/ASF, er interagiert direkt mit dem U1 70k über seine SR-Domäne (Kohtz *et al.* 1994), dies verstärkt vermutlich die Erkennung der 5' Spleißseite der pre-mRNA durch die U1 snRNA (Cao und Garcia-Blanco 1998). Weiterhin vermittelt die Interaktion den Zusammenbau des E-Komplexes des Spleißosoms, wobei SF2/ASF mit seiner RNA-Erkennungsdomäne die Bindung von U1 70k zur pre-mRNA überbrückt. Die Erkennung des ESE und die Rekrutierung der U1 snRNP zur 5' Spleißseite über Bindung zu U1 70k werden gleichzeitig durch den Spleißfaktor SF2/ASF vermittelt (Cho *et al.* 2011).

### 2.2.3 U2AF65 und U2 snRNP

Der Spleißfaktor U2AF (U2 snRNP *auxiliary factor*) ist ein Heterodimer, bestehend aus einer 65 und 35 kDa Untereinheit (Abb. 2-10) (Ruskin *et al.* 1988; Zamore und Green 1989). Die große Untereinheit U2AF65 besitzt eine N-terminale RS-reiche Domäne, eine U2AF35-Interaktionsdomäne und 3 RNA-Bindedomänen (Abb. 2-10). U2AF65 erkennt und bindet den Polypyrimidintrakt an der 3' Spleißseite, der hauptsächlich aus Uridinen besteht (Zamore *et al.* 1992). Die kleine Untereinheit U2AF35 besteht aus zwei Protein-Protein-Interaktionsdomänen, wobei eine Region für die Dimerisierung mit dem U2AF65 zuständig ist und zusätzlich gibt es eine SR-Domäne (Abb. 2-10) (Zhang *et al.* 1992). U2AF35 formt möglicherweise eine Brücke zwischen dem U2AF65 und der 3' Spleißseite (Wu und Maniatis 1993) und außerdem verstärkt es somit die Aktivität von U2AF65 (Zuo und Maniatis 1996). Zusätzlich interagiert U2AF35 mit den AG-Dinukleotiden der 3' Spleißseite (Merendino *et al.* 1999; Wu *et al.* 1999; Zorio und Blumenthal 1999). Zunächst bindet das Heterodimer U2AF die pre-mRNA als Komplex mit einem dritten Protein, dem Spleißfaktor SF1 (Abovich und Rosbash 1997). Das SF1 erkennt und bindet die *branchpoint* Sequenz, und parallel zur Bindung des SF1/U2AF-Komplex an die Erkennungssequenzen, assoziiert die U1 snRNP mit der 5' Spleißseite. Diese Formation bringt die BS, 5' Spleißseite und 3' Spleißseite zusammen in eine strukturierte Konformation (Kent und MacMillan 2002; Kent *et al.* 2003). Im folgenden Schritt formt die U2 snRNP einen ATP-abhängigen Komplex mit der BS und U2AF, wobei SF1 den Komplex verlässt und das U2AF65 mit dem U2 snRNP Protein SAP155 (SF3b155) interagiert (Abb. 2-11) (Gozani *et al.* 1998). Für die stabile Assoziation benötigt die U2 snRNP die N-terminale RS-Domäne des U2AF65 und das Enzym UAP56, zum Entwinden der RNA (Fleckner *et al.* 1997; Shen und Green 2004; Valcárcel *et al.* 1996). Das U2AF wird aus dem Spleißosom durch die U5 snRNP während der B-Komplex-Formation entfernt (Chiara *et al.* 1997).

Die U2 snRNA besteht aus 187 Nukleotiden und bildet 4 Stammschleifen (Burge *et al.* 1999; Krämer 1996; Will und Lührmann 1997). Im Spleißosom interagiert die aktive U2 snRNA mit der *branchpoint*

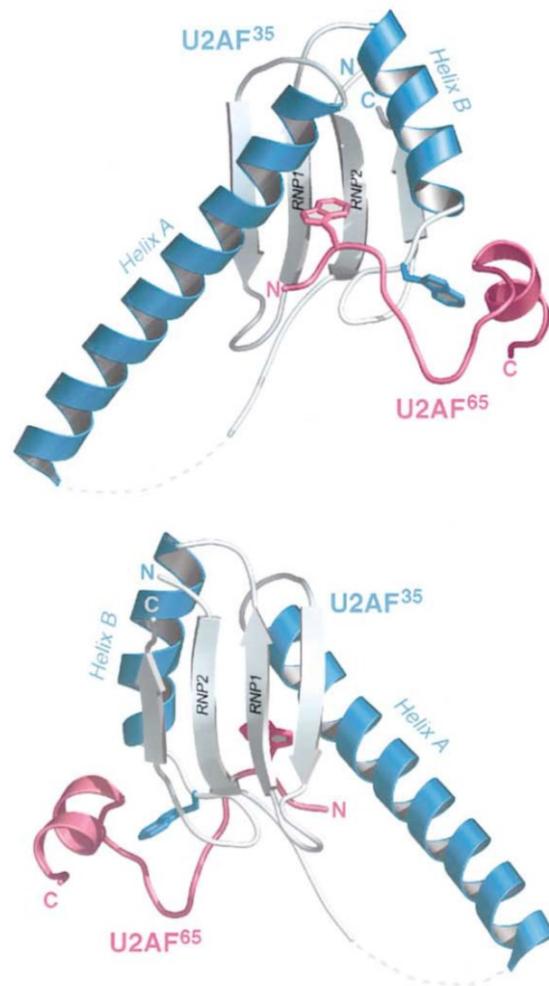
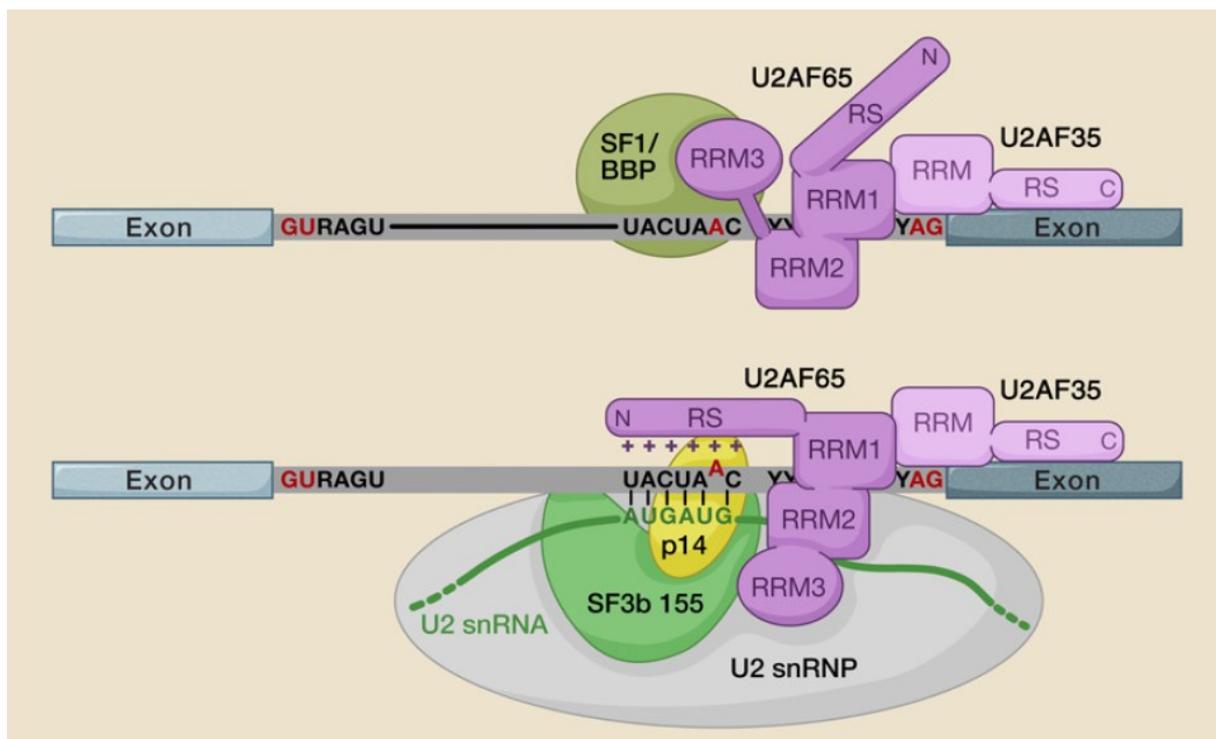


Abb. 2-10 Struktur vom U2AF65/U2AF35-Komplex (Kielkopf *et al.* 2001).

Sequenz auf dem Intron über Basenpaarung (Parker *et al.* 1997; Wu und Manley 1989; Zhuang und Weiner 1989). Die aktive U2 snRNA bildet ein U2 snRNP Partikel, wobei insgesamt 12 U2-spezifische Proteine interagieren und das 17 S U2 snRNP Partikel bilden (Behrens *et al.* 1993; Will und Lührmann 2001). Zuerst bildet sich ein 12 S U2 snRNP Partikel, dazu gehören die 7 Sm-Proteine und die assoziierten Proteine U2-A' und U2-B'' (Behrens *et al.* 1993; Brosi *et al.* 1993 b). Für das aktive 17 S U2 snRNP kommen noch die SAPs (*spliceosome associated protein*) 61, 62 und 114, diese bilden die SF3a-Untereinheit, und die SAPs 49, 130, 145 sowie 155, welche zur SF3b-Untereinheit gehören, hinzu (zusammengefasst in (Hodges und Beggs 1994); (Brosi *et al.* 1993 a,b)). Die stabile Bindung von U2 snRNP an die BS ist abhängig von einigen Proteinen wie U2AF, SF3a und SF3b (Brosi *et al.* 1993 b; Krämer *et al.* 1999; Roscigno *et al.* 1993; Ruskin *et al.* 1988; Zamore und Green 1989). Somit spielt die U2 snRNP eine wichtige Rolle während der Anfangsschritte des Zusammenbaus des Spleißosoms und der Formation des A Komplex, aber ebenso formt es zusammen mit der U6 snRNA das aktive Zentrum des Spleißosoms (zusammengefasst in (Burge *et al.* 1999)).



**Abb. 2-11 Molekulare Interaktionen an der Verzweigungsstelle und der 3' Spleißseite im spleißosomalen E und A Komplex.**

Oben: E-Komplex, pre-mRNA wird durch SF1/BBP an der BS gebunden, während der Polypyrimidintrakt und die 3' Spleißseite durch U2AF65 sowie U2AF35 gebunden werden. U2AF65 interagiert dabei mit SF1/BBP und U2AF35. Unten: A-Komplex, U2 snRNP bindet an die BS und ersetzt SF1/BBP. U2AF65 interagiert mit SF3b155 (SAP155). Die U2/BS-Basenpaarung wird stabilisiert durch Komponenten der U2 snRNP und über die RS-Domäne von U2AF65. BS – branchpoint sequence, RS-Domäne – Arginin/Serin-reiche Domäne, RRM – RNA recognition motif. (Wahl *et al.* 2009)

## 2.3 Galectine

Bei den Galectinen handelt es sich um eine Untergruppe der Lektine, welche durch die Fähigkeit, Saccharide zu binden, gekennzeichnet sind. Eingeteilt werden die Lektine in folgende vier Klassen, die C-Typ Lektine (inklusive der Selektine), die P-Typ Lektine, die Pentraxine und die Galectine (zusammengefasst in (Barondes *et al.* 1994 b)).

Alle Galectine teilen sich zwei Eigenschaften, zum einen ist das die Bindeaffinität für  $\beta$ -Galactoside und zum anderen besitzen alle Galectine konservierte Sequenzelemente bestehend aus ca. 130 Aminosäuren in der *carbohydrate recognition domain* (CRD) (Barondes *et al.* 1994 a). Insgesamt weist die Gruppe der Galectine 15 Mitglieder auf, die anhand ihrer CRD in drei Untergruppen unterteilt sind (Abb. 2-12). Die erste Gruppe besitzt nur eine CRD und die Proteine dieser Gruppe werden daher als prototypische Galectine bezeichnet. Sie ist mit 9 Mitgliedern auch die größte Untergruppe und folgende Galectine zählen zu dieser Gruppe, Galectin-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 und -15. Die Galectine-4, -6, -8, -9 und -12 bilden die zweite Untergruppe und sind durch 2 homologe CRDs in einer Polypeptid-Kette gekennzeichnet. Die zwei CRDs sind durch einen *Linker* von bis zu 70 Aminosäuren voneinander getrennt und diese Proteine werden als *tandem-repeat-type* Galectine bezeichnet. Die dritte Untergruppe besitzt nur ein Mitglied, das Galectin-3, und wird als chimärer Typ bezeichnet, da dieses Protein aus einem N-Terminus von ca. 120 Aminosäuren und einer CRD am C-Terminus besteht (Cho und Cummings 1997; Cooper 2002).

Jedes der Galectine weist sich durch seine individuelle Kohlenhydrat-Bindepräferenz aus, hierbei unterscheidet man zwischen bivalent und multivalent. Die prototypischen Galectine bilden Dimere und sind somit bivalent, ebenso wie die *tandem-repeat-type* Galectine. Da Galectin-3 in der Lage ist Pentamere zu bilden, gehört es zu den multivalenten Galectinen (Hirabayashi *et al.* 2002). Durch die Bindung von Glykokonjugaten können die Galectine so geordnete Gebilde in Form von Netzwerken ausbilden und somit ihren Funktionen nachgehen (Brewer und Fred 2002; Sacchettini *et al.* 2001). Diese Netzwerkbildung ist abhängig von bestimmten Konditionen wie Konzentration und vorherrschenden Liganden. Prototypische Galectine können als Monomere, Dimere und als höher organisierte Oligomere agieren. Auch die *tandem-repeat-type* Galectine können als Monomere auftreten, können aber auch zu höher organisierten Oligomeren assoziieren (zusammengefasst in (Leffler *et al.* 2004)).

Galectine kommen in allen Säugetieren vor, sind aber auch in Vögeln, Amphibien, Fischen, Würmern, Schwämmen und Pilzen zu finden (Hirabayashi 1997). Ihre Expression ist jedoch gewebespezifisch oder wird über das Entwicklungsstadium reguliert. Jeder Organismus exprimiert mehrere Mitglieder der Galectin-Familie, wobei verschiedene Zellen eines Organismus eine unterschiedliche Anzahl an Galectinen aufweisen, dennoch besitzen fast alle Zellen mindestens ein Galectin (Cooper und Barondes 1999).

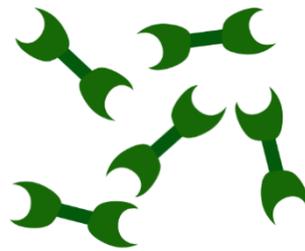
Galectine besitzen eine Vielzahl an Funktionen. Zum einen agieren sie extrazellulär über Interaktionen mit der Zelloberfläche und extrazellulären Matrixglykoproteinen sowie Glykolipiden. Und zum anderen fungieren sie auch intrazellulär über Interaktionen mit zytoplasmatischen und nukleären Proteinen (zusammengefasst in (Liu und Rabinovich 2005)).

#### prototypische Galectine



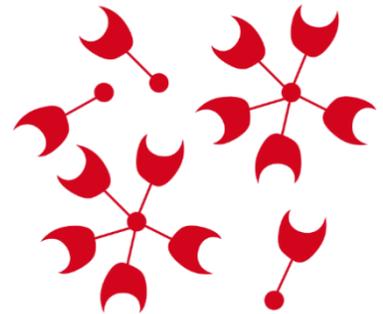
Galectin-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 und -15

#### tandem-repeat-type Galectine



Galectin-4, -6, -8, -9 und -12

#### chimäres Galectin



Galectin-3

Abb. 2-12 Einteilung der Galectine

### 2.3.1 Galectin-3

Galectin-3, auch als Mac-2, CBP-35 oder CBP-30 bezeichnet, ist ein Protein dessen Größe von 26,2 kDa (Mensch) bis 30,3 kDa (Hund) variiert. Codiert wird es durch das LGALS3-Gen welches auf dem Chromosom 1p13 lokalisiert ist (zusammengefasst in (Barondes *et al.* 1994 b)). Aufgebaut ist Galectin-3 aus zwei verschiedenen Domänen, dem N-Terminus und dem C-Terminus mit der CRD. Der N-Terminus des Polypeptids weist mehrere interne Sequenzhomologien auf, wobei jede aus sich wiederholenden 9 Aminosäureresten und einer konservierten Sequenz (Prolin-Glycin-Alanin-Tyrosin-Prolin-Glycin-X-X-X) besteht (Seetharaman *et al.* 1998). Der N-Terminus schließt sich ohne *Linker*-Sequenz an den C-Terminus direkt an. Der C-Terminus ist gekennzeichnet durch seine CRD, dies ist eine  $\beta$ -Faltblatt-Struktur aus 185 Aminosäuren (Abb. 2-13). Die 6 Stränge der konkaven Seite formen eine Furche für die Bindung von Sacchariden (zusammengefasst in (Leffler *et al.* 2004)) (Abb. 2-13). Für die Bindung der Glykokonjugate

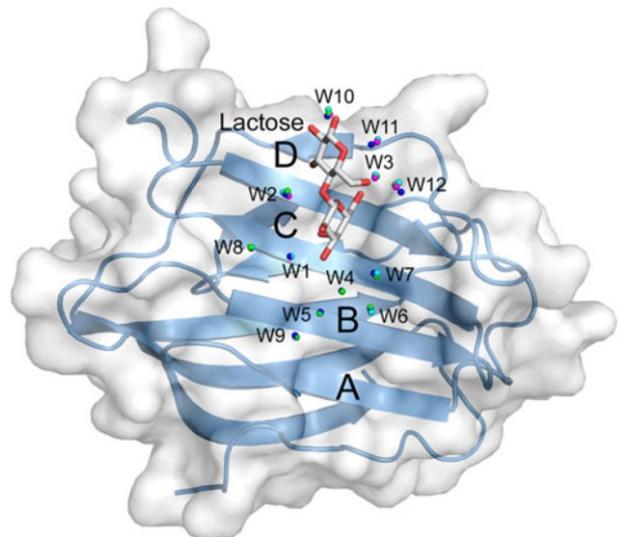


Abb. 2-13 Kristallstruktur der CRD von Galectin-3 mit Laktose

In diesem Bild sind die vermutlichen Bindestellen A - D für die Liganden (Laktose) zusammen mit den Wassermolekülen angedeutet. (Su *et al.* 2015)

sind folgende Aminosäuren verantwortlich: H158, N160, R162, N174, W181, E184 und R186 (Seetharaman *et al.* 1998). Beide Domänen sind strukturell und funktionell verschieden (Agrwal *et al.* 1993). Der N-Terminus weist keine Bindeaffinität für Glykokonjugate auf, aber er ist essentiell für die vollständige biologische Aktivität von Galectin-3 (Seetharaman *et al.* 1998). Er ist vor allem wichtig für die Cluster-Bildung und für die Multimerisierung, sowie für die nicht-klassische Sekretion von Galectin-3 (Massa *et al.* 1993; Menon und Hughes 1999). Der C-Terminus ist hingegen wichtig für die Bindung von Glykokonjugaten und Bindepartnern. Bei den Glykokonjugaten besitzt Galectin-3 eine große Affinität für Laktose und N-Acetyllactosamin (Seetharaman *et al.* 1998), wobei durch die Bindung von Sacchariden es zur Konformationsänderung im Protein kommt (Brewer 2002).

Im adulten Organismus ist Galectin-3 in allen Kompartimenten zu finden, es kann im Zytoplasma und im Zellkern vorkommen, aber auch extrazellulär zu finden sein (zusammengefasst in (Dumic *et al.* 2006)). Es zeigte sich jedoch bei Versuchen mit Mauszellen, dass Galectin-3 im Embryonalstadium lokal begrenzt ist (Fowlis *et al.* 1995). Auch die intrazelluläre Lokalisation ist abhängig vom Proliferationsstadium der Zelle. Versuche in Fibroblasten konnten zeigen, dass Galectin-3 in nicht-proliferierenden Zellen nur im Zytoplasma detektiert werden konnte, wobei proliferierende Kulturen auch nukleäres Galectin-3 aufwiesen (Moutsatsos *et al.* 1987). Galectin-3 kann sich zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma hin und her bewegen, hierzu besitzt es ein Importin- $\alpha/\beta$ -vermitteltes nukleäres Lokalisationssignal und ein Exportin-1-vermitteltes nukleäres Exportsignal. Galectin-3 kann aber auch aufgrund seiner Größe durch Diffusion zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma pendeln (Davidson *et al.* 2002; Davidson *et al.* 2006; Li *et al.* 2006; Nakahara *et al.* 2006). Ebenso ist bekannt, dass nur phosphoryliertes Galectin-3 den Zellkern verlassen kann (Tsay *et al.* 1999). Die Phosphorylierung ist die einzige posttranslationale Modifikation die bisher für Galectin-3 beschrieben wurde. Galectin-3 kann in phosphorylierter und unphosphorylierter Form in Zellen vorkommen, dabei können die Serine 6 und 12 phosphoryliert bzw. auch dephosphoryliert werden. Die unphosphorylierte Form ist nur im Zellkern zu finden, während phosphoryliertes Galectin-3 nukleär und zytoplasmatisch lokalisiert ist. Die Phosphorylierung erfolgt durch die Caseinkinase I und dies führt zu einer reduzierten Bindung von Sacchariden, kommt es zu einer Dephosphorylierung wird die Bindeaktivität wieder hergestellt. Serin6-Mutanten von Galectin-3 zeigten keine anti-apoptotische Wirkung mehr, was auf die Wichtigkeit der Phosphorylierung von Galectin-3 für seine Funktionen hinweist (zusammengefasst in (Barondes *et al.* 1994 a, b)). Auch die GSK-3 $\beta$  (Glykogen-Synthetase Kinase 3 $\beta$ ) kann Galectin-3 phosphorylieren (Shimura *et al.* 2005). Die Phosphorylierung führt voraussichtlich zu einer Konformationsänderung des Proteins (Mazurek *et al.* 2000).

### 2.3.1.1 Funktionen von Galectin-3

Aufgrund der diffusen Verteilung von Galectin-3 ist es in der Lage eine Vielzahl von Funktionen auszuüben. Diese Funktionen werden zum Teil durch die Bildung von Netzwerken ausgeübt. Hierbei ist Galectin-3 aufgrund seiner chimären Struktur in der Lage Pentamere zu bilden, diese Pentamere können mehrere Glykokonjugate binden und auf dieser Weise ein Netzwerk ausbilden. Diese Selbst-Verlinkung ist abhängig vom N-Terminus (zusammengefasst in (Yang *et al.* 2008)). Auf diese Weise ist Galectin-3 ein wichtiger Modulator der Zelladhäsion, dies erfolgt durch Interaktionen mit Laminin, Fibronectin, Hensin, Elastin, Kollagen IV und Tenascin C sowie R (zusammengefasst in (Dumic *et al.* 2006)). Die Formation dieser Netzwerke kann aber auch zur Verminderung der Aktivität einiger Rezeptoren führen und daher die Endozytose schwächen (Demetriou *et al.* 2001; Partridge *et al.* 2004). Um diese Aktivitäten auszuüben muss Galectin-3 auch extrazellulär vorkommen, jedoch besitzt das Protein keine Signalsequenz für die klassische Sekretion und wird daher über eine nicht-klassische Sekretion, der Exozytose, exportiert (zusammengefasst in (Krzeslak und Lipinska 2004)). In Endosomen kann Galectin-3 auch noch als Sortierrezeptor von Glykoproteinen an der apikalen Seite polarisierter Zellen dienen (Delacour *et al.* 2006).

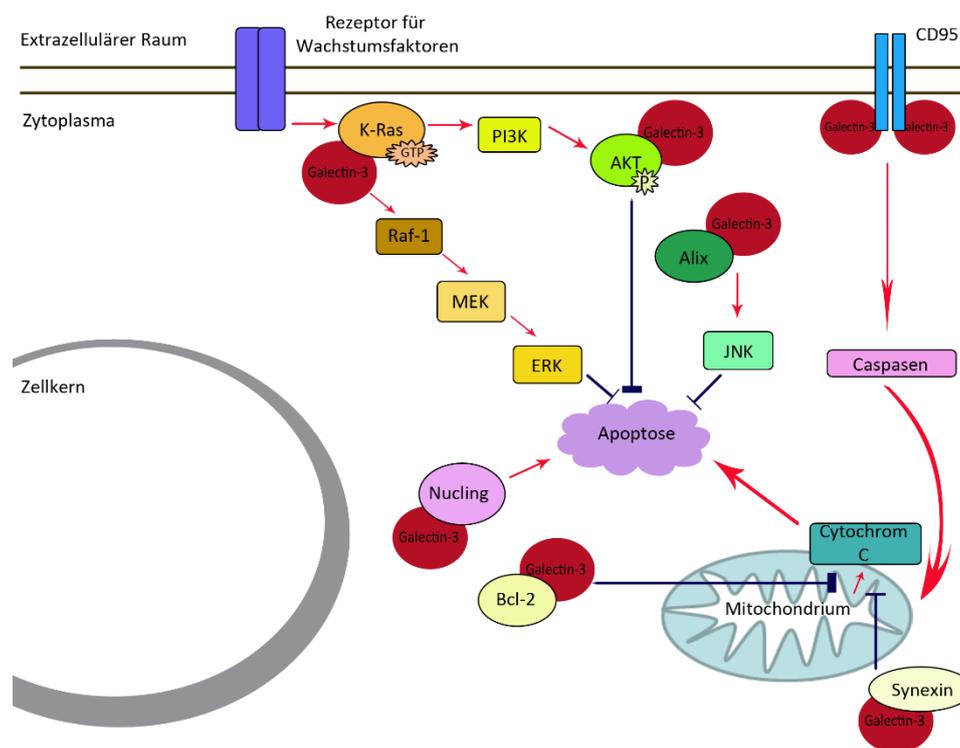
Eine der größten intrazellulären Funktionen von Galectin-3 ist seine anti-apoptotische Aktivität (Hsu und Liu 2004; Hsu *et al.* 2006), welche unter anderem durch die Interaktion mit Bcl-2 (*B cell lymphoma 2*), einem Apoptose-Repressor, erfolgt (Yang *et al.* 1996). Ebenso erfolgt diese Funktion über weitere Interaktionen mit CD45, Nucling, Synexin und Alix (zusammengefasst in (Dumic *et al.* 2006)). Im Zellkern wird Galectin-3 von der CK1 (Casein Kinase I) phosphoryliert und anschließend ins Zytoplasma exportiert. Dort aktiviert es die Kinasen ERK und JNK (MAPK-Signalweg) und inhibiert somit die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien. Dieser Vorgang verhindert die Aktivierung der Caspasen und somit das Fortschreiten von Apoptose-Vorgängen (Takenaka *et al.* 2004).

Galectin-3 ist auch involviert in der Regulation des Zellzyklus, wobei es Cyclin E und A herunterreguliert und p21 und p27 sowie Cyclin D hochreguliert. Diese Regulation führt zu einem Arrest der Zelle in der G1-Phase des Zellzyklus (zusammengefasst in (Dumic *et al.* 2006)).

Durch die direkte Interaktion von Galectin-3 mit  $\beta$ -Catenin und die Interaktion mit Axin spielt Galectin-3 auch eine wichtige Rolle in der Regulation des Wnt-Signalwegs (zusammengefasst in (Shimura *et al.* 2005)). Der Wnt-Signalweg reguliert Zellproliferation, Morphologie, Bewegung, Achsenformation und Organentwicklung (Huelsenken *et al.* 2000; Miller *et al.* 1999). Das  $\beta$ -Catenin wird von einem Komplex aus APC, Axin und Kinasen phosphoryliert, dies führt zur Ubiquitinierung und zur Degradation (Behrens *et al.* 1998; Kikuchi 1999; Kishida *et al.* 1998). Kommt es zur Dephosphorylierung von  $\beta$ -Catenin führt dies zur Translokation des Proteins in den Zellkern, wo es den Transkriptionsfaktor Tcf/Lef bindet und somit die Transkription der Wnt Gene (*c-myc*, *Cyclin D<sub>1</sub>* *etc.*) stimuliert (Shtutman *et al.* 1999; Tetsu und McCormick 1999). Die Bindung von Galectin-3 an  $\beta$ -Catenin verhindert die Phosphorylierung von

$\beta$ -Catenin, und beide Proteine gelangen so in den Zellkern, wo sie die Transkription der Wnt Gene stimulieren (Shimura *et al.* 2004).

Galectin-3 ist in der Lage die Differenzierung und das Wachstum verschiedener Immunzellen zu beeinflussen und auf diesem Weg Entzündungsreaktionen zu fördern (zusammengefasst in (Yang *et al.* 2008)). Galectin-3 beeinflusst die Entzündungszellen durch autokrine und parakrine Mechanismen, indem es die Aktivierung von Neutrophilen und Monozyten vermittelt. Ebenso induziert es die Freigabe von Mediatoren durch Mastzellen und vermittelt die Adhäsion von Neutrophilen an Laminin sowie Endothelzellen. Weiterhin erkennt Galectin-3 Galactosid-enthaltene Glykokonjugate auf Pathogenen mittels seiner CRD und über die N-terminale Domäne erkennt es nicht-Glykanstrukturen und Lipid A, dies ermöglicht die Adhäsion von Pathogenen (zusammengefasst in (Dumic *et al.* 2006)). Analysen mit Mäusen, denen Galectin-3 fehlt, zeigten Effekte bezüglich des kürzeren Überlebens von Neutrophilen und Makrophagen während Entzündungsreaktionen (Poirier 2002).



**Abb. 2-14 Einige extrazelluläre und zytoplasmatische Funktionen von Galectin-3**

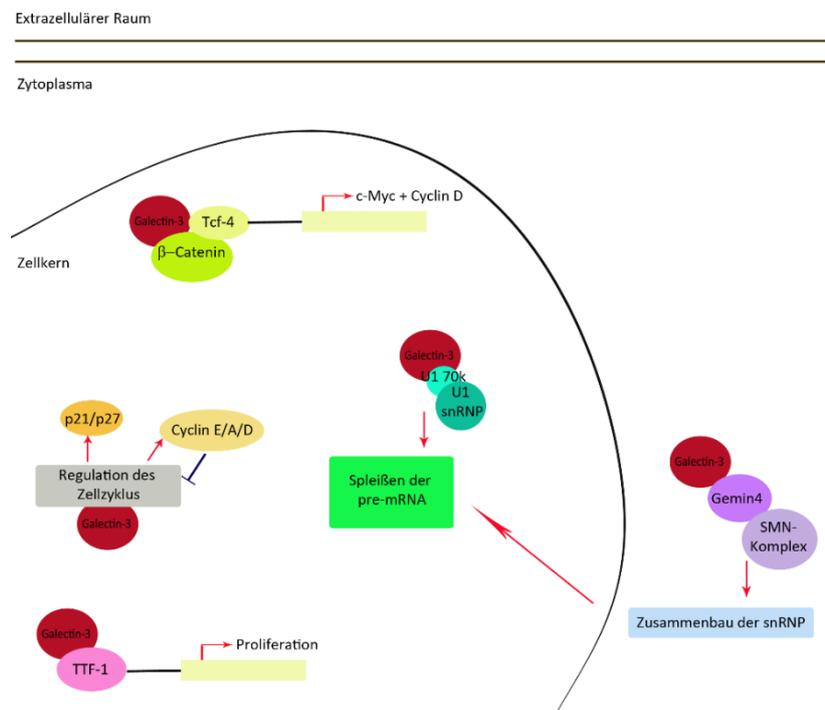
Rote Pfeile stehen für positive Effekte und blaue Linien für negative Effekte. AKT – Serin/Threonin-Kinase AKT, ERK – *extracellular signal-regulated kinase*, GTP – Guanosintriphosphat, JNK – *c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase*, MEK – *mitogen-activated protein/ERK kinase*, P – Phosphat, PI3K – Phosphatidylinositol 3-Kinase, Raf-1 – Serin/Threonin Kinase Raf-1. (Modifiziert nach (Dumic *et al.* 2006))

Neben diesen zahlreichen zytoplasmatischen Funktionen von Galectin-3, konnten auch einige nukleäre Funktionen nachgewiesen werden. Dazu zählen die Regulation der Genexpression einzelner Gene (Nakahara und Raz 2007) und seine Rolle im pre-mRNA Spleißen (Dagher *et al.* 1995).

Anhand von Versuchen in Schilddrüsenzellen wurde gezeigt, dass Galectin-3 die transkriptionale Aktivität des Transkriptionsfaktor TTF-1 (*thyroid-specific transcription factor*) hochregulieren kann, dies geschieht über eine direkte Interaktion der beiden Proteine und stimuliert die DNA-Bindeaktivität von TTF-1. Diese positive Regulation führt zu einer verstärkten Proliferation der Zelle (Paron *et al.* 2003).

Im Bezug auf das Spleißen von pre-mRNA konnten mehrere Untersuchungen die Integration von Galectin-3 zeigen. Zum einen zeigten Kolokalisationsstudien die lokale Übereinstimmungen mit dem Spleißosom-Marker Speckles (Laing und Wang 1988). Und zum anderen konnte mit Hilfe von Dichtegradientenzentrifugationen gezeigt werden, dass Galectin-3 sich in einem Dichtebereich ansiedelt, in dem auch heterogene nukle-

äre Ribonukleoproteine und snRNPs zu finden sind (zusammengefasst in (Wang *et al.* 2004)). Beides sind wichtige Bestandteile des Spleißosoms. Weiterhin führte die Depletion von Galectin-3 zum Arretieren des Zusammenbaus des Spleißosoms im H/E-Komplex und dadurch kam es zu einer fehlenden Spleißaktivität. Dies führte zu der Annahme, dass der Wirkungsort von Galectin-3 im H/E-Komplex liegt (Dagher *et al.* 1995; Vyakarnam *et al.* 1997). Aber Galectin-3 scheint auch schon im Vorfeld des Zusammenbaus des



**Abb. 2-15 Einige nukleäre Funktionen von Galectin-3.**

Rote Pfeile stehen für positive Effekte und blaue Linien für negative Effekte. SMN-Komplex – *survival of motor neuron*-Komplex, Tcf-4 – T-Zell-Faktor 4, TTF-1 – Thyroid-spezifischer Transkriptionsfaktor.

Spleißosoms eine Rolle zu spielen. Es interagiert direkt mit Gemin4, einer Komponente des SMN (*survival of motor neuron*) Komplex (Park *et al.* 2001). Diese SMN-Komplexe befinden sich vor allem im Zytoplasma und sind wichtig für den Zusammenbau der snRNPs und deren Lieferung zum H-Komplex des Spleißosoms (Dietz 1998; Fischer *et al.* 1997; Matera und Frey 1998; Mattaj 1998; Meister *et al.* 2000; Pellizzoni *et al.* 1998).

Nach Inkubationen mit Antikörpern gegen Galectin-3 wurden alle 5 U snRNAs copräzipitiert und es wurde vor allem beobachtet, dass Galectin-3 sich hauptsächlich im Komplex mit U1 snRNA befindet und dort mit U1 70k interagiert (Haudek *et al.* 2009). Haudek *et al.* konnte somit eine Möglichkeit zeigen, wie Galectin-3 zum Spleißosom gelangt. Möglicherweise vermittelt U1 snRNP die Beladung der pre-mRNA mit Galectin-3 (Haudek *et al.* 2009), da Galectin-3 nicht direkt mit der pre-mRNA interagiert (Wang *et al.* 2006).

### **2.3.1.2 Tumorgenese und Galectin-3**

Galectin-3 ist ein wichtiger Faktor in der Tumorgenese, es hat Einfluss auf die Initiierung, das Tumorstadium, die Entwicklung und die Metastasierung (Liu und Rabinovich 2005). Die Expression von Galectin-3 ist in den verschiedenen Tumorarten unterschiedlich. So ist das Protein in Tumoren der Schilddrüse, Leber, Magen und des zentralen Nervensystems hochreguliert, während in Tumoren der Brust, der Eierstöcke, des Uterus und der Prostata die Expression von Galectin-3 herabgesetzt ist (zusammengefasst in (Haudek *et al.* 2010)). Neben der unterschiedlichen Expression von Galectin-3 in Tumorzellen, ist auch die intrazelluläre Verteilung sehr verschieden. In Tumoren der Zunge kommt es zur Translokation von Galectin-3 vom Zellkern ins Zytoplasma während der neoplastischen Entwicklung (Honjo *et al.* 2000), während es in humanen Tumorzellen des Darms und der Prostata ausschließlich zytoplasmatisch zu finden ist (Lotz *et al.* 1993). Im Gegensatz dazu findet man Galectin-3 nur im Zellkern von Tumorzellen des Ösophagus (Shibata *et al.* 2005).

Es wurde gezeigt, dass die Expression von Galectin-3 notwendig für die Initiierung von transformierten Phänotypen in Tumoren ist. Dies konnte nachgewiesen werden, da Zellkulturen aus Brust- und Schilddrüsentumorzellen ihren transformierten Phänotyp nach der Inhibition von Galectin-3 verlieren (Honjo *et al.* 2001; Yoshii *et al.* 2001). Im Gegensatz dazu führte die Zugabe von Galectin-3 cDNA zu normalen Schilddrüsenzellen zu einem transformierten Phänotyp (Takenaka *et al.* 2003).

Mittels LNCaP-Zellen (Galectin-3 negativen Prostata-Tumorzellen) konnte gezeigt werden, dass Galectin-3 in Abhängigkeit von der Lokalisation in der Zelle gegenläufige Aktivitäten ausübt. So wurde für nukleäres Galectin-3 festgestellt, dass es einen großen negativen Einfluss auf die Bösartigkeit von Tumorzellen besitzt und somit anti-tumorale Funktionen hat. Im Gegensatz dazu weist zytoplasmatisches Galectin-3 Aktivitäten auf, die die Entwicklung von Tumoren stark begünstigen (Califice *et al.* 2004). Honjo *et al.* konnten nachweisen, dass in Zungentumorzellen die Expression von zytoplasmatischem Galectin-3 erhöht ist und im Gegensatz dazu die Expression des nukleärem Galectin-3 herabgesetzt ist. Diese Translokation des Galectin-3 vom Zellkern zum Zytoplasma während der Entwicklung von Zungentumoren könnte als prognostischer Faktor in der Diagnostik dienen (Honjo *et al.* 2000). Galectin-3

spielt eine Rolle im Wachstum und Entwicklung von Melanomen. So führt eine Verminderung von Galectin-3 zur verminderten Expression von NFAT1 und Autotaxin und dies wiederum vermindert das Tumorwachstum (Braeuer *et al.* 2012).

Es wurden auch Mutationen von Galectin-3 in Tumorzellen entdeckt, so vermittelt die Mutante Pro64His eine erhöhte Sensitivität für Rezeptor-vermittelte Apoptose in humanen Brusttumorzellen (Mazurek *et al.* 2011) und in der Mutante Pro191His wurde eine verstärkte nukleäre Akkumulation von  $\beta$ -Catenin detektiert, welches zur Verstärkung der Magentumore führt (Kim *et al.* 2011).

Da Galectin-3 ein wichtiger Faktor in der Tumorgenese darstellt, wurden Inhibitoren für Galectin-3 in der Tumorthherapie erforscht. Eines dieser kompetitiven Inhibitoren ist das Pectin aus Zitrusfrüchten. Hierzu wurde die Struktur des Pectins mittels pH- und Temperaturbehandlung verändert und somit erhielt man ein modifiziertes Zitruspectin, kurz MCP. Die modifizierte Form bestand nun aus einer kurzen, unverzweigten, Galaktose-reichen Kohlenhydratkette und dient daher als Ligand von Galectin-3 (Platt und Raz 1992). Es wurde gezeigt, dass MCP homotypische Aggregationen von Tumorzellen, die Angiogenese und die Tumorzell-Aggregation an Endothelzellen *in vitro* inhibieren kann (Nangia-Makker *et al.* 2002; Pienta *et al.* 1995; Platt und Raz 1992). MCP behindert Zell-Zell-Interaktionen welche durch Galectin-3 vermittelt werden und es inhibiert auch die Metastasen, hat aber keinen Einfluss auf die Primärtumore (Pienta *et al.* 1995). Weiterhin inhibiert MCP die Angiogenese, indem es die Migration und Kapillarformation verhindert. Dies geschieht durch die Bindung von Galectin-3 an der Matrix und/oder auf Endothelzellen, oder indem es die Bindung von Galectin-3 an seinen Rezeptor behindert (Nangia-Makker *et al.* 2002). Intravenöse Injektionen von 0,5 % MCP führten zur Inhibierung experimentaler Lungenmetastasen von Melanomzellen (Platt und Raz 1992) und die orale Einnahme inhibiert die spontane Metastasierung der Prostata-Adenokarzinomzellen von Ratten sowie humanen Brusttumorzellen (Iurisci *et al.* 2000; Pienta *et al.* 1995).

Ein weiterer Galectin-3-Antagonist ist GCS-100, ebenfalls ein modifiziertes Zitrusgewächs-Pectin, was auch durch Bindung an Galectin-3 das Tumorwachstum und die Metastasierung inhibiert (zusammengefasst in (Vladoiu *et al.* 2014)).

## 2.4 Fragestellung dieser Arbeit

Nach bisherigen Erkenntnissen ist das Galectin-3 vermehrt im Zellkern verschiedener Zelltypen und Tumorzellen zu finden. Im Zellkern ist Galectin-3 unter anderem an der Transkriptionskontrolle verschiedener Gene beteiligt, aber es ist auch eine Komponente des Spleißosoms. Im pre-mRNA Spleißen ist jedoch bisher unbekannt mit welchen weiteren Spleißkomponenten Galectin-3 interagiert. Mit Hilfe einer Affinitätschromatographiestudie und Immunpräzipitationen sowie mikroskopischen Methoden sollen die möglichen Bindepartner von Galectin-3 im Spleißosom analysiert werden.

Weiterhin ist bisher unbekannt welche Funktion Galectin-3 im Spleißosom einnimmt. Mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung und RNA-Sequenzierung soll dieser Fragestellung auf den Grund gegangen werden.

Zusätzlich werden mit mikroskopischen Untersuchungsmethoden auch die Zusammenhänge zwischen einzelnen Spleißkomponenten untereinander und mit Galectin-3 untersucht.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Geräte, Chemikalien und Materialien

#### 3.1.1 Geräte

Tab. 3-1 Geräte

Gerät	Bezugsquelle
<b>Inkubatoren</b>	
Heraeus Brutschrank B6	Kendro, Langenselbold
Inkubator für Zellkultur (CO <sub>2</sub> -begast) HERA <i>cell</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<b>Sterilbank</b>	
Sterilbank für Zellkultur HeraSafe	Kendro, Langenselbold
<b>Zentrifugen</b>	
Allegra X-22R	Beckman-Coulter, Fullerton, USA
Avanti™ J-20 XP	Beckman-Coulter, Fullerton, USA
Kühlzentrifuge BioFuge fresco	Heraeus
Rotofix 32A	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Tischzentrifuge BioFuge pico	Heraeus
<b>Ultrazentrifuge</b>	
Optima™ LE-80K	Beckman-Coulter, Fullerton, USA
<b>Rotoren</b>	
JLA16.250	Beckman-Coulter, Fullerton, USA
SW50.1	Beckman-Coulter, Fullerton, USA
SX4250	Beckman-Coulter, Fullerton, USA
<b>Heizgeräte</b>	
Heizblock MB-102	Bioer, Hangzhou, China
Heizblock UBD	Grant Instruments, Cambridge, UK
Thermomixer <i>comfort</i>	Eppendorf, Hamburg
<b>Schüttler</b>	
Rotationsschüttler <i>Shaker</i> DOS-10L	Neolab, Heidelberg
Überkopfschüttler Reax 2	Heidolph Instruments, Schwabach
<b>SDS-Gelelektrophorese</b>	
Elektrophoresekammer <i>Mighty Small II</i>	Hoefer, San Francisco, USA
Elektrophoresekammer miniVE	Hoefer, San Francisco, USA
Elektrophoresekammer SE600 Ruby	Hoefer, San Francisco, USA
Gießvorrichtung	Hoefer, San Francisco, USA
Netzgerät EPS 301	Amersham, Piscataway, USA
Netzgerät EPS 501	Amersham, Piscataway, USA
PerfectBlue™ Vertikales Doppelgelsystem Twin L	Peqlap, Erlangen
Platten, „Spacer“, Kämme (8 x 10 cm)	Hoefer, San Francisco, USA
Platten, „Spacer“, Kämme (20 x 20 cm)	Peqlap, Erlangen
<b>Western Blot</b>	
Trans-Blot SD <i>semi-dry transfer cell</i>	Biorad, Hercules, USA
<b>Mikroskope</b>	
Inverses Lichtmikroskop Axiovert 10	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (KLSM) TCS SP2 montiert auf Stativ DM IRE2	Leica Microsystems, Wetzlar
<b>Sonstige optische Geräte</b>	
CD-Spektrometer J-815	Jasco, Gross-Umstadt

Chemilumineszenz/ ECL <i>Imager</i>	Intas, Göttingen
Mikroplatten-Leser Infinite M200	Tecan, Männedorf, Schweiz
Nanodrop 2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zellzähler Countess™	Invitrogen™, Carlsbad, USA
<b>Sonstige Geräte</b>	
Äkta Purifier System 10	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Absaugpumpe Integra Vacusafe	Integra Biosciences, Biebertal
Analysewaage SBC 22	ScalTec Instrument, Göttingen
Elektroporator Gene Pulser Xcell	Biorad, Hercules, USA
Gradientenmischer Econo Gradient Pump	Biorad, Hercules, USA
Peristaltik-Pumpe Minipuls 3	Gilson, Middleton, USA
pH-Messgerät Cyberscan pH 510	Eutech Instruments, Landsmeer, Niederlande
Präzisionswaage SI-144	Denver Instrument, Göttingen
Reinstwasser-System Clear	SG Wasseraufbereitung und Regeneration, Hamburg
High Pressur Homogenisierer ( <i>French Press</i> ) Emulsi-Flex-C3	Avestin
<b>Software</b>	
ImageJ	
LabImage	Intas, Göttingen
Leica LAS AF	Leica Microsystems, Wetzlar
Office 2007, 2013	Microsoft, Redmond, USA
Photoshop CS5	Adobe, San Jose, USA
Prism5	GraphPad, La Jolla, USA
Volocity 5	Improvision, Lexington, USA

### 3.1.2 Chemikalien und Materialien

Tab. 3-2 Chemikalien und Materialien

Chemikalie/Material	Bezugsquelle
12-/24-Lagenplatten	Sarstedt, Nürnberg
Acrylamid (30 %)	Roth, Karlsruhe
Acrylamid 4K-Lösung (40 %) Mix 32:1	AppliChem, Darmstadt
APS	Merck, Darmstadt
Brillant Blue G250	Roth, Karlsruhe
Deckgläser 18 mm $\varnothing$ , 12 mm $\varnothing$	Menzel-Gläser, Braunschweig
DMSO	Roth, Karlsruhe
DTT	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Duolink® <i>In Situ</i> Detection Reagents Orange	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Duolink® <i>In Situ</i> Mounting Medium with DAPI	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Duolink® <i>In Situ</i> PLA® Probe Anti-Mouse MINUS	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Duolink® <i>In Situ</i> PLA® Probe Anti-Goat PLUS	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Duolink® <i>In Situ</i> PLA® Probe Anti-Rabbit PLUS	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Duolink® <i>In Situ</i> Wash Buffers, Fluorescence	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dynabeads® M-280 Sheep anti-Mouse IgG	Life Technologies, Carlsbad, USA
Dynabeads® M-280 Sheep anti-Rabbit IgG	Life Technologies, Carlsbad, USA
ECL-Reagenz SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Filter für Spritze Filtropur S 0.45	Sarstedt, Nürnberg

FKS	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
$\alpha$ -L-Fucose Gel	EY Laboratories, Inc., San Mateo, USA
Glasboden-Kulturplatte Willco-dish®GWSt-5040	WillCo Wells, Amsterdam, Niederlande
HEPES	Serva, Heidelberg
HiTrap NHS-activated HP Säule	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Instant Blue Coomassie	Expedeon Ltd., Cambridge, UK
Kanüle BD Microlance™ 3	BD, New Jersey, USA
Kryoröhrchen	Greiner, Kremsmünster
Laktose Gel	EY Laboratories, Inc., San Mateo, USA
L-Glutamin (10x)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Magnet-Probenständer DynaMag™-2	Life Technologies, Carlsbad, USA
Molekulargewichtsstandard für SDS-PA-Gele PageRuler	Fermentas, St. Leon-Rot
Mowiol 4-88	Merck, Darmstadt
N-Acetylglucosamine Gel	EY Laboratories, Inc., San Mateo, USA
Nitrocellulose-Membran Protran	Schleicher & Schüll, Dassel
NP40	Merck, Darmstadt
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PD-10 Desalting Columns	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Penicillin/Streptomycin (10x)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Pipettenspitzen (10 $\mu$ L, 200 $\mu$ L, 1000 $\mu$ L)	Greiner, Kremsmünster, Österreich
Protein A-Agarose	Santa Cruz Biotechnology
Protein A/G PLUS-Agarose	Santa Cruz Biotechnology
Protein G PLUS-Agarose	Santa Cruz Biotechnology
Protein L-Agarose	Santa Cruz Biotechnology
Protein A-Sepharose	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Protein G-Sepharose	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Protein-Konzentrations-Bestimmung DC™ Protein Assay	Biorad, Hercules, USA
PVDF-Membran Porablot	Macherey-Nagel, Düren
Reaktionsgefäße (0,5 mL, 1,5 mL, 2 mL, 15 mL, 50 mL)	Sarstedt, Nürnberg
Spritzen Omnifix F	Braun, Melsungen
Streptavidin Alexa Fluor® 546	Life Technologies, Carlsbad, USA
TEMED	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tris	Roth, Karlsruhe
tRNA (Bäckerhefe)	Roche, Basel, Schweiz
Trypan Blue stain 0,4 %	Life Technologies, Carlsbad, USA
Trypsin/EDTA	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
UZ-Röhrchen für SW50.1-Rotor	Beckman-Coulter, Fullerton, USA
Vakuumfilter für 500 mL Flaschen Filtropur	Sarstedt, Nürnberg
Zellkulturflaschen T175	Sarstedt, Nürnberg
Zellkultur-Medium DMEM <i>high glucose</i>	Life Technologies, Carlsbad, USA
Zellkultur-Medium Mc Coy's 5a	Life Technologies, Carlsbad, USA
Zellkulturplatten	Sarstedt, Nürnberg
Zellschaber 25 cm	Sarstedt, Nürnberg
Zell-Zählkammern Countess™	Invitrogen™, Carlsbad, USA
Zentrifugen-Filtergefäße Amicon® Ultra-2 mL, 50 k	Merck Millipore, Darmstadt
Zentrifugen-Filtergefäße Amicon® Ultra-0.5 mL, 30 k	Merck Millipore, Darmstadt
Zentrifugen-Filtergefäße Amicon® Ultra-4 mL, 10 k	Merck Millipore, Darmstadt

Weitere, hier nicht aufgeführte, aber allgemein gebräuchliche Chemikalien sind mindestens von p.a.-Qualität und wurden von Sigma, Roth, AppliChem, Serva oder Merck bezogen.

Tab. 3-3 Verwendete Kits

Kit	Bezugsquelle
Immunoprecipitation Kit Dynabeads® Protein G	Life Technologies, Carlsbad, USA
NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
Silber Färbung-Kit Silver Quest™	Invitrogen™, Carlsbad, USA

### 3.2 Allgemeine Puffer

Im Folgenden werden häufig verwendete Puffer aufgeführt. Alle Lösungen wurden mit sterilem, doppelt destilliertem Wasser angesetzt.

#### PBS

140 mM	NaCl
2,5 mM	KCl
6,5 mM	Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
1,5 mM	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
pH 7,35	

#### PBS++

PBS zusätzlich mit

1 mM	CaCl <sub>2</sub>
1 mM	MgCl <sub>2</sub>

### 3.3 Zellkultur

#### 3.3.1 verwendete Zelllinien

##### RC-124

Bei dieser primären Zelllinie handelt es sich um Nierenzellen eines 63-jährigen Mannes mit Nierenkarzinom. Diese Zellen stammen aus dem nicht-tumorösen Gewebe. RC-124 wachsen adhärent und bilden ein Monolayer.

##### RCC-FG1

RCC-FG1 stammen aus dem klarzelligen Nierentumor eines 69-jährigen Mannes und wachsen adhärent. Das klarzellige Nierenzellkarzinom hat seinen Ursprung in den proximalen Tubuluszellen und ist der am häufigsten vorkommende Nierentumor.

##### HeLa-Zellen

Diese humanen Epithelzellen stammen aus dem Cervixkarzinom der 30-jährigen Henriette Lacks. HeLa-Zellen sind die ersten human Zellen, aus denen eine permanente Zelllinie entwickelt wurde. Sie wachsen ebenfalls adhärent.

#### 3.3.2 Medien und Lösungen

Tab. 3-4 Medien

Zelllinie	Medium	Mediumzusätze	Bezugsquelle
RC-124	Mc Coy's 5a	10 % FKS	Life Technologies, Carlsbad, USA
RCC-FG1	Mc Coy's 5a	10 % FKS 2 mM L-Glutamin 2,5 U/mL Penicillin/Streptomycin	Life Technologies, Carlsbad, USA
HeLa-Zellen	DMEM ( <i>high glucose</i> )	10 % FKS 100 U/mL Penicillin/Streptomycin 2 mM L-Glutamin	Life Technologies, Carlsbad, USA

#### 3.3.3 Kultivierung

Die verschiedenen Zelllinien wurden bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und hoher Luftfeuchtigkeit in Plastikkulturschalen (Durchmesser 10 cm) oder in 12-, sowie 24-Loch-Schalen kultiviert. Bei den RC-124 Zellen wurde alle 2-3 Tage das Medium gewechselt. Alle verwendeten Medien finden sich unter 3.3.2 *Medien und Lösungen*.

### 3.3.4 Passagieren

Die RC-124 Zellen wurden alle 4-5 Tage passagiert und in einem Verhältnis von 1:3 ausgesät. Die HeLa-Zellen und die RCC-FG1 wurden alle 2 Tage passagiert, wobei die RCC-FG1 im Verhältnis 1:3 und die HeLa-Zellen im Verhältnis 1:10 ausgesät wurden. Beim Passagieren wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und nach Zugabe von Trypsin/EDTA (0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA in D-PBS) bei 37 °C inkubiert bis sich die Zellen vom Boden und voneinander lösten. Das Trypsin ist eine Endopeptidase und dient dem Ablösen adhärenter Zellen vom Boden und deren Vereinzelung. Der Komplexbildner EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) schützt die Enzymaktivität des Trypsins durch Bindung von Metallionen. Nach dem Ablösen der Zellen vom Boden wurde die Enzymreaktion durch Zugabe des entsprechenden Kulturmediums gestoppt. Die Zelloösung wurde 5 min bei 800 rpm zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde dann im Verhältnis von 1:3 (RC-124 Zellen und RCC-FG1) oder 1:10 (HeLa-Zellen) ausgesät.

### 3.3.5 Einfrieren und Auftauen

Die Zellen einer konfluenten Kulturplatte (Durchmesser 10 cm) wurden mittels Trypsin/EDTA vom Boden gelöst und in 1 mL Einfriermedium aufgenommen. Die Zelloösung wurde dann in Kryoröhrchen überführt und für 1 h bei -20 °C gelagert. Anschließend wurden die Zellen bei -80 °C für 18 h inkubiert und danach in flüssigen Stickstoff überführt.

Beim Auftauen wurde die Zelloösung in 5 mL Kulturmedium aufgenommen und 5 min bei 800 rpm zentrifugiert. Das überstehende Medium wurde entfernt und das Zellpellet in 10 mL frischem Kulturmedium aufgenommen. Diese Zelloösung wurde auf einer Kulturschale (Durchmesser 10 cm) ausgesät.

#### Einfriermedium

Medium (Zelllinien entsprechend)

10 % FKS

10 % DMSO

### 3.3.6 Zellen zählen

Die Zellen wurden trypsiniert und 5 min bei 800 rpm abzentrifugiert (Verfahren zum Trypsinieren siehe 3.3.4 *Passagieren*). Das Zellpellet wurde in Kulturmedium resuspendiert und 10 µL der Zelloösung wurde mit 10 µL Trypanblau (Life Technologies, Carlsbad (USA)) vermischt und in eine Zählkammer (Countess™, Invitrogen™) übertragen. Die Zellen wurden mittels Zellzähler Countess™ (Invitrogen™) gezählt.

### 3.3.7 Transfektion

#### 3.3.7.1 Elektroporation

Die Elektroporation zählt zu den physikalischen Verfahren der Transfektion. Bei dieser Methode wird mittels eines Elektroporators ein elektrisches Feld erzeugt und somit wird die Zellmembran vorübergehend permeabel für DNA und RNA gemacht.

Für die Elektroporation wurden HeLa-Zellen trypsinisiert (Verfahren zum Trypsinieren siehe 3.3.4 *Passagieren.*) und anschließend gezählt (siehe 3.3.6 *Zellen zählen*).  $4 \cdot 10^6$  Zellen pro Ansatz wurden einmal mit PBS gewaschen und 5 min bei 800 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 250  $\mu$ L Elektroporationspuffer resuspendiert und die siRNA wurde hinzugefügt. Anschließend wurde die Zelllösung in eine Elektroporationsküvette (4 mm) überführt und bei 262 V und 525  $\mu$ F für ca. 30 sec mit dem Elektroporator Gene Pulser Xcell (Biorad) elektroporiert. Daraufhin wurden die Zellen zügig in Kulturmedium aufgenommen und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

#### Elektroporationspuffer

21 mM	Hepes
137 mM	NaCl
5 mM	KCl
0,7 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
6 mM	D-Glucose
pH 7,15	

#### 3.3.7.2 RNA-Interferenz

Bei der RNA-Interferenz handelt es sich um einen natürlich vorkommenden Mechanismus zur zielgerichteten Abschaltung von Genen. Bei diesem Mechanismus kommt es zur Interaktion kurzer komplementärer Ribonukleinsäuren mit der Ziel-mRNA. Dies führt zum Abbau der mRNA und somit wird die Translation des entsprechenden Proteins verhindert. In der Forschung wird diese Methode genutzt, um die Expression bestimmter Proteine zu verhindern bzw. zu vermindern (*knockdown*) und somit Rückschlüsse auf die Funktion des Proteins zu schließen. Für die Experimente dieser Arbeit wurden ausschließlich siRNAs (*short interfering RNAs*) verwendet.

Für den *knockdown* verschiedener Proteine wurden HeLa-Zellen trypsinisiert und abzentrifugiert (Verfahren zum Trypsinieren siehe 3.3.4 *Passagieren.*). Die Zellen wurden gezählt (siehe 3.3.6 *Zellen zählen*) und pro Ansatz wurden  $4 \cdot 10^6$  Zellen verwendet. Die Elektroporation wurde wie in Kapitel 3.3.7.1 *Elektroporation* beschrieben, durchgeführt. Es wurden 5 – 10  $\mu$ L siRNA eingesetzt.

Tab. 3-5 Verwendete siRNAs

Bezeichnung	Sense-Strang (5' → 3')	Bezugsquelle
Galectin-1 siRNA		Santa Cruz Biotechnology, Inc. Sc-35441
Hs_LGALS3_3	CGGUGAAGCCCAAUGCAAATT	Qiagen, Venlo, Niederlande
Hs_HNRNPA2B1_9	GGAUUAAUUAAUAACAUAUATT	Qiagen, Venlo, Niederlande
Luciferase	CGUACGCGGAUACUUCGATT	Ambion® (Life Technologies, Carlsbad, USA)

### 3.4 Molekularbiologische Methoden

#### 3.4.1 RNA-Isolierung

Für die RNA-Isolierung wurde eine Kulturplatte (Durchmesser 10 cm) mit konfluenten HeLa-Zellen verwendet. Die Zellen wurden 3-mal mit PBS gewaschen. Nach der Zugabe von 600 µL RLT-Puffer (Rneasy Mini Kit, Qiagen) wurden die Zellen von der Kulturschale abgeschabt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden mit Hilfe einer 20G Kanüle mechanisch lysiert, dies geschah durch 10-faches auf- und abziehen. Zum Zelllysats wurde 600 µL Ethanol (70 %) zugegeben und per auf- und abpipettieren gemischt. 700 µL des Zelllysats wurden in ein RNeasy Mini *Column* (Rneasy Mini Kit, Qiagen) überführt und 15 sec bei 15000 rpm zentrifugiert. Die Säulen besaßen eine Silica Membran, an welche die RNA gebunden wurde. Anschließend wurde die gebundene RNA mittels RW1- und RPE-Puffer (Rneasy Mini Kit, Qiagen) gewaschen. Die RNA wurde von der Säule durch Zugabe von 40 µL RNase-freiem Wasser und einer Zentrifugation bei 10000 rpm für 1 min eluiert. Mittels Nanodrop wurde am Ende die Konzentration bestimmt.

#### 3.4.2 RNA-Sequenzierung

Die RNA-Sequenzierung diente der Analyse der mRNA-Expression nach dem Vermindern von Galectin-3. Dazu wurde die RNA zunächst isoliert (siehe 3.4.1 *RNA-Isolierung*). Die anschließende Sequenzierung wurde durch die AG Stiewe, Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung, Philipps-Universität Marburg, durchgeführt. Diese verwendeten das TruSeq® Stranded mRNA LT Kit um die RNA-Sequenzierungs-Bibliothek herzustellen. Die Sequenzierung der Bibliothek wurde mit Hilfe des Illumina HiSeq 1500 Sequenzierer über *paired-end sequencing* durchgeführt, um 2x50 bp *paired reads* zu bekommen. Die erhaltenen *reads* wurden mit der *Homo sapiens*-Genomreferenz (Ensemble Revision 74, hg19) abgeglichen, unter Verwendung des STAR Algorithmus (Dobin *et al.* 2013). Die FPKM (Fragments per Kilobase of Exon per Million Fragments Mapped)-Werte wurden für jede Probe kalkuliert, unterschiedliche Gen-Expressionen wurden per Deseq2 analysiert (Love *et al.* 2014). Die Gene mit einem FPKM Wert über 0,3 in mindestens einer Probe, einem Deseq p-Wert von 0,05 oder besser und wenn

das Absolute vom log<sub>2</sub>-fachen Unterschied 1 oder größer war, wurden als differentiell exprimiert betrachtet. Die unterschiedliche Verwendung von Exons wurde mittels DEXseq analysiert (Anders *et al.* 2012). Die verschiedenen Isoformen wurden mit MISO analysiert (Katz *et al.* 2010). Für alle Algorithmen wurde die Standard-Parametrisierung verwendet. Die Analyse der Daten wurde von Marco Mernberger (AG Stiewe, Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung, Philipps-Universität Marburg) durchgeführt.

## 3.5 Zellbiologische Methoden

### 3.5.1 Zellkern-Extraktion

Zur Analyse der Protein-Interaktionen im Zellkern wurden die Zellkern-Proteine von den zytoplasmatischen Proteinen mittels Zellkern-Extraktion getrennt. Hierzu wurde das *NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents*-Kit von Thermo Scientific verwendet. Für die Zellkern-Extraktion wurden die Zellen trypsinisiert und abzentrifugiert (Verfahren zum Trypsinieren siehe 3.3.4 *Passagieren.*). Das Zellpellet wurde in ein 15 mL Reaktionsgefäß überführt und einmal mit PBS gewaschen, daraufhin folgte eine erneute Zentrifugation für 5 min bei 500 rpm. Das Zellpellet wurde in CER I-Puffer (*NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents*, Thermo Scientific) zusammen mit Proteinase Inhibitor resuspendiert. Die Lösung wurde per Vortexen gemischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde CER II-Puffer (*NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents*, Thermo Scientific) zugegeben, per vortexen vermischt und für 1 min auf Eis inkubiert. Die Zelllösung wurde bei 12610 rpm (16 000 g) für 5 min abzentrifugiert und der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und als zytoplasmatischer Extrakt auf Eis gelagert. Das Pellet wurde in CER-Puffer (*NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents*, Thermo Scientific) zusammen mit Proteinase Inhibitor resuspendiert. Die Lösung wurde für 40 min auf Eis inkubiert, wobei die Lösung alle 10 min für 15 sec gevortext wurde. Abschließend wurde die Lösung für 10 min bei 12610 rpm (16 000 g) abzentrifugiert und der Überstand (nukleärer Extrakt) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und in flüssigen Stickstoff heruntergekühlt, um die Proben dann bei -80 °C zu lagern. Vor dem Einfrieren wurden jeweils 20 µL vom nukleären und cytoplasmatischen Extrakt entnommen und die Proteinkonzentration per Lowry (siehe 3.6.1 *Bestimmung der Proteinkonzentration*) bestimmt.

Tab. 3-6 Mengenangaben Zellkern-Extraktion

Zellpellet Volumen [ $\mu\text{L}$ ]	CER I [ $\mu\text{L}$ ]	CER II [ $\mu\text{L}$ ]	NER [ $\mu\text{L}$ ]
10	100	5,5	50
20	200	11	100
50	500	27,5	250
1000	1000	55	500

**Proteinase-Inhibitoren-Mix (PI)**

Lösung 1:	PMSF	3,4 mg/mL (in DMSO)
Lösung 2:	Pepstatin	1 mg/mL (in DMSO)
	Antipain	1 mg/200 $\mu\text{L}$ (in DMSO)
	Leupeptin	1 mg/200 $\mu\text{L}$ (in PBS)
	Aprotinin	1 mg/mL (in PBS)
	Trypsin/Chymotrypsin-Inhibitor	25mg/500 $\mu\text{L}$ (in PBS)

Vor Gebrauch wurden 25  $\mu\text{L}$  Lösung 1 mit 500  $\mu\text{L}$  Lösung 2 gemischt.

**3.5.2 Herstellung von Zelllysaten**

Zur Überprüfung der Expression der nachzuweisenden Proteine im Western Blot wurden Zelllysate der entsprechenden Zelllinien hergestellt. Hierzu wurde eine konfluente Kulturplatte mit der entsprechenden Zelllinie 3-mal mit PBS++ gewaschen. Anschließend wurden 500  $\mu\text{L}$  Lysispuffer hinzugegeben und die Zellen von der Kulturplatte abgeschabt, diese Lösung wurde in ein Reaktionsgefäß überführt. Der Zelllösung wurde Proteinase-Inhibitor zugefügt und für 60 min bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Lösung bei 13 000 rpm für 15 min und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde als Zelllysate bei -20 °C gelagert, zuvor wurde die Proteinkonzentration per Lowry (siehe 3.6.1 *Bestimmung der Proteinkonzentration*) bestimmt.

**Lysispuffer**

25 mM	Tris
1 mM	EDTA
1 mM	EGTA
100 mM	NaCl
1 % (v/v)	Triton X-100
0,5 % (v/v)	NP40
pH 7,5	

## 3.6 Allgemeine proteinbiochemische Methoden

### 3.6.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen wurde mittels der Methode nach Lowry durchgeführt. Dies ist eine quantitative Methode, wobei zuerst eine Biuretreaktion stattfindet, indem sich ein blauvioletter Komplex zwischen den Peptidbindungen und den Kupfer-Ionen in einer alkalischen Lösung bildet. Diese Kupfer-Ionen werden im zweiten Schritt zu Kupfer(I)-Ionen reduziert und die Kupfer(I)-Ionen ihrerseits reduzieren das gelbe Folin-Ciocalteu-Reagenz (Molybdadophosphorsäure und Wolframophosphorsäure/Heteropolysäuren) zu Molybdänblau. Am Ende entsteht eine blaue Lösung, welche mittels eines Photometers bei 750 nm vermessen wird (Lowry *et al.* 1951). Die Extinktionswerte der zu untersuchenden Proteine werden über eine BSA-Standardkurve ermittelt. Dabei dient eine Verdünnungsreihe mit aufsteigender BSA-Proteinkonzentration als Kalibrierungskurve und mittels der Funktion der Kalibrierungskurve kann die zu ermittelnde Proteinkonzentration bestimmt werden.

Zur Protein-Konzentrationsbestimmung wurden die Lösungen des DC™ Protein Assay (Biorad) verwendet. Zu Beginn wurde eine Verdünnungsreihe von BSA und dem entsprechenden Probenpuffer hergestellt. Die Verdünnungsreihe und die zu untersuchenden Proben wurden in einem Volumen von jeweils 5 µL als Doppelansatz in eine 96-Loch-Platte (Sarstedt) überführt. 20 µL Reagenz S (Protein Assay Reagent S, Biorad) wurde mit 1 mL alkalinem Reagenz A (Protein Assay Reagent A, Biorad) vermischt und jeweils 25 µL der Mischung wurde zu den Proteinlösungen in der 96-Loch-Platte gegeben. Anschließend wurden 200 µL Folin-Reagenz B (Protein Assay Reagent B, Biorad) zu jedem Loch hinzugegeben. Die photometrischen Messungen wurden mittels eines Mikroplatten-Leser Infinite M200 (Tecan) vorgenommen, dabei wurde die Platte 5 sec gemischt und für 15 min bei 22 °C inkubiert. Danach erfolgte die Messung bei 750 nm und 22 °C. Die Extinktionswerte wurden mittels Excell (Microsoft Office) bearbeitet.

### 3.6.2 Co-Immunpräzipitation

Die Co-Immunpräzipitation dient der Aufreinigung von Proteinen und deren Interaktionspartnern aus einem Proteingemisch per Antikörper-Bindung. Die Aufreinigung des Antikörper/Protein-Komplexes erfolgt über die Bindung des Antikörpers an Protein A, G oder L gekoppelte Agarose/Sepharose-Kügelchen. Protein A stammt aus der Zellwand des *Staphylococcus aureus*, Protein G ist Teil der Zellwand von Streptokokken und Protein L stammt vom *Peptostreptococcus magnus*. Diese Proteine binden an die Fc-Region der Antikörper, dies erfolgt durch die Interaktion mit der schweren Kette. Mittels Zentrifugation lassen sich die Antikörper/Protein-Komplexe, gebunden über Protein A, G oder L an Agarose/Sepharose-Kügelchen, von dem restlichen Proteingemisch trennen.

### 3.6.2.1 Agarose/Sepharose-Beads

Bei der Co-Immunpräzipitation mittels Sepharose-*Beads* wurden die nukleären Extrakte (siehe 3.5.1 *Zellkern-Extraktion*) mit 40 µL Protein A/G-Sepharose für 1 h bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler vorinkubiert, um unspezifische Bindung zu entfernen. Diese Lösung wurde anschließend für 1 min bei 5000 rpm und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zu der vorgereinigten Lösung wurde der Antikörper gegeben und über Nacht bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde dem Antikörper/Protein-Komplex 40 µL Protein A/G-Sepharose zugegeben und für 1 h bei 4°C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Die Trennung vom restlichen Proteingemisch erfolgte per Zentrifugation bei 5000 rpm für 1 min bei 4 °C. Das Pellet wurde anschließend 4-mal mit PBS gewaschen und mit 30 µL SDS-Probenpuffer versetzt. Die Analyse der Proben erfolgte mittels SDS-PAGE (siehe 3.6.4 *SDS-PAGE*) und Western Blot (siehe 3.6.6 *Western Blot-Verfahren*)/Coomassie-Färbung (siehe 3.6.7 *Coomassie-Färbung*).

Für die Co-Immunpräzipitation über Protein A, G oder L Agarose-*Beads* wurde der nukleäre Extrakt (siehe 3.5.1 *Zellkern-Extraktion*) zunächst ungepuffert. Dabei wurde das Proteingemisch mittels Zentrifugen-Filtergefäßen Amicon® Ultra-0.5, 30k (Merck Millipore) durch Zentrifugation bei 13 000 rpm für 30 min eingengt und mit RIPA-Puffer auf ein Volumen von 500 µL eingestellt. Diesem Proteingemisch wurde noch 10 µL Proteinase-Inhibitor hinzugefügt. Der ungepufferte nukleäre Extrakt wurde durch Zugabe von 20 µL Protein A, G oder L Agarose und Inkubation für 30 min bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler vorgereinigt. Die Lösung wurde anschließend für 5 min bei 2500 rpm und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zu diesem Überstand wurde Antikörper hinzugegeben und über Nacht bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Am folgenden Tag wurde 20 µL Protein A, G oder L Agarose beigefügt und 1 h bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Die Trennung vom restlichen Proteingemisch erfolgte per Zentrifugation bei 2500 rpm für 5 min bei 4 °C. Das Pellet wurde anschließend 4-mal mit PBS gewaschen. Am Ende wurde dem Pellet 30 µL 3x SDS-Probenpuffer zugegeben und 5 min bei 95 °C inkubiert. Nach Zentrifugation von 1 min bei 13000 rpm wurde die Probe per SDS-PAGE (siehe 3.6.4 *SDS-PAGE*) und Western Blot (siehe 3.6.6 *Western Blot-Verfahren*) analysiert.

Tab. 3-7 Verwendete Antikörper Co-Immunpräzipitation

Antigen	Klon	Spezies	pk/mk	Hersteller	Verwendete Menge
Galectin-3	H-160	Kaninchen	pk	Santa Cruz Biotechnology	2,5 µg
Galectin-3	M3/38	Ratte	mk	Santa Cruz Biotechnology	1,2 – 2,5 µg
hnRNPA2B1		Kaninchen	pk	Abcam	2,5 – 4 µg
U2AF65	MC3	Maus	mk	Sigma Aldrich	2 µg

**3x SDS-Probenpuffer:**

0,15 mM	Tris
30 % (v/v)	Glycerin
6 % (w/v)	SDS
0,02 % (w/v)	Bromphenolblau

Vor Gebrauch wurde 1 mL 3x SDS-Probenpuffer mit 167  $\mu$ L 1 M DTT vermischt.

**RIPA-Puffer:**

50 mM	Tris-Hcl
150 mM	NaCl
1 mM	EDTA
1 % (v/v)	Triton X-100
1 % (w/v)	Natriumdeoxycholat
0,01 % (w/v)	SDS
pH 7,4	

**3.6.2.2 Dynabeads®**

Eine weitere Art der Co-Immunpräzipitation ist die Aufreinigung des Antikörper/Proteinkomplexes über an Magnetkügelchen gekoppeltes Protein G oder gekoppelte IgGs. Hierzu wurden das Immunpräzipitations-Kit Dynabeads® Protein G (Life Technologies) und die Dynabeads® M-280 Sheep anti-Mouse IgG (Life Technologies), sowie Dynabeads® M-280 Sheep anti-Rabbit IgG (Life Technologies) verwendet. Zu Beginn wurde der nukleäre Extrakt (siehe 3.5.1 *Zellkern-Extraktion*) umgepuffert. Dabei wurde das Proteingemisch mittels Zentrifugen-Filtergefäßen Amicon® Ultra-0.5, 30k (Merck Millipore) durch Zentrifugation bei 13 000 rpm für 30 min eingengt und mit RIPA-Puffer auf ein Volumen von 500  $\mu$ L eingestellt. Diesem Proteingemisch wurde noch 10  $\mu$ L Proteinase-Inhibitor hinzugefügt und auf Eis gelagert. Die Dynabeads® (Protein G, anti-rabbit IgG, anti-mouse IgG) wurden zunächst vom Lagerpuffer getrennt, indem 50  $\mu$ L der Dynabeads® in ein Reaktionsgefäß überführt wurden und mittels Magnet-Probenständer DynaMag™-2 (Life Technologies) haben die Dynabeads® an den Magneten gebunden, der Puffer wurde somit entfernt. Der Primärantikörper wurde in 200  $\mu$ L PBS (+ 0,05 % Tween-20 (v/v)) gelöst und zu den Dynabeads® gegeben. Beides wurde durch vorsichtiges Auf- und Abpipetieren vermischt und für 10 min bei Raumtemperatur auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Der Überstand der Antikörper/Dynabeads®-Lösung wurde über den Magnetständer entfernt und die Antikörper/Dynabeads® wurden mit 200  $\mu$ L *binding & washing buffer* (Immunpräzipitations-Kit Dynabeads® Protein G, Life Technologies) gewaschen. Anschließend wurde der nukleäre Extrakt hinzugegeben und

für 35 min bei Raumtemperatur auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Der Antikörper/Dynabeads®/Protein-Komplex wurde 3-mal mit 200 µL *washing buffer* (Immunpräzipitations-Kit Dynabeads® Protein G, Life Technologies) gewaschen. Durch Zugabe von 20 µL Elutionspuffer (Immunpräzipitations-Kit Dynabeads® Protein G, Life Technologies) und 10 µL 3x SDS-Probenpuffer sowie einer Inkubation von 10 min bei 70 °C wurden die Proteine von den Dynabeads® getrennt. Mittels des Magnetständers wurde die Proteinlösung als Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C gelagert oder direkt mittels SDS-PAGE (siehe 3.6.4 *SDS-PAGE*) und Western Blot (siehe 3.6.6 *Western Blot-Verfahren*) analysiert.

### 3.6.3 Saccharid-Immunpräzipitation

Diese Art der Immunpräzipitation dient der Proteinaufreinigung über die Bindung an Saccharide gekoppelt an Sepharose *Beads* und soll die Bindungsaffinität eines spezifischen Proteins an Sacchariden aufklären. Hierzu wurde HeLa-Zelllysat (siehe 3.5.2 *Herstellung von Zelllysaten*) durch Zugabe von 40 µL Protein A Sepharose und Inkubation für 1 h bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler vorgereinigt. Diese Lösung wurde anschließend für 1 min bei 5000 rpm und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zum vorgereinigten Lysat wurde anschließend 40 µL Saccharid-Sepharose gegeben und über Nacht bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Probe für 1 min bei 5000 rpm und 4 °C abzentrifugiert und das Pellet wurde anschließend 4-mal mit PBS gewaschen. Dem Pellet wurde 30 µL 3x SDS-Probenpuffer zugegeben und 5 min bei 95°C inkubiert. Nach Zentrifugation von 1 min bei 13000 rpm wurde die Probe mittels SDS-PAGE (siehe 3.6.4 *SDS-PAGE*) und Western Blot (siehe 3.6.6 *Western Blot-Verfahren*) analysiert.

Tab. 3-8 Verwendete Saccharide

Saccharid	Bezugsquelle
α-L-Fucose Gel	EY Laboratories, Inc., San Mateo, USA
Laktose Gel	EY Laboratories, Inc., San Mateo, USA
N-Acetylglucosamin Gel	EY Laboratories, Inc., San Mateo, USA

### 3.6.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Diese biochemische Methode dient der Trennung von Proteinen entsprechend ihrer Größe in einem elektrischen Feld. Dieses diskontinuierliche System wurde von Ulrich K. Laemmli entwickelt (Laemmli 1970). Die Matrix ist ein Polyacrylamidgel und durch die Zugabe von SDS (Natriumdodecylsulfat), ein anionisches Tensid, wird die Eigenladung des Proteins überdeckt, wodurch es eine negative Ladung erhält. Durch die negative Ladung ist es dem Protein möglich, nach Anlegen einer elektrischen Spannung, sich durch das Gel zu bewegen. Hierbei werden größere Proteine länger zurückgehalten und finden sich im oberen Bereich des Trenngels. Zuvor wandern die Proteine durch das Sammelgel mit

neutralem pH-Wert. Hier sammeln sich die Proteine, um anschließend im basischen Trenngel aufgetrennt zu werden. Das Gel wird in einem Tris-Glycin-Puffersystem gelagert, das für die Elektrolyteversorgung dient. Als Größenmarker wird eine Lösung mit Proteinen bekannter Größe verwendet.

Bevor die Proben aufs Gel geladen wurden, wurden sie mit 3x SDS-Probenpuffer und DTT versetzt. Das SDS führte zu einer negativen Ladung der Proteine sowie zur Abstoßung dieser und durch die Zugabe von DTT (Dithiothreitol) wurden die Disulfidbrücken gespalten. Das Aufkochen der Proben bei 95 °C führte zusätzlich zur Denaturierung der Proteine und gemeinsam mit der Abstoßung wurden die Proteine linearisiert. Am Ende der Probenvorbereitung wurden sie bei 13000 rpm für 1 min abzentrifugiert. Zur Herstellung der Gele wurde die Methode aus *Molecular Cloning* verwendet (Sambrook *et al.* 2001). Es wurden 8 – 12 prozentige Gele gegossen. Als Größenmarker diente der *PageRuler* von Fermentas. Zu Beginn wurde die Elektrophorese bei einer Spannung von 80 Volt für ca. 30 min durchgeführt. Sobald die Bromphenolblaulauffront ins Trenngel übergang, wurde die Spannung auf 160 Volt erhöht und beendet als das untere Ende des Trenngels erreicht wurde. Das Gel wurde danach aus den Glasplatten genommen und entweder einer Coomassie-Färbung (siehe 3.6.7 *Coomassie-Färbung*) unterzogen oder auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet (siehe 3.6.6 *Western Blot-Verfahren*).

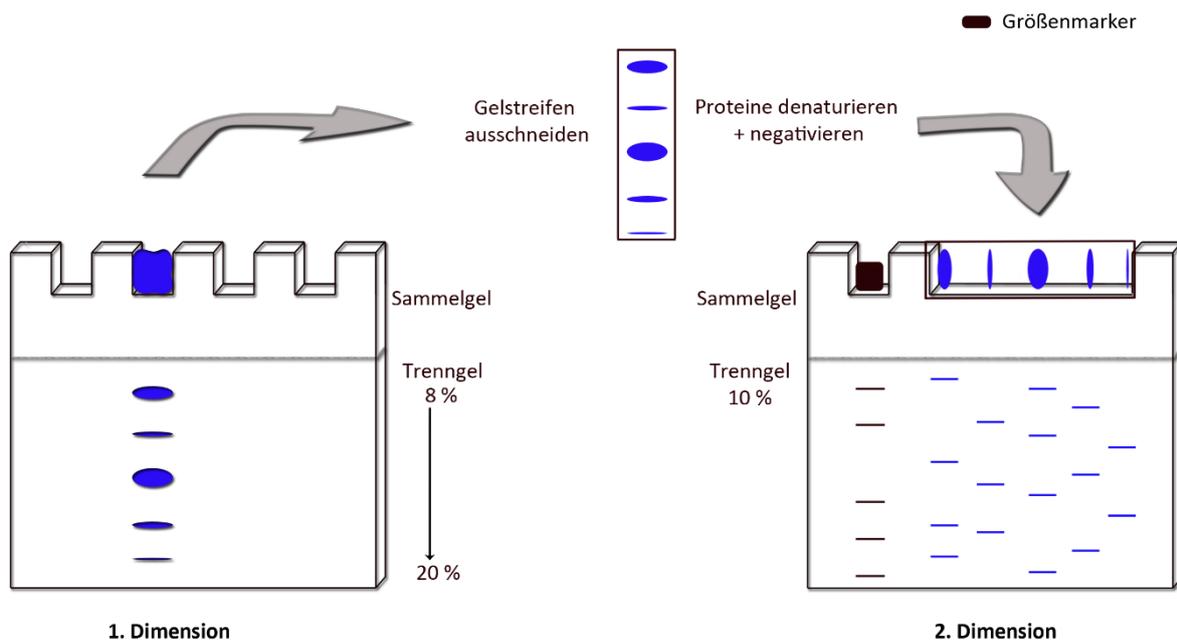
#### **Laufpuffer für SDS-PAGE:**

25 mM	Tris
190 mM	Glycin
0,1 % (w/v)	SDS

### **3.6.5 Native Gelelektrophorese (*Blue Native Page*)**

Bei der nativen Gelelektrophorese werden Proteine in einem Gel aufgetrennt, wobei diese aber nicht denaturiert werden und somit in ihrer nativen Proteinfaltung bleiben. Die Auftrennung erfolgt nicht nach der Molekularmasse, sondern nach dem isoelektrischen Punkt und dem hydrodynamischen Volumen. Hierzu wurden 1,5 mL des nukleären Extraktes von HeLa-Zellen (siehe 3.5.1 *Zellkern-Extraktion*) mittels Zentrifugen-Filtergefäßen Amicon® Ultra-2 mL, 50 k (Merck Millipore) eingeeengt, indem sie 3 h bei 11796 rpm (14 000 g) und 4°C abzentrifugiert wurden. Anschließend wurden die eingeeengten Proben in BN-Probenpuffer für 15 min auf Eis inkubiert und kurz vor der Beladung des Gels mit 5 µL Coomassie Brilliant Blue G250 versetzt (in 500 mM 6-AcA: Finalkonzentration 0,5 %). Nach weiteren 5 min Inkubationszeit auf Eis, wurden die Proben auf ein natives Gradientengel geladen. Um ein möglichst weites Spektrum abzudecken wurden Gradientengele verwendet, deren Polyacrylamidkonzentration zwischen 8 % und 20 % lag. Das Sammelgel hatte eine Polyacrylamidkonzentration von 3,2 %. Die innere Kammer der Elektrophoresekammer wurde mit blauem Kathodenpuffer und die äußere Kammer wurde mit Anodenpuffer beladen. Es wurde eine Spannung von 40 V für 18 – 20 h angelegt.

Nachdem die Lauffront der Probe ca. 1/3 des Gels durchlaufen hatte, wurde der blaue Kathodenpuffer durch Kathodenpuffer ersetzt. Bei diesem Gellauf spricht man von der 1. Dimension. Nach Beendigung dieses Gellaufs wurde das Gel aus den Gelplatten entfernt und die Probe, deren Komplexe sich über das Gradientengel verteilt hatten, wurde in Form eines vertikalen Streifens aus dem Gel geschnitten (Abb. 3-1). Der Gelstreifen wurde dann in 2x SDS-Denaturierungspuffer für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für maximal 20 sec in der Mikrowelle aufgeköcht. Hierbei wurden die nativen Proteine denaturiert und durch das SDS wurde die Eigenladung der Proteine überdeckt und sie bekamen eine negative Ladung. Der Gelstreifen wurde für weitere 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Auftrennung der denaturierten Proteine wurde der Gelstreifen in ein 10 % SDS-PAGE geschoben und aufgetrennt (siehe 3.6.4 SDS-PAGE), dies wurde auch als 2. Dimension bezeichnet. Hierbei wurden die denaturierten Proteine der nativen Proteinkomplexe aufgetrennt und gaben somit Aufschluss über die Proteinzusammensetzung einzelner Proteinkomplexe (Abb. 3-1). Das SDS-PAGE wurde zum Schluss auf eine PVDF-Membran übertragen (siehe 3.6.6 Western Blot-Verfahren).



**Abb. 3-1 Native Gelelektrophorese 1. + 2. Dimension.**

Proteinkomplexe werden in der 1. Dimension mittels eines nativen Gradientengels separiert und der Gelstreifen wird ausgeschnitten. Die nativen Komplexe werden denaturiert und die Proteine werden mit einer negativen Ladung versehen. In der 2. Dimension werden die Proteine auf einem SDS-PAGE aufgetrennt.

**BN-Probenpuffer:**

50 mM BisTris

125 mM 6-AcA

pH 7,0

kurz vor der Benutzung: + Proteinase-Inhibitor (siehe 3.5.1 Zellkern-Extraktion)

+ 0,1 % Triton X-100

**8 % - 20 % Gradientengel + Sammelgel:**

Für ein Gel der Größe 20 x 20 cm:

Tab. 3-9 Zusammensetzung natives PAA-Gradientengel

Chemikalie	Trenngel		Sammelgel
	8 %	20 %	3,2 %
Gelpuffer	5 mL	5 mL	3 mL
PAA (40 %) Mix 32:1	3 mL	7,5 mL	0,72 mL
dH <sub>2</sub> O	7 mL	-	5,28 mL
Glycerol (70%)	-	2,5 mL	-
APS (10%)	54 µL	42 µL	120 µL
TEMED	5,4 µL	4,2 µL	12 µL

Gelpuffer: 50 mM BisTris

125mM 6-AcA

pH 7,0

**Blauer Kathodenpuffer:**

15 mM BisTris

50 mM Tricin

0,02 % Coomassie Brilliant Blue G250

pH 7,0

**Kathodenpuffer:**

15 mM BisTris

50 mM Tricin

pH 7,0

**Anodenpuffer:**

50 mM BisTris

pH 7,0

**2 x SDS-Denaturierungspuffer:**

12,5 mM	Tris
4 %	SDS
20 %	Glycerol
0,02 %	Bromphenolblau
pH 6,8	

Vor Gebrauch wurde 10 mL 2x SDS-Denaturierungspuffer mit 1,67 mL DTT (1 M) versetzt.

**3.6.6 Western Blot-Verfahren**

Das Western Blot-Verfahren dient der Übertragung von Proteinen auf eine Trägermembran. Hierbei wurde das *semi-dry* WB-Verfahren gewählt (Burnette 1981). Die Übertragung verläuft mittels Elektrophorese, indem das PAA-Gel auf eine Trägermembran befördert und eine Spannung angelegt wird, dadurch wandern die negativ geladenen Proteine auf die Membran. Hierzu wurde die Membran auf 1 Whatman-Papier gelegt und darauf das PAA-Gel, abschließend wurde noch ein Whatman-Papier aufgelegt und bei einer Spannung von 12 V und maximal 400 mA für 50 – 75 min angelegt. Die Whatman-Papiere, die Trägermembran und das PAA-Gel wurden vor dem Aufbau kurz in Transferpuffer inkubiert. Als Trägermembran dienten die Nitrocellulose-Membran (Schleicher & Schüll) und die PVDF-Membran (Macherey-Nagel), wobei die PVDF-Membran zuvor in Ethanol für wenige Minuten inkubiert wurde, um aktiviert zu werden. Im Anschluss an die Elektrophorese wurde die Membran in Blocklösung (5 % (w/v) Magermilchpulver in PBS) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Dies diente der Sättigung von freien Bindungsstellen der Proteine, um unspezifische Bindungen der Primär- und Sekundärantikörper zu verhindern. Nach dem Blocken wurde die Membran 3-mal für jeweils 10 min bei Raumtemperatur mit PBS gewaschen. Zur Detektion der Proteine wurde die Membran mit Primärantikörpern inkubiert, die gegen das gesuchte Protein gerichtet waren. Die Inkubationszeit war hierbei 1 h oder über Nacht bei 4 °C. Bevor der HRP-gekoppelte Sekundärantikörper zu der Membran gegeben wurde, wurde die Membran 4-mal für jeweils 10 min bei Raumtemperatur mit PBS gewaschen. Der Sekundärantikörper ist gegen die Spezies gerichtet, aus der der Primärantikörper kommt und durch die Kopplung mit Meerrettichperoxidase konnte das gesuchte Protein detektiert werden. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper betrug 1 h bei Raumtemperatur. Zum Abschluss wurde die Membran 3-mal für jeweils 10 min bei Raumtemperatur mit PBS gewaschen. Zur Detektion der entsprechenden Signale wurde das Kit ECL-Reagenz *SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate* (Thermo Fischer) verwendet. Dies beinhaltet Luminol und Peroxid, welches durch Zugabe zur Membran, durch die Meerrettichperoxidase oxidiert wurde und dabei wurde Licht emittiert, dies wurde von einer Kamera aufgenommen. Es wurden 200 µL Luminol mit 200 µL Peroxid und 200 µL PBS vermischt, diese

Lösung wurde auf der Membran verteilt. Das Chemilumineszenzsignal wurde mittels des Chemilumineszenz/ECL Imager (Intas) detektiert. Einige Signale wurden densitometrisch quantifiziert, dazu wurde LabImage 1D verwendet.

#### Transferpuffer:

25 mM	Tris
190 mM	Glycin
20 % (v/v)	Ethanol

Tab. 3-10 Verwendete Antikörper für Western Blot-Analysen

Antigen	Klon	Spezies	pk/mk	Hersteller	Verdünnung (in PBS)
<b>Primärantikörper</b>					
Galectin-1	C-8	Maus	mk	Santa Cruz Biotechnology	1:300
Galectin-3	M3/38	Ratte	mk	Santa Cruz Biotechnology	1:300
hnRNPA2B1	DP3B3	Maus	mk	Abcam	1:500
$\alpha$ -Tubulin	DM1A	Maus	mk	Sigma Aldrich	1:500
U1 snRNP 70	H-280	Kaninchen	pk	Santa Cruz Biotechnology	1:300
U2AF65	MC3	Maus	mk	Sigma Aldrich	1:500
<b>Sekundärantikörper</b>					
Maus-IgG		Ziege	pk	Biorad	1:2000
Kaninchen-IgG		Ziege	pk	Biorad	1:2000
Ratte-IgG			pk		1:2000

### 3.6.7 Coomassie-Färbung

Die Coomassie-Brillant-Blau-Färbung dient der unspezifischen Färbung von Proteinen auf PAA-Gelen, indem sich der Triphenylmethanfarbstoff an die basischen Seitenketten der Aminosäuren anlagert. Die zu färbenden PAA-Gele wurden zunächst 2x jeweils 3 min bei Raumtemperatur mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend wurde die kolloidale Coomassie-Lösung zugegeben und dieses bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Die Entfärbung erfolgte mittels ddH<sub>2</sub>O, dabei wurde dieses des Öfteren gewechselt. Die gefärbten Gele wurden danach eingescannt und einige wurden für die Analyse per Massenspektrometrie verwendet. Gelagert wurde das gefärbte PAA-Gel in der Lagerlösung bei 4 °C.

**Kolloidale Coomassie-Färbelösung:**

10 % (w/v)	Ammoniumsulfat
0,1 % (w/v)	Coomassie G250
3 % (v/v)	Orthophosphorsäure
20 % (v/v)	Ethanol

**Lagerlösung:**

1 % (v/v)	Glycerin
30 % (v/v)	Ethanol

**3.6.8 Massenspektrometrie: MALDI-TOF**

Die hier verwendete Art der Massenspektrometrie ist die *Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionisation – Time of Flight* (MALDI-TOF) und dient der Identifikation von Proteinen. Bei dieser Methode wird die Ionisation von Molekülen mit einem Flugzeitanalysator kombiniert. Bei der Ionisation kommt es zur Kokristallisation von Matrix und dem Analyt, wobei das Analyt in die Matrix eingebaut werden muss. Als Matrix dienen organische Moleküle, die die Energie stark absorbieren, indem sie mit Laserpulsen angeregt werden und nach kurzer Relaxationszeit lösen sich die Teilchen an der Oberfläche explosionsartig ab. Sie gelangen in ein Vakuum und sind bereit für die massenspektrometrische Analyse. Diese Analyse erfolgt per Flugzeitanalysator, wobei die Masse-zu-Ladung durch Messung der Flugzeit ermittelt wird und folgenden Zusammenhang hat:

$$T \propto \sqrt{\frac{m}{q}}$$

dabei entspricht  $q$  der Ladung der Ionen und  $m$  der Masse. Am Ende der Strecke befindet sich ein Detektor, der die Ionen in ein elektrisches Signal umwandelt und dies wird in einem Spektrum dargestellt. In diesem Spektrum wird die Signalintensität gegen  $m/q$  aufgetragen und die Peptidmasse ergibt im Abgleich mit einer theoretischen Enzymbehandlung das Protein (Karas und Krüger 2003).

**3.6.8.1 In-Gel-Verdau**

Der In-Gel-Verdau diente der Probenvorbereitung für die Massenspektrometrie. Dieser umfasste die Entfärbung, Reduktion, Alkylierung der Cysteine, sowie Spaltung der Proteine und die Gelextraktion. Die Proteinbanden des PAA-Gels wurden zunächst durch eine Coomassie-Färbung sichtbar gemacht (siehe 3.6.7 *Coomassie-Färbung*). Anschließend wurden 3 kleine *Spots* pro Bande mittels einer Kanüle ausgestochen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Das Reaktionsgefäß wurde zuvor einmal mit 200

$\mu\text{L}$  0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure (TFA)/60 % (v/v) Acetonitril gewaschen. Die Lösung wurde abgenommen und das Reaktionsgefäß wurde mit 200  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O befüllt. Die ausgestochenen Spots wurden in das Gefäß gegeben und für 5 min auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Das Wasser wurde entfernt, bevor 200  $\mu\text{L}$  0,1 % TFA/60 % Acetonitril hinzugegeben wurden und eine Inkubation für 5 min auf dem Schüttler und bei Raumtemperatur erfolgte. Die Lösung wurde entfernt und 200  $\mu\text{L}$  100 % Acetonitril zugegeben und für 5 min auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Auch die Lösung wurde abgenommen und die Probe wurde für 30 min bei 40 °C im *Thermocycler* getrocknet. Für der Reduktion der Disulfidbrücken wurden 20  $\mu\text{L}$  10 mM DTT/ 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat zugegeben und 20 min bei 40 °C im Dunkeln inkubiert. Die DTT-Lösung wurde nach Inkubationszeit entfernt und 20  $\mu\text{L}$  55 mM Jodacetamid/ 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat wurde zu den Proben gegeben. Die Lösung wurde nach einer Inkubationszeit von 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln wieder abgenommen. Daraufhin folgten mehrere Waschschrte, zunächst wurde mit 200  $\mu\text{L}$  Wasser gewaschen und für 3 min auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Der nächste Waschschrte erfolgte mit 200  $\mu\text{L}$  0,1 % TFA/ 60 % Acetonitril und einer Inkubation von 5 min schüttelnd bei Raumtemperatur. Beim dritten Waschschrte wurden 200  $\mu\text{L}$  0,1 % TFA/ 100 % Acetonitril zugegeben und 5 min auf dem Schüttler inkubiert. Der 4. Waschschrte erfolgte durch die Zugabe von 100 % Acetonitril und einer Inkubation von 10 min auf dem Schüttler bei Raumtemperatur. Nach jedem Waschschrte wurde die Lösung wieder entfernt. Die Proben wurden nach dem Waschen für 60 min bei 40 °C getrocknet. Die Spaltung der Proteine erfolgte durch Zugabe von 6  $\mu\text{L}$  10 mM Ammoniumhydrogencarbonat/2  $\mu\text{L}$  Trypsin und einer Inkubation von 30 min bei 4 °C. Die Lösung wurde entfernt und die Proben wurden zum Trocknen über Nacht bei 40 °C im *Thermocycler* inkubiert. Am folgenden Tag wurde 6  $\mu\text{L}$  0,1 % TFA/60 % Acetonitril zugegeben und für 15 – 30 min schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert. Die fertigen Proben wurden für einige Stunden bei -20 °C eingefroren und anschließend wurden 2  $\mu\text{L}$  Probe auf die Matrix zusammen mit Rekristalisationspuffer aufgetragen. Als Matrix diente die  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizsäure.

### 3.6.8.2 MALDI-TOF Massenspektrometer

Die Messungen wurden an einem Autoflex I MALDI-TOF Gerät (Bruker Daltonics) durchgeführt. Die Bediensoftware war hierbei *FlexControl 2.2* (Bruker Daltonics). Das Gerät wurde zunächst mittels eines Peptid-Standards kalibriert und anschließend wurden die Proben mehrmals mit einem Laser beschossen. Die Spektren wurden dabei addiert und mit der *FlexAnalysis*-Software analysiert. Die erhaltenen Peptidmassen wurden auf Übereinstimmungen mit theoretischen Peptidmassen aus der Internetdatenbank untersucht. Als Internetdatenbank wurden MASCOT *peptide mass fingerprint* (Matrix Science) oder Aldente (ExpASY Proteomics Server) genutzt.

Für die Analyse der Proben der Affinitätschromatographie wurden diese durch Dr. Stefan Baumeister (AG Lingelbach, Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg) präpariert und per MALDI-TOF analysiert.

### 3.7 spezielle proteinbiochemische Methoden

#### 3.7.1 Herstellung von rekombinalem Galectin-3

Für die Untersuchung der Interaktionspartner von Galectin-3 wurde für die Affinitätschromatographie (siehe 3.7.2 *Herstellung einer Affinitätssäule mit rekombinatem Galectin-3* und 3.7.3 *Laktose-abhängige Aufreinigung von Interaktionspartnern über eine Gal3-Affinitätssäule*) rekombinantes Galectin-3 hergestellt. Für diese Herstellung wurden BL-21 (DE3)-Bakterien (New England Biolabs, Ipswich(USA)) verwendet. Dieser E.Coli-Stamm besitzt ein Gen für die T7 DNA-Polymerase, welche unter Kontrolle des *lac*-Promoters steht. Nach Induktion mit Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG) kommt es zur Expression des gewünschten Proteins. Das Protein kann nach Bakterienaufschluss aufgereinigt werden. Für die Herstellung des rekombinanten Galectin-3 wurden bereits mit pET3c-Gal3 transformierte BL-21(DE3)-Bakterien (zur Verfügung gestellt von Hakon Leffler, Lund (Schweden)) auf eine LB-Agar-Platte + Ampicillin ausgestrichen. Von den gewachsenen Kolonien wurde eine Kolonie gepickt und in 200 mL LB-Medium + Ampicillin überführt. Zum Wachsen wurde die Lösung über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Am folgenden Tag wurden 100  $\mu$ L 1 M IPTG zugegeben und für 3 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Bakterienlösung bei 4000 rpm für 10 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 mL ME-PBS +  $\frac{1}{2}$  Tablette Proteinase-Inhibitor (Roche) resuspendiert und die Bakterien wurden mit Hilfe der French-Press (Avestin) aufgebrochen. Bei diesem Homogenisator wurde die Bakterienlösung unter Druck (7500 psi) durch ein enges Ventil gepresst, was zum Aufbruch der Bakterien führte. Anschließend wurde die Lösung bei 8000 rpm für 15 min abzentrifugiert und das Lysat wurde daraufhin mittels eines Filtropur S 0.45 (Sarstedt) filtriert. Für die Extraktion des Galectin-3 aus dem Lysat wurden *Lactosylsepharosebeads* (E.Y.Laboratories) verwendet. Diese *Beads* wurden zuvor 3-mal mit ME-PBS gewaschen und 5 min bei 1000 rpm abzentrifugiert. Das Lysat wurde über Nacht schüttelnd und bei 4 °C mit den *Lactosylsepharosebeads* inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Lösung bei 1000 rpm für 5 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde zweimal mit ME-PBS gewaschen und mit 150 mM Laktose in ME-PBS eluiert. Hierzu wurde das Pellet mit dem Puffer für 1 – 2 h bei 4 °C schüttelnd inkubiert. Die Lösung wurde bei 1000 rpm für 5 min bei 4 °C abzentrifugiert und der Überstand wurde auf 2,5 mL ankonzentriert. Dies geschah durch die Zentrifugation bei 4500 rpm in Centrikon 10 k (Merck Millipore). Die eingeeengte Proteinlösung wurde danach mittels PD-10-Säule (GE Healthcare) in Kopplungspuffer umgepuffert. Am Ende wurde

noch die Proteinkonzentration bestimmt, indem die Absorption bei 280 nm gemessen und durch Einsatz in die Formel errechnet wurde:

$$\frac{A_{280} * \text{Verdünnung} * MW [Da]}{\varepsilon} = \beta \frac{mg}{mL}$$

Absorptionskoeffizient  $\varepsilon = 35870$  ([www.expasy.org](http://www.expasy.org))

#### LB-Medium:

10 g	NaCl
10 g	Trypton
5 g	Hefe Extrakt

#### ME-PBS:

2 mM	EDTA
4 mM	$\beta$ -Mercaptoethanol

In PBS.

#### Kopplungspuffer:

0,2 M	NaHCO <sub>3</sub>
0,5 M	NaCl
pH 8,3	

### 3.7.2 Herstellung einer Affinitätssäule mit rekombinantem Galectin-3

Für die Analyse der Interaktionspartner von Galectin-3 wurde das rekombinante Galectin-3 (siehe 3.7.1 *Herstellung von rekombinantem Galectin-3*) an eine HiTrap NHS-activated HP Säule (GE Healthcare) gekoppelt. Diese Sepharose-Säule besteht aus N-hydroxysuccinimid (NHS) und durch die Zugabe eines Aktivierungspuffers kann daraus NHS-Ester hergestellt werden. Der NHS-Ester kann primäre Amine binden und ist somit in der Lage Proteine zu koppeln. Zur Vorbereitung der Säule wurde diese mit 6 mL 1 mM HCl gewaschen mittels einer Peristaltik-Pumpe Minipuls 3 (Gilson) und einer Flussrate von 1mL/min. Im Anschluss wurde die Säule mit 6 mL PBS gewaschen. Das rekombinante Galectin-3 in Kopplungspuffer mit einer Konzentration 5 mg/mL und einem Volumen von 2 mL zirkulierte für 30 min über der Säule und inkubierte anschließend für 30 min, indem die Säule verschlossen wurde. Nach Ablassen der Proteinlösung wurde die Säule abwechselnd mit jeweils 6 mL Puffer A – Puffer B – Puffer A gewaschen und für 30 min inkubiert. Darauf folgte ein wiederholtes Waschen der Säule mit jeweils 6 mL Puffer B – Puffer A – Puffer B und zum Lagern wurde der Säule Lagerpuffer zugegeben und bei 4 °C gelagert.

**Puffer A:**

0,5 M Ethanolamin

0,5 M NaCl

pH 8,3

**Puffer B:**

0,1 M Natriumacetat

0,5 M NaCl

pH 4

**Lagerpuffer:**0,05 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0,1 %  $\text{NaN}_3$ 

pH 7

**3.7.3 Laktose-abhängige Aufreinigung von Interaktionspartnern über eine Galectin-3-Affinitätssäule**

Die Galectin-3-Affinitätssäule (siehe 3.7.2 *Herstellung einer Affinitätssäule mit rekombinantem Galectin-3*) wurde zunächst mit 30 mL PBS gewaschen, dabei wurde die Säule an eine Peristaltik-Pumpe Minipuls 3 (Gilson) angeschlossen und es wurde eine Flussrate von 1 mL/min eingestellt. Von den Zellkern-Extrakten (siehe 3.5.1 *Zellkern-Extraktion*) der HeLa- und RCCFG1-Zellen wurden 8 – 10 mg in 2 mL Probe auf die Säule gegeben und für 30 min bei 4 °C zirkuliert. Anschließend wurde die Probe für 30 min auf der Säule inkubiert. Die Säule wurde danach an ein Äkta Purifier System 10 (GE Healthcare) angeschlossen und mit 30 mL PBS gewaschen. Die Elution der Interaktionspartner erfolgte durch Zugabe von 150 mM Laktose in PBS (10 mL) und dabei wurden 20 Fraktionen à 500 µL aufgefangen. Von den aufgefangenen Fraktionen wurden diejenigen zur MALDI-TOF-Analyse bei Stefan Baumeister (AG Lingelbach, Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg) gebracht, die einen Ausschlag bei 210 nm zeigten. Das Äkta Purifier System 10 beinhaltet einen Monitor UV-900 und kann unter anderem die Wellenlänge von 210 nm detektieren. Die Daten wurden mittels der UNICORN Kontroll-Software (GE Healthcare) ausgewertet.

### 3.7.4 Glycerol Gradient

Bei der Dichtegradientenzentrifugation wurden Partikel während einer Ultrazentrifugation aufgrund ihrer Dichte sortiert. Hierzu wurde ein Glycerol Gradient 12% - 22% - 32% angefertigt (Abb. 3-2). Die einzelnen Glycerol-Phasen wurden in 60 % Puffer D gelöst und übereinandergeschichtet, wobei der Prozentgrad von oben nach unten zunahm. Vom HeLa-Zellkern-Extrakt (siehe 3.5.1 *Zellkern-Extraktion*) wurden 150  $\mu\text{L}$  mit 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,5 mM ATP und 20 mM Kreatinphosphat bei 30 °C für 30 min inkubiert und auf den Glycerol Gradienten oben aufgeschichtet. Anschließend folgte die Zentrifugation bei

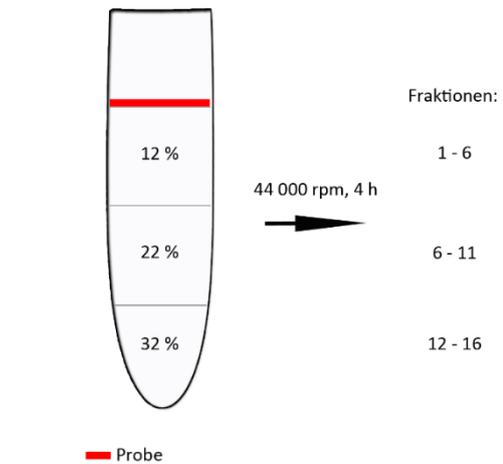


Abb. 3-2 Glycerol Gradient

44000 rpm für 4 h bei 4 °C. Nach Zentrifugation folgte die Probenabnahme von oben nach unten, wobei jeweils 250  $\mu\text{L}$  abgenommen wurden (Abb. 3-2). Die Auswertung erfolgte per SDS-PAGE (siehe 3.6.4 *SDS-PAGE*) und Western Blot (siehe 3.6.6 *Western Blot-Verfahren*).

#### Puffer D:

20 mM	Hepes
100 mM	KCl
0,2 mM	EDTA
0,5 mM	DTT

### 3.8 Fluoreszenzmikroskopische Methoden

#### 3.8.1 Vorbereiten der Zellen mit Immunfluoreszenz-Markierung

Bei der Immunfluoreszenz-Markierung werden Proteine mit Hilfe von Primärantikörpern, die spezifisch an ihr Antigen binden können, markiert. Durch die Zugabe von mit Fluorophoren gekoppelten Sekundärantikörpern, welche der Spezies der Primärantikörper entsprechen und diese somit binden, können die Proteine in den Zellen mittels der Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden. Dabei erhält man einen guten Überblick über die Lokalisation des Proteins und durch die Markierung weiterer Proteine auch über seine Interaktionspartner.

Die Zellen wurden 2 – 3 Tage vor der Behandlung auf Deckgläser ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Zellen wurden zunächst 3-mal mit PBS++ gewaschen und mit Para-Formaldehyd (4 % (w/v) in PBS) für 20 min bei Raumtemperatur oder mit 100 % Methanol (eiskalt) fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen 3-mal mit PBS++ gewaschen und anschließend mit Triton X-100 (0,1 % (v/v) in PBS++) für 4 min bei RT permeabilisiert, die Permeabilisierung mit Triton X-100 war jedoch nur bei der Fixierung mit PFA notwendig. Es folgte 3-maliges Waschen mit PBS++ und zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde BSA (1 % (w/v) in PBS++) zugegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Primärantikörper (in 1 % BSA (w/v) in PBS++) zugegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen 6-mal mit PBS++ gewaschen und der Sekundärantikörper (1:300 in PBS++) wurde hinzugefügt. Nach der Inkubation für 1 h bei RT wurden die Zellen 6-mal mit PBS++ gewaschen. Die Zellkern-Markierung erfolgte durch Zugabe von Hoechst 33258 (0,5 µg/mL (w/v) in PBS++) und einer Inkubationszeit von 15 min bei RT. Am Ende wurden die Deckgläser mit Hilfe des Eindeckelmediums Mowiol auf die Objektträger übertragen. Nachdem das Mowiol getrocknet war (über Nacht bei 4 °C) konnten die Präparate mikroskopiert werden.

Es wurden Einfach- und Mehrfachfärbungen durchgeführt und dabei wurde immer darauf geachtet, dass die Primärantikörper aus unterschiedlichen Spezies stammten.

Tab. 3-11 Verwendete Antikörper Immunfluoreszenz

Antigen	Klon	Spezies	pk/mk	Hersteller	Verdünnung (in PBS)
<b>Primärantikörper</b>					
Galectin-3	H-160	Kaninchen	pk	Santa Cruz Biotechnology	1:300
Galectin-3	M3/38	Ratte	mk	Santa Cruz Biotechnology	1:300
hnRNPA2B1	DP3B3	Maus	mk	Abcam	1:500
Sc35		Maus	mk	Abcam	1:500
U2AF65	MC3	Maus	mk	Sigma Aldrich	1:500

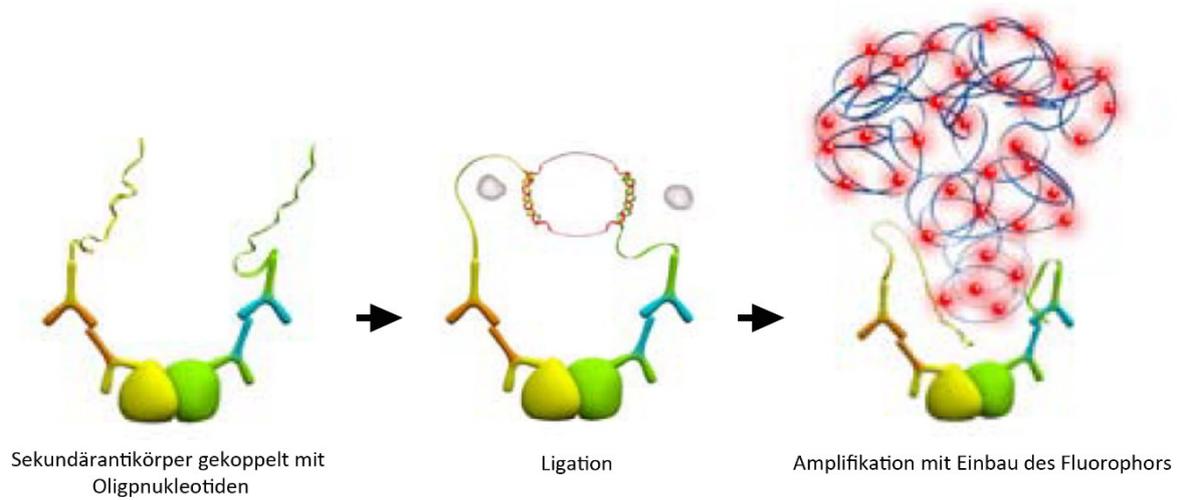
Sekundärantikörper					
Maus-IgG Alexa546		Ziege	pk	Invitrogen	1:300
Maus-IgG Alexa647		Ziege	pk	Invitrogen	1:300
Kaninchen-IgG Alexa546		Ziege	pk	Invitrogen	1:300
Kaninchen-IgG Alexa647		Ziege	pk	Invitrogen	1:300
Ratte-IgG Alexa546		Huhn	pk	Invitrogen	1:300
Ratte-IgG Alexa647		Huhn	pk	Invitrogen	1:300

### 3.8.2 Proximity Ligation Assay

Der *Proximity Ligation Assay (In situ PLA)* ist eine biochemische Methode, diese dient der Detektion von Protein-Protein-Interaktionen. Dabei werden die Proteine per Primärantikörper detektiert und spezifische Sekundärantikörper gekoppelt mit Oligonucleotiden binden die Primärantikörper. Befinden sich die Oligonucleotide der Sekundärantikörper nah genug aneinander kommt es durch Zugabe von Polymerase zu einer Polymerasekettenreaktion und es bildet sich ein *rolling circle*. Durch Zugabe einer fluoreszenzmarkierten Hybridisierungssonde kann die Interaktion sichtbar gemacht werden (Abb. 3-3) und unter dem Mikroskop betrachtet werden.

Für den *In situ PLA* wurden Zellen auf Deckgläser ausgesät und nach 2 – 3 Tagen Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden die Zellen zunächst 3-mal mit PBS++ gewaschen. Die Zellen wurden mit Para-Formaldehyd (4 % (w/v) in PBS) für 20 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen 3-mal mit PBS++ gewaschen und anschließend mit Triton X-100 (0,1 % (v/v) in PBS++) für 4 min bei RT permeabilisiert. Die Zellen wurden 3-mal mit PBS++ gewaschen. Für den *In situ PLA* wurde das Duolink® *In situ* Kit von Olink Bioscience verwendet. Zur Absättigung unspezifischer Bindungen wurde die Duolink® *Blocking Solution* zu den Zellen gegeben und 1 h bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen 3-mal mit PBS++ gewaschen. Die Primärantikörper wurden in 1x Duolink® *Antibody Diluent* verdünnt und über Nacht bei 4 °C bei den Zellen inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen zweimal à 5 min mit PBS++ gewaschen. Der 5x Duolink® *In Situ PLA*® Probe Anti-Mouse/Anti-Rabbit/Anti-Goat-Sekundärantikörper wurde zunächst in 1x Duolink® *Antibody Diluent* verdünnt und danach für 1 h bei 37 °C zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden zweimal à 5 min mit Duolink® *In Situ Wash Buffer A* gewaschen. Anschließend folgte die Ligation durch Zugabe von Ligase (1:40 in 5x Ligationspuffer (verdünnt in ddH<sub>2</sub>O), Duolink®) und einer Inkubation von 30 min bei 37 °C (Abb. 3-3, mittleres Bild). Die Zellen wurden zweimal à 2 min mit Duolink® *In Situ Wash Buffer A* gewaschen. Der 5x Amplifikationspuffer mit dem Fluorophor Orange (Duolink®) wurde in ddH<sub>2</sub>O verdünnt und mit der Polymerase (1:80, Duolink®) verdünnt. Die Lösung wurde zu den Zellen gegeben und für 100 min bei 37 °C inkubiert

(Abb. 3-3, rechtes Bild). Nach der Polymerasekettenreaktion wurden die Zellen zweimal à 10 min mit Duolink® *In Situ Wash Buffer B* gewaschen und einmal 1 min mit 0,01 x Duolink® *In Situ Wash Buffer B* gewaschen. Nachdem die Zellen getrocknet wurden, wurde das Duolink® *In Situ Mounting Medium* mit DAPI zugegeben und für 15 min bei RT inkubiert. Zur Betrachtung am Mikroskop wurden die Deckgläser auf Objektträger übertragen, mit Nagellack umrandet und über Nacht im Kühlschrank gelagert. Oder die Proben wurden direkt am Mikroskop betrachtet, indem die Deckgläser auf eine Glasboden-Kulturplatte Willco-dish®GWSt-5040 (WillCo Wells) gelegt wurden. Das Fluorophor *Orange* wurde bei 554 nm angeregt und zeigte seine Emission bei 576 nm.



**Abb. 3-3 Proximity Ligation Assay.** (Quelle: [www.olink.com](http://www.olink.com))

Primärantikörper gegen zu untersuchende Proteine werden von Sekundärantikörpern gebunden. Die Sekundärantikörper sind gekoppelt mit Oligonukleotiden und durch Zugabe einer Ligase bildet sich ein *rolling circle*. Dieser *rolling circle* wird nach Zugabe einer Polymerase amplifiziert und das Fluorophor interagiert mit den Oligonukleotiden.

**Tab. 3-12 Verwendete Antikörper PLA**

Antigen	Klon	Spezies	pk/mk	Hersteller	Verdünnung (in PBS)
<b>Primärantikörper</b>					
Galectin-3	A3A12	Maus	mk	Santa Cruz Biotechnology	1:300
Galectin-3	H-160	Kaninchen	pk	Santa Cruz Biotechnology	1:300
hnRNPA2B1	DP3B3	Maus	mk	Abcam	1:500
hnRNPA2B1		Kaninchen	pk	Abcam	1:500
SAP155		Ziege	Pk	Santa Cruz Biotechnology	1:300
Sc35		Maus	mk	Abcam	1:500
U1 snRNP 70	H-280	Kaninchen	pk	Santa Cruz Biotechnology	1:300
U2AF35	GTX106854	Kaninchen	pk	GeneTex	1:500
U2AF65	MC3	Maus	mk	Sigma Aldrich	1:500

Sekundärantikörper
Duolink® <i>In Situ</i> PLA® Probe Anti-Maus MINUS
Duolink® <i>In Situ</i> PLA® Probe Anti-Kaninchen PLUS
Duolink® <i>In Situ</i> PLA® Probe Anti-Ziege PLUS

### 3.8.3 Fluoreszenz-*In-situ*-Hybridisierung (FISH)

Die Fluoreszenz-*In-situ*-Hybridisierung (FISH) dient unter anderem der Markierung von mRNA. Hierzu wird eine Sonde bestehend aus Nukleinsäuren über Basenpaarung an die mRNA geheftet. Diese Sonde besitzt zusätzlich Biotin, welches mit Streptavidin verbunden werden kann. Das Streptavidin ist an ein Fluorophor gekoppelt und kann somit im Mikroskop detektiert werden.

Das verwendete Protokoll stammt von Chakraborty (Chakraborty *et al.* 2006). Hierzu wurden die auf Deckgläser ausgesäten Zellen zunächst 3-mal mit PBS++ gewaschen und mit PFA (4 % (w/v) in PBS) für 8 min bei RT fixiert. Danach wurden die Zellen 3-mal mit PBS à 15 min bei RT gewaschen. Permeabilisiert wurde mit Triton X-100 (0,5 % (v/v) in PBS) bei 4 °C. Im Anschluss wurde zweimal à 15 min mit PBS gewaschen. Nun folgte die Zugabe des Pre-Hybridisierungsmix zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen, dieser Mix inkubierte 15 min bei 42 °C. Der Pre-Hybridisierungsmix wurde durch den Hybridisierungsmix ersetzt und inkubierte über Nacht bei 42 °C. Die Waschpuffer 2x SCC- und 0,5x SCC-Puffer wurden am folgenden Tag zunächst auf 42 °C erwärmt und danach wurden die Zellen erst zweimal à 15 min mit 2x SCC-Puffer gewaschen und dann einmal 15 min mit 0,5x SCC-Puffer. Alle drei Waschschriffe erfolgten bei 42 °C. Die Zellen wurden ein zweites Mal mit PFA (4 % (w/v) in PBS) für 8 min bei RT fixiert und 3-mal mit PBS à 15 min bei RT gewaschen. Nun folgte die Zugabe des Streptavidin-Alexa546 (1:70 in 0,2 % (v/v) Triton X-100/PBS) für 30 min bei RT. Die Zellen wurden 3-mal à 15 min mit Triton X-100 (0,2 % (v/v) in PBS) und zweimal à 15 min bei RT mit PBS gewaschen. Zum Schluss wurde der Zellkern durch Zugabe von Hoechst 33258 (0,5 µg/mL (w/v) in PBS++) und einer Inkubationszeit von 15 min bei RT markiert. Die Deckgläser wurden mit Hilfe des Eindeckelmediums Mowiol auf die Objektträger übertragen und nachdem das Mowiol getrocknet war (über Nacht bei 4 °C) konnten die Präparate mikroskopiert werden.

#### 20x SCC-Puffer:

3 M                NaCl  
 300 mM        Natrium-Citrat  
 pH 7

**Pre-Hybridisierungsmix:**

2x	SCC-Puffer
1 mg/mL	tRNA
10 % (w/v)	Dextran-Sulfat
25 % (v/v)	Formamid

**Hybridisierungsmix:**

2x	SCC-Puffer
1 mg/mL	tRNA
10 % (w/v)	Dextran-Sulfat
25 % (v/v)	Formamid
50 µg/mL	Biotin-Oligo dT

**3.8.4 konfokale Laser-Scanning Mikroskopie**

Die konfokale Laser-Scanning Mikroskopie (KLSM) ist eine Art der Lichtmikroskopie, bei der Anregungs- und Detektionsfokus gleich sind, also konfokal. Dies wird erreicht durch eine Lochblende zwischen dem anregenden Laser und dem Objekt, was zu einer punktförmigen Illumination des Objekts führt. Außerdem wird durch eine zweite Lochblende zwischen dem Objekt und dem Detektor das Fluoreszenzlicht ausgeblendet, welches nicht aus der Fokusebene stammt. Das Wort *scanning* stammt von der Tatsache, dass das Objekt nur in einzelnen Bildpunkten angeregt wird und somit abgerastert, also gescannt, wird.

Die Aufnahmen entstanden am Leica DM IRE2/SP2 mit einem HCX PL APO CS 40 x/1,25 – 0,75 Oil Objektiv. Folgende Laser wurden für die Anregungswellenlängen verwendet: für 543 nm und 633 nm ein HeNe-Laser. Es wurde im sequentiellen Modus gearbeitet, dabei wurden die Fluorophore einzeln und nacheinander angeregt und die Emission wurde separat detektiert. Dieser Modus verhinderte das ein Fluorophor mit den Einstellungen eines anderen Fluorophors detektiert wurde, also kein *cross talk* stattfand. Bei der Bildaufnahme wurde die Einstellung so gewählt, dass jede Bildzeile achtfach gescannt und daraus der Mittelwert gebildet wurde, dadurch wurde der Hintergrund gemindert.

Tab. 3-13 Einstellungen KLSM

Fluorophor	Anregung [nm]	Emission [nm]
Alexa546	543	560 – 660
Alexa647	633	640 - 700
Orange	554	576

### 3.8.5 Quantifizierung PLA

Für die Quantifizierung des PLA wurde die Software ImageJ verwendet. Es wurden Bilder mit der Größe 512 x 512 und einem 2fach Zoom genutzt. Die Kanäle wurden separat bearbeitet und es wurden jeweils binäre Bilder erstellt. Dabei wurde für die Zellkerne ein Filter über das Bild gesetzt, sodass die Kerne als volle Strukturen dargestellt wurden. Und mit Hilfe des *speckle inspectors* wurden die Signale im Zellkern angezeigt. Die Signale wurden pro Zellkern angegeben und in eine Tabelle eingetragen.

### 3.8.6 Quantifizierung FISH

Es wurden Bilder der Größe 512 x 512 und einem 4fach Zoom verwendet. Diese Bilder wurden mit Hilfe der Leica LAS AF (Leica Microsystems) Software bearbeitet. Dabei wurden Zellkern und Zytoplasma als einzelne Areale (ROI) umrandet und die Grauwerte der einzelnen Areale wurden in eine Tabelle übertragen.

## 3.9 Statistik

Zur Gewährleistung der statistischen Relevanz wurden pro Experiment mindestens 3 Versuche analysiert. Die statistische Auswertung und die Darstellung der Graphen erfolgten mit Hilfe der Software GraphPad Prism5. Dabei wurden die Ergebnisse als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Der t-Test wurde verwendet beim Vergleich von 2 Werten zur Abklärung der statistischen Relevanz.

## 4 Ergebnisse

Der Ergebnisteil der vorliegenden Arbeit gliedert sich in fünf Abschnitte. Der erste Abschnitt (4.1) beschäftigt sich mit der Interaktion zwischen Galectin-3 und dem heterogenen nukleären Ribonukleoprotein A2B1. Im zweiten Abschnitt (4.2) werden die Interaktionen von Galectin-3 und weiteren Spleißosom-Komponenten vorgestellt. Die Ergebnisse zur Funktion von Galectin-3 im Zellkern werden im Abschnitt drei (4.3) beschrieben. Der Abschnitt vier (4.4) befasst sich mit den Ergebnissen der RNA-Sequenzierung, wobei die Auswirkung einer Verminderung der Galectin-3-Expressionsrate auf die mRNA von HeLa-Zellen untersucht wurde. Abschließend wird im fünften Abschnitt (4.5) auf die Interaktionen verschiedener Spleißosom-Komponenten untereinander eingegangen.

### 4.1 Galectin-3 interagiert mit der Spleißkomponente hnRNPA2B1

Aufgrund früherer Arbeiten ist bekannt, dass Galectin-3 vermehrt im Zellkern verschiedener Zelltypen zu finden ist, diese intranukleäre Verteilung ist abhängig vom Zelltyp und vom Proliferationsstadium (Gaudin *et al.* 2000, Moutsatsos *et al.* 1987, Openo *et al.* 2000). Es konnte ebenfalls beobachtet werden, dass die subzelluläre Verteilung von Galectin-3 in einzelnen Tumorarten unterschiedlich ist. So ist die Expressionsrate in humanen Darm- sowie Prostata-Tumorzellen herabgesetzt und Galectin-3 ist nicht mehr im Zellkern zu finden (Lotz *et al.* 1993). Im Gegensatz dazu ist Galectin-3 in den Tumorzellen des ösophagealen Plattenepithels vermehrt im Zellkern lokalisiert (Shibata *et al.* 2005). Auch die Arbeitsgruppe Jacob beschäftigte sich mit der Verteilungsfrage von Galectin-3 und konnte feststellen, dass Galectin-3 in klarzelligen Nierentumorzellen vermehrt im Zellkern zu detektieren ist (Straube *et al.* 2011). Diese vorangegangene Studie bildete die Grundlage zur Suche nach neuen Interaktionspartnern von Galectin-3 im Zellkern, um der tumorabhängigen Wirkungsweise von nukleärem Galectin-3 näher zu kommen.

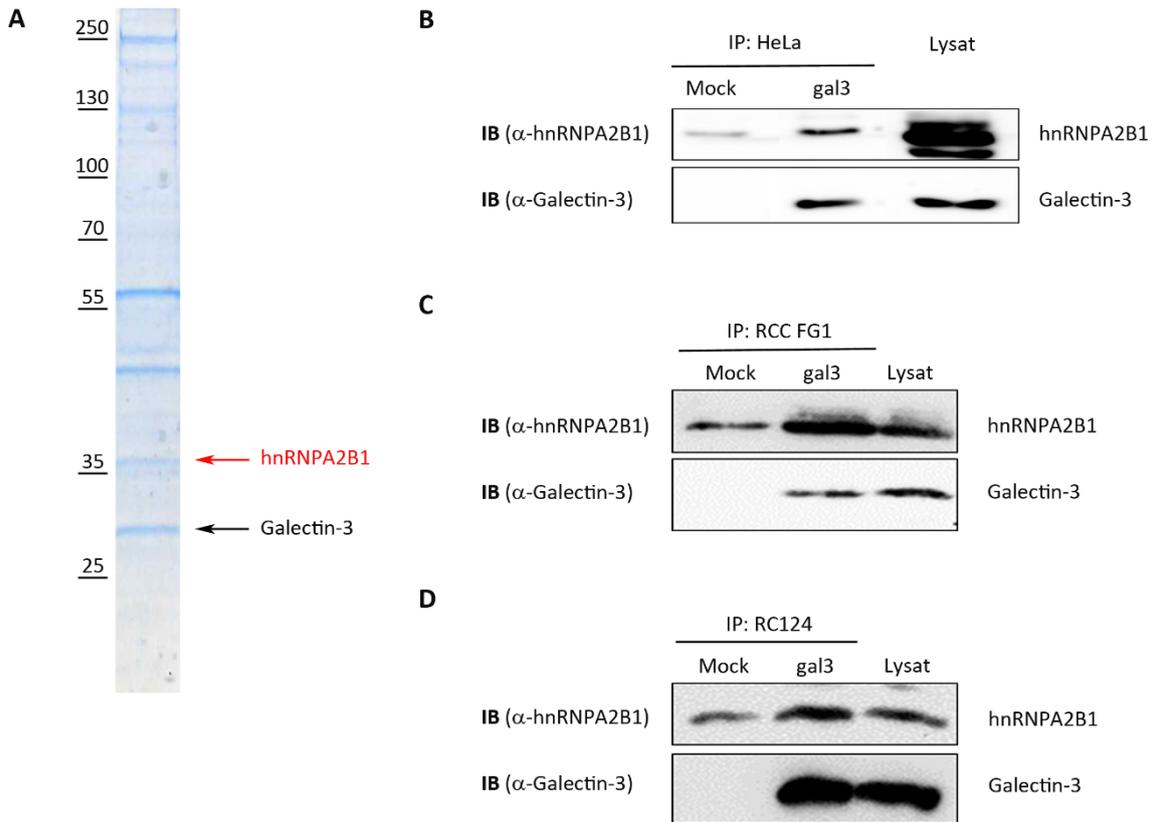
#### 4.1.1 hnRNPA2B1 immunpräzipitiert gemeinsam mit Galectin-3

Zur Identifizierung neuer Interaktionspartner von Galectin-3 im Zellkern wurde der nukleäre Extrakt aus RCC-FG1 Zellen verwendet, da vorangegangene Studien der AG Jacob eine Akkumulation von Galectin-3 im Zellkern dieser Zellen zeigten (Straube *et al.* 2011). Zunächst wurden die Zellen mit RNase behandelt und anschließend mit  $\alpha$ -Galectin-3 Antikörper immunpräzipitiert. Durch die Behandlung mit RNase sollten indirekte Interaktionspartner deren Bindung über RNA vermittelt wird, ausgeschaltet werden. Die gemeinsam präzipitierten Proteine wurden zunächst auf einem SDS-Polyacrylamidgel separiert, gefolgt von einer colloidalen Coomassie Färbung (Abb. 4-1 A). Einzelne ausgewählte Banden

wurden mittels Massenspektrometrie analysiert. Als sehr interessanter und neuer Interaktionspartner, mit einem MASCOT Wert von 106 und einer Sequenzübereinstimmung von 51,8 %, wurde ein sehr wichtiges nukleäres Protein identifiziert, das heterogene nukleäre Ribonucleoprotein hnRNPA2B1 (Abb. 4-1 A). Das hnRNPA2B1 gehört zu einer großen Familie von Proteinen, die noch während der Transkription mit der freiwerdenden pre-mRNA assoziieren und diese in hnRNP Partikel verpacken (Dreyfuss *et al.* 1993; Pinol-Roma *et al.* 1988; Pullman und Martin 1983). Die hnRNP Proteine bestehen unter anderem aus mindestens einem RNA-Bindemotif und manche besitzen noch zusätzlich Domänen welche Protein-Protein-Interaktionen vermitteln können (Dreyfuss *et al.* 1993). Das hnRNPA2B1 bezeichnet eigentlich zwei Isoformen, A2 und B1, welche durch alternatives Spleißen entstehen und sich nur durch einen Einschub von 12 Aminosäuren bei B1 unterscheiden (Burd *et al.* 1989). Zusammen mit dem hnRNPA1 macht es 60 % der hnRNP Partikel aus und zählt somit zu den am häufigsten im Zellkern vorkommenden Proteinen (Beyer *et al.* 1977).

Zur Absicherung der Identifizierung von hnRNPA2B1 als Interaktionspartner von Galectin-3 mittels MS wurde nukleärer Extrakt aus HeLa-Zellen ebenfalls mit  $\alpha$ -Galectin-3 Antikörpern immunpräzipitiert. Die co-präzipitierten Proteine wurden zunächst auf einem SDS-Polyacrylamidgel separiert und anschließend auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Zur Detektion der gesuchten Proteine wurde der Immunoblot mit Antikörpern gegen Galectin-3 und hnRNPA2B1 inkubiert. Die Negativkontrolle (Mock) diente der Analyse der unspezifischen Bindung an die *Beads*, da hier mit keinem Antikörper immunpräzipitiert wurde. Es zeigt sich, dass hnRNPA2B1 zwar unspezifisch an die Dynabeads® IgG bindet, jedoch wird im Vergleich zur 2. Spur, also der Immunpräzipitation mit  $\alpha$ -Galectin-3, deutlich, dass die Bande für das hnRNPA2B1 viel stärker ist (Abb. 4-1 B). Die Bande für Galectin-3 in der 2. Spur zeigt, dass die Immunpräzipitation des Lektins sehr gut funktioniert hat. Da das hnRNPA2B1 eine deutliche Bande in der immunpräzipitierten Spur zeigt, kann man davon ausgehen, dass hnRNPA2B1 mit Galectin-3 interagiert und gemeinsam präzipitiert wird. Abb. 4-1 C und D zeigen, dass diese Interaktion unabhängig vom Zelltyp ist, da diese auch in den Nierenzelllinien RCC-FG1 und RC124 deutlich nachweisbar ist. Für die Immunpräzipitation wurde auch hier nukleärer Extrakt der entsprechenden Zelllinie verwendet und mit einem  $\alpha$ -Galectin-3 Antikörper präzipitiert. Im Vergleich zur Immunpräzipitation mit dem nukleären Extrakt aus HeLa-Zellen, wobei Dynabeads® IgG verwendet wurden, wurden bei den RCC-FG1 und RC124-Zellen Agarose-*Beads* gekoppelt mit Protein L verwendet. Auch hier ist eine unspezifische Bindung von hnRNPA2B1 an die *Beads* zu erkennen (Abb. 4-1 C, D Mock), jedoch ist in der Spur der Immunpräzipitation mit  $\alpha$ -Galectin-3 Antikörper eine stärkere Bande für das hnRNPA2B1 zu sehen (Abb. 4-1 C, D).

Diese biochemischen Untersuchungen weisen darauf hin, dass hnRNPA2B1 ein neuer Interaktionspartner von Galectin-3 im Zellkern ist. Diese Interaktion ist RNA- und Zelltyp-unabhängig.



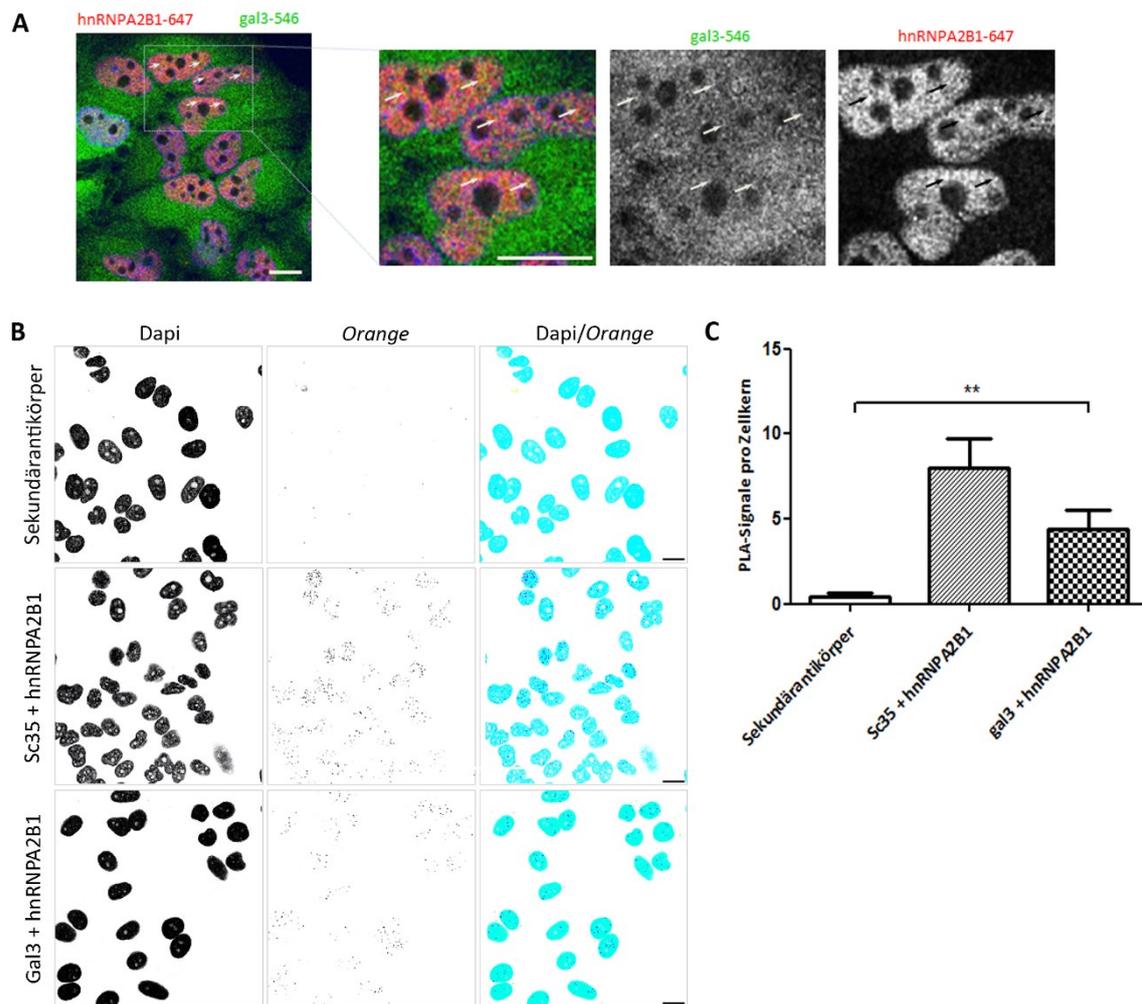
**Abb. 4-1 hnRNPA2B1 präzipitiert gemeinsam mit Galectin-3 im Zellkern.**

**(A)** Colloidale Coomassie-Färbung der co-präzipitierten Proteine nach einer Immunpräzipitation mit einem Antikörper gegen Galectin-3. Die mit Pfeilen gekennzeichneten Banden wurden per Massenspektrometrie analysiert. Links vom Coomassie-Bild steht der Protein-Standard-Marker in kDa. **(B)** Galectin-3 wurde zusammen mit nukleärem Extrakt aus HeLa-Zellen und Dynabeads® IgG *rabbit* präzipitiert (gal3). Anschließend wurde die Immunpräzipitation mittels Western Blot und den Antikörpern gegen hnRNPA2B1 und Galectin-3 (IB) analysiert. In der Negativkontrolle (Mock) wurde der Antikörper bei der Immunpräzipitation weggelassen. Das Probenlysat diente der Kontrolle der Expression der zu untersuchenden Proteine (Lysat). **(C)** und **(D)** Galectin-3 wurde mit nukleärem Extrakt aus RCC-FG1-Zellen **(C)** und RC124-Zellen **(D)** zusammen mit Protein L gekoppelt an Agarose *Beads* präzipitiert. Die Analyse erfolgte per Western Blot und Antikörpern gegen hnRNPA2B1 und Galectin-3. gal3 - Galectin-3, IP – Immunpräzipitation, IB – Immunblot.

#### 4.1.2 hnRNPA2B1 kolokalisiert mit Galectin-3 *in vivo*

Nachdem die biochemischen Untersuchungen zeigen, dass Galectin-3 mit hnRNPA2B1 im Zellkern interagiert, sollte nun geklärt werden, ob diese Interaktion auch mikroskopisch nachgewiesen werden kann. Dazu wurden HeLa-Zellen für eine doppelte Immunfluoreszenzmarkierung mit Antikörpern verwendet. Ein Antikörper war gegen Galectin-3 und der zweite Antikörper gegen hnRNPA2B1 gerichtet. Die Immunfluoreszenz-Bilder in Abb. 4-2 A zeigen einige Kolokalisationen (Pfeile) zwischen dem endogenen hnRNPA2B1 und dem endogenen Galectin-3. Durch die Markierung des Zellkerns mit Hoechst wird auch deutlich, dass die Kolokalisationen in der Region des Zellkerns zu finden sind (Abb. 4-2 A). Diese Kolokalisationsstudien wurden mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops durchgeführt und bieten daher eine hohe Auflösung. Da der Antikörper gegen Galectin-3 eine sehr diffuse Färbung zeigt, sind die Kolokalisationen nur schwer zu definieren. Zur genaueren Abklärung der Interaktion bzw. Kolokalisation der beiden Proteine wurde der *Proximity Ligation Assay* verwendet. Dabei führt die Nähe der Oligonukleotid-gekoppelten Sekundärantikörper zu einer Amplifikation der Oligonukleotide und damit zum Einbau eines Fluorophors. Bei positiven Signalen kann man davon ausgehen, dass beide Proteine sich in einer Reichweite von maximal 40 nm befinden. Auch bei diesem Versuch wurden HeLa-Zellen einer Immunfluoreszenzmarkierung mit Antikörpern gegen das hnRNPA2B1 und das Galectin-3 unterzogen. Im PLA-Assay weisen punktförmige Fluoreszenzsignale auf Interaktionen der untersuchten Proteine hin. Zum Vergleich wurde eine positive Kontrolle bzw. eine bekannte Interaktion zwischen zwei Proteinen dargestellt. Dazu wurde Sc35, ein Speckles-Marker, und das hnRNPA2B1 verwendet (Abb. 4-2 B). Ebenfalls wurde eine Negativkontrolle eingebaut, welche ohne Inkubation mit Primärantikörpern erfolgte (Abb. 4-2 B, Sekundärantikörper). Die Negativkontrolle zeigt nur sehr wenige punktförmige Fluoreszenzsignale. Im Gegensatz dazu zeigt die Positivkontrolle sehr viele punktförmige Signale und auch die Probe mit den Antikörpern gegen hnRNPA2B1 und Galectin-3 zeigt viele Signale. Durch die Markierung der Zellkerne mit DAPI ist auch deutlich zu erkennen, dass sich die Signale in der Region des Zellkerns befinden (Abb. 4-2 B). Zur besseren Wahrnehmung der Interaktionen und zum Vergleich der Signale zwischen den Proben, wurden die Signale quantifiziert. Dabei wurden jeweils 3 Bilder einer Probe mit gleicher Größe mit Hilfe der ImageJ Software bearbeitet und über den *Speckle Inspector* analysiert. Jede Probe bestand aus einem 3-fach-Ansatz, somit kam man auf 9 Bilder pro Probe zur Analyse. Bei der Quantifizierung zeigt sich deutlich, dass die Probe mit Galectin-3 und hnRNPA2B1 im Vergleich zur Negativkontrolle eine um das circa 11-fache signifikant erhöhte Menge an Signalen pro Zellkern aufweist (Abb. 4-2 C).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse der biochemischen Untersuchung auch fluoreszenzmikroskopisch bestätigt werden konnten und Galectin-3 mit hnRNPA2B1 *in vivo* kolokalisiert. Diese Kolokalisationen scheinen ausschließlich im Bereich des Zellkerns vorhanden zu sein und der Abstand zwischen den beiden Proteinen liegt dabei unter 40 nm.



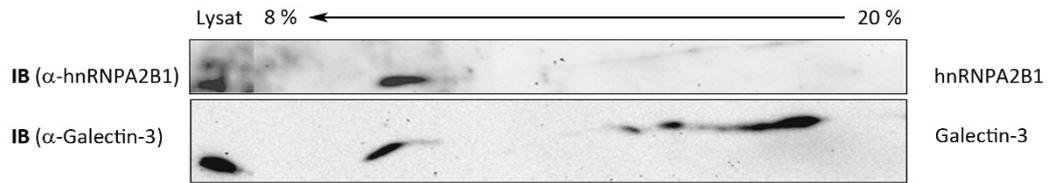
**Abb. 4-2 Galectin-3 kolokalisiert mit hnRNPA2B1 *in vivo*.**

**(A)** HeLa-Zellen wurden zunächst für 2 - 3 Tage auf Deckgläschen kultiviert. Anschließend wurden sie fixiert, permeabilisiert und einer Immunfluoreszenz-Markierung mit  $\alpha$ -Galectin-3/Alexa 546 und  $\alpha$ -hnRNPA2B1/Alexa 647 unterzogen. Die Zellkerne wurden mittels Hoechst 33258 sichtbar gemacht. Das linke Bild zeigt eine Übersichtsaufnahme und die 3 rechten Bilder zeigen Vergrößerungen des gleichen Bildes. Es zeigen sich einige Kolokalisationen im Bereich des Zellkerns, welche mit weißen und schwarzen Pfeilen markiert sind.  $\alpha$ -Galectin-3/Alexa 546 – grün,  $\alpha$ -hnRNPA2B1/Alexa 647 – rot, Kerne/Hoechst 33258 – blau, Maßstab – 10  $\mu$ m. **(B)** Für 2 - 3 Tage auf Deckgläschen kultivierte HeLa-Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und mit Primäntikörpern gegen Galectin-3 und hnRNPA2B1 versehen. Daraufhin erfolgte, durch Zugabe der entsprechenden Substanzen, der *Proximity Ligation Assay*. Für die Negativkontrolle wurden die HeLa-Zellen nur mit dem Sekundäntikörper versehen, ohne Einsatz eines Primäntikörpers. Und als Positivkontrolle dienten Antikörper gegen Sc35 und hnRNPA2B1. Die Interaktionen sind als PLA-Signale (schwarze Punkte) sichtbar und sind das Resultat der Nähe ( $\leq 40$  nm) der Oligonukleotid-gekoppelten Sekundäntikörper. Diese Nähe führt zu einer Amplifikation und somit zum Einbau des Fluorophors. Orange – Fluorophor, Zellkerne – DAPI, Maßstab – 10  $\mu$ m. **(C)** Zur besseren Wahrnehmung und für die statistische Analyse wurden die PLA-Signale quantifiziert und in einem Diagramm sichtbar gemacht. Das Diagramm zeigt die PLA-Signale pro Zellkern  $\pm$  Standardabweichung,  $n = 3$  (\*\* $p = 0,01$ ).

### 4.1.3 Galectin-3 und hnRNPA2B1 befinden sich im selben Komplex

Die hnRNP Proteine assoziieren mit freiwerdender pre-mRNA noch während deren Transkription und verpacken sie somit in hnRNP Partikel (Dreyfuss *et al.* 1993; Pinol-Roma *et al.* 1988; Pullman und Martin 1983). Vor allem die hnRNP A1, A2, B1, B2, C1 und C2 spielen dabei eine wichtige Rolle, da sie sich direkt um die pre-mRNA legen und das Zentrum des hnRNP Partikels bilden (Barnett *et al.* 1991; Dreyfuss *et al.* 1993; Lothstein *et al.* 1985; Walker *et al.* 1980). Daher sind hnRNP A/B Proteine eine wichtige Komponente des Spleißosoms (zusammengefasst in (Martinez-Contreras *et al.* 2007)). Auch Galectin-3 spielt eine Rolle im Spleißen von pre-mRNA und frühere Experimente zeigten, dass Galectin-3 mit Komponenten von hnRNP Komplexen interagiert (Laing und Wang 1988). Um einen Eindruck zu erhalten, in welchen nativen nukleären Proteinkomplexen sich Galectin-3 und hnRNPA2B1 befinden und ob sie auch im selben Komplex angesiedelt sind, wurde nukleärer Extrakt über eine native Gelelektrophorese aufgetrennt. Hierzu wurde monomeres Galectin-3 (29 kDa) zunächst aus dem nukleären Extrakt entfernt. Dies geschah durch Zentrifugation mit Filtern, die eine Porengröße von 50 kDa besaßen. Der übriggebliebene Extrakt wurde in der 1. Dimension auf einem nativen Polyacrylamidgel separiert, sodass sich die nativen Proteinkomplexe der Größe nach trennen konnten. In der 2. Dimension wurden die einzelnen Proteine der Komplexe mittels SDS-Polyacrylamidgel separiert und anschließend auf eine PVDF-Membran übertragen. Mit Hilfe von Antikörpern gegen Galectin-3 und hnRNPA2B1 konnte das Verteilungsmuster der beiden Proteine analysiert werden. In Abb. 4-3 ist das Verteilungsmuster von Galectin-3 und hnRNPA2B1 zu sehen, hierbei wird deutlich, dass sich beide Proteine zum größten Teil im Bereich von ca. 10 % Polyacrylamid befinden, also in einem Bereich größerer Proteinkomplexe. Aber auch in den höheren Polyacrylamidkonzentrationen sind beide Proteine zu finden. Die Menge an hnRNPA2B1 nimmt in diesen Bereichen stark ab, aber das Protein ist noch detektierbar (Abb. 4-3).

Alle biochemischen Versuche zusammengenommen weisen auf das Vorhandensein von Galectin-3 und hnRNPA2B1 in einem oder mehreren gemeinsamen nukleären Proteinkomplexen hin. Dabei scheint sich der höchste Anteil beider Proteine in einem größeren Komplex zu befinden.



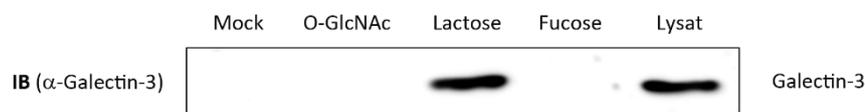
**Abb. 4-3 Galectin-3 und hnRNP A2B1 befinden sich im gleichen nukleären Proteinkomplex.**

Nukleärer Extrakt aus HeLa-Zellen wurde zunächst mittels eines 50 kDa-Filters filtriert, um monomeres Galectin-3 zu entfernen. Im Anschluss erfolgten zunächst die Auftrennung der nativen Proteinkomplexe in der 1. Dimension und danach die Auftrennung der einzelnen Proteine der Komplexe mittels SDS-PAGE. Die Analyse erfolgte per Western Blot mit Antikörpern gegen Galectin-3 und hnRNP A2B1. Die prozentuale Anzeige oberhalb des Immunoblots weist auf den Polyacrylamidgehalt in der 1. Auftrennung hin.

#### 4.1.4 Galectin-3 scheint keine Affinität für N-Acetylglucosamin zu besitzen

Nun stellte sich die Frage, ob die Interaktion zwischen Galectin-3 und hnRNPA2B1 eine direkte oder indirekte Interaktion ist. Da Galectin-3 eine CRD besitzt und somit bevorzugt an Glykoproteine bindet (Leffler *et al.* 2004), kam die Überlegung auf, ob dies nicht auch im Zellkern der Fall sein könnte. Hart *et al.* konnten zeigen, dass das Sauerstoff-verlinkte N-Acetylglucosamin auf verschiedenen Proteinen des Zellkerns zu finden ist (Hart *et al.* 2007). Und Rambaruth *et al.* zeigte, dass hnRNPA2B1 zu den Proteinen gehört, die diesen Zucker tragen können (Rambaruth *et al.* 2012). Deshalb wurde im folgenden Versuch überprüft, ob Galectin-3 in der Lage ist Sauerstoff-verlinktes N-Acetylglucosamin zu binden. Hierzu wurde Gesamtzelllysat aus HeLa-Zellen mit verschiedenen Zuckern inkubiert und über ein SDS-Polyacrylamidgel separiert. Die Analyse erfolgte mittels Western Blot und dem entsprechenden Antikörper gegen Galectin-3. Da die Zucker an Protein-A Sepharose-*Beads* gekoppelt waren, dienten reine Protein-A Sepharose-*Beads* als Negativkontrolle. Im Fall von Galectin-3 zeigten sich keine unspezifischen Bindungen an die Sepharose-*Beads* (Abb. 4-4). Die Laktose stellte für den Versuch die Positivkontrolle dar und der Immunoblot zeigte deutlich eine Bande in Höhe von Galectin-3. Da Galectin-3 nur Sechsfachzucker erkennt sollte es nicht in der Lage sein, Fucose als Fünffachzucker zu binden. In der Tat ließ sich keine Bindung an Fucose nachweisen (Abb. 4-4). In Abb. 4-4 ist aber auch deutlich zu erkennen, dass für Galectin-3 auch keine Bindung an den im Zellkern befindlichen Sauerstoff-verlinkten N-Acetylglucosamin nachweisbar ist, da auf dem Immunoblot keine Bande für Galectin-3 zu detektieren war.

Aus diesen Resultaten schließt sich, dass Galectin-3 möglicherweise nicht über die hier getesteten Zuckerverbindungen mit hnRNPA2B1 interagieren kann, somit wäre eine direkte Interaktion über eine Protein-Protein-Interaktion eher möglich. Oder es handelt sich hierbei um eine indirekte Interaktion über einen weiteren Interaktionspartner oder bisher unbekanntem Zucker.



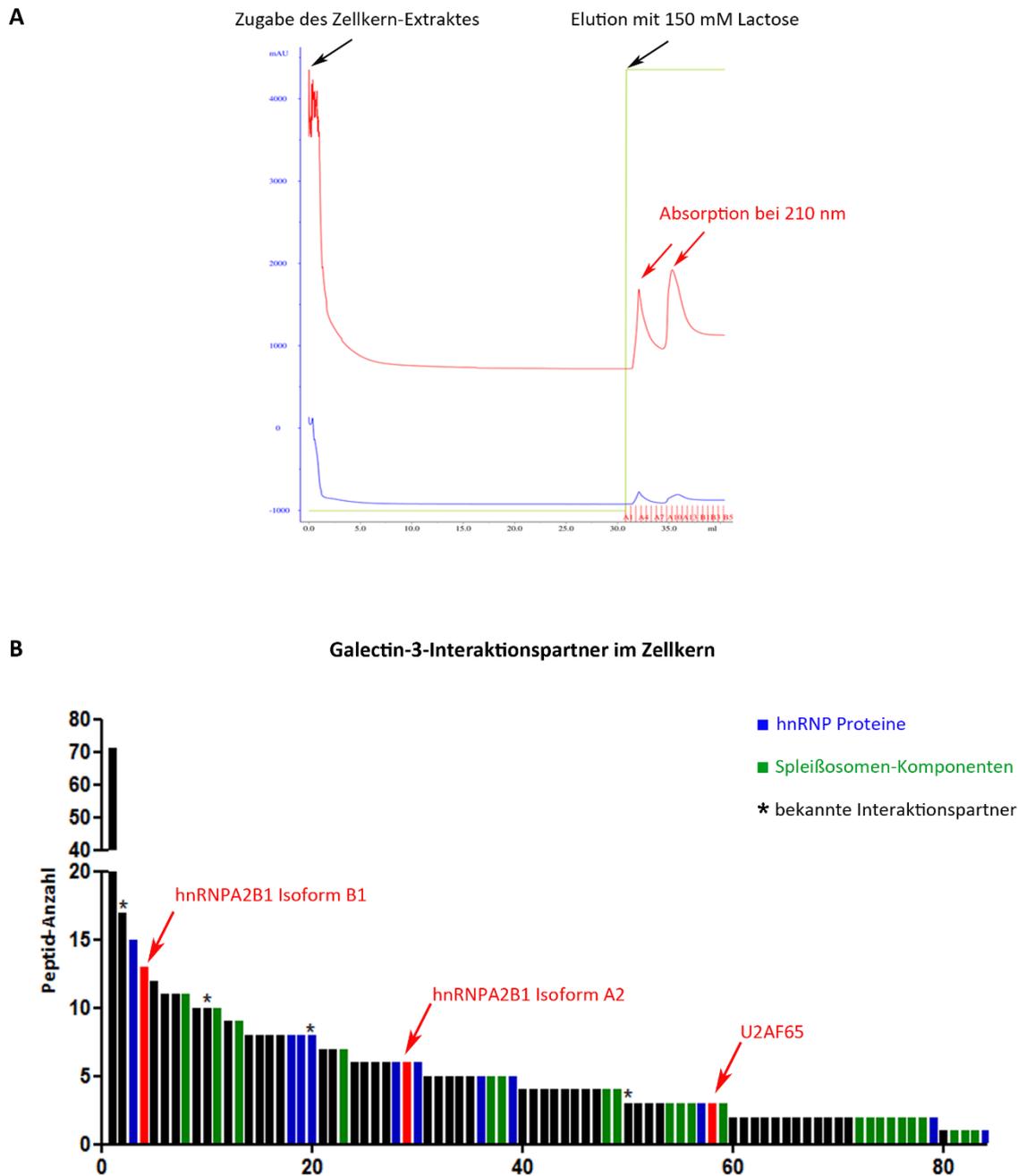
**Abb. 4-4 Galectin-3 kann nicht an Sauerstoff-verlinktes N-Acetylglucosamin binden.**

HeLa-Zelllysat wurde mit Sauerstoff-verlinkten N-Acetylglucosamin, Laktose oder Fucose inkubiert. Als Negativkontrolle (Mock) dienten Sepharose-*Beads* mit Protein A gekoppelt. Zur Detektion von Galectin-3 wurde ein Antikörper gegen Galectin-3 verwendet. Mock – Negativkontrolle, O-GlcNAc – O-verlinkte N-Acetylglucosamin.

## 4.2 Galectin-3 interagiert mit weiteren Spleißosomkomponenten im Zellkern

Zur weiteren Charakterisierung der Interaktion zwischen Galectin-3 und hnRNPA2B1 und um weitere mögliche Interaktionspartner von Galectin-3 im Zellkern zu finden, wurde eine Affinitätschromatographie durchgeführt. Hierzu wurde rekombinantes humanes Galectin-3 an eine Sepharose-Säule gekoppelt, diese wurde danach mit nukleärem Extrakt aus RCC-FG1 Zellen beladen und inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Säule gewaschen, um alle unspezifischen Bindungen zu entfernen (Abb. 4-5 A). Die Elution der Bindungspartner erfolgte durch Zugabe von Laktose und das Eluat wurde in einzelnen Fraktionen aufgefangen und per Massenspektrometrie analysiert (Abb. 4-5 A). In Abb. 4-5 A zu sehen ist, dass die Proteine in den entsprechenden Fraktionen per UV-Messung bei 210 nm nachgewiesen wurden, hier waren zwei Peaks zu sehen, da die Proteine vermutlich unterschiedlich stark an das Galectin-3 gebunden hatten. Die gefundenen Interaktionspartner von Galectin-3 sind in Abb. 4-5 B und Tab. 4-1 dargestellt. Beide Isoformen des hnRNPA2B1 konnten in den entsprechenden Fraktionen gefunden werden und deuten somit auf die Laktose-abhängige Interaktion zwischen Galectin-3 und hnRNPA2B1 hin (Abb. 4-5 B). Neben dem hnRNPA2B1 wurden auch noch weitere hnRNP Proteine, wie das hnRNPA1 oder hnRNPM, detektiert. Weiterhin wurden viele Spleißosomkomponenten und nicht-Spleißosom-Komponenten gefunden (Abb. 4-5 B und Tab. 4-1).

Die Ergebnisse der Affinitätschromatographie zeigten wiederholt, dass Galectin-3 mit hnRNPA2B1 im Zellkern interagiert und diese Interaktion Laktose-abhängig ist. Es konnten auch noch weitere Interaktionspartner von Galectin-3 im Zellkern gefunden werden, dazu zählen hnRNP Proteine, Spleißosom-Komponenten und andere nukleäre Proteine.



**Abb. 4-5 Galectin-3 interagiert mit verschiedenen hnRNP Proteinen, Spleißosom-Komponenten und weiteren nukleären Proteinen.**

(A) Rekombinantes humanes Galectin-3 wurde an eine Sepharose-Säule gekoppelt und mit nukleärem Extrakt aus RCC-FG 1 Zellen inkubiert. Die Interaktionspartner von Galectin-3 wurden durch Zugabe von Laktose gelöst und in Fraktionen aufgefangen, welche per Massenspektrometrie analysiert wurden. Das Diagramm zeigt die Wellenlängen-Messung bei 210 nm. Damit wurde festgestellt welche Fraktionen Proteine enthielten und per MS analysiert wurden. (B) Die Massenspektrometrie-Daten der untersuchten Fraktionen der Affinitätschromatographie. Schwarze Balken zeigen nukleäre Proteine, in grün dargestellt sind hnRNP Proteine, Spleißosom-Komponenten sind als blaue Balken dargestellt und schon bekannte Interaktionspartner wurden mit einem Stern markiert. Die Zahlen auf der X-Achse korrelieren mit den Proteinnummern in Tab. 4-1.

Tab. 4 – 1 Interaktionspartner von Galectin-3 im Zellkern.

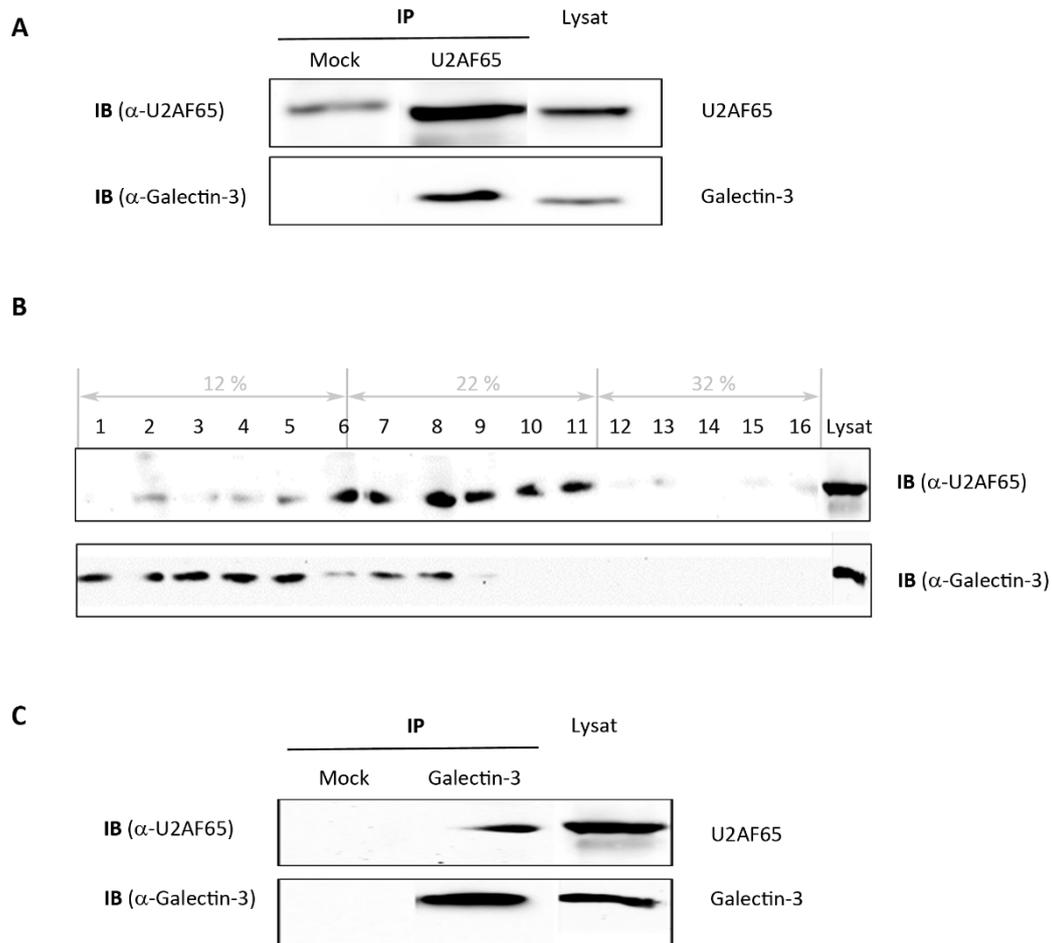
	Identifikationsnr.	MW [kDa]	Peptid-Anzahl	%	Beschreibung
1	13654237	468,8	71	25,68	DNPK1
2	119591368	58,5	17	40,49	Nucleolin, Isoform CRA_C (Ncl)
3	157412270	73,6	15	36,18	hnRNPM, Isoform B
4	14043072	37,4	13	44,19	hnRNPA2B1, Isoform B1
5	75517570	29,4	12	41,2	hnRNPA1
6	154355000	73,1	11	23,07	far upstream element-Bindeprotein 2
7	24234750	95,3	11	20,36	Interleukin enhancer-binding Faktor 3, Isoform A
8	100913206	140,9	11	11,97	ATP-abhängige RNA Helicase A
9	157694492	148,8	10	12,58	myb-Bindeprotein 1A, Isoform 2
10	19913410	99,3	10	23,85	major vault protein
11	24234686	53,5	10	24,54	verwandtes Hitzeschockprotein 71 kDa, Isoform 2
12	126032350	465,2	9	3,27	DNA-abhängige Proteinkinase, katalytische Untereinheit, Isoform2
13	14165466	57,2	9	34,65	PTBP1, Isoform c
14	5031877	66,4	8	20,99	Lamin B1
15	40353734	29,4	8	46,04	Nucleophosmin, Isoform 2
16	4507555	75,4	8	18,3	Thymopoietin, Isoform Alpha
17	4507943	123,3	8	12,7	Exportin-1
18	5031753	49,2	8	27,84	hnRNPH
19	211828181	61,9	8	31,12	hnRNPL
20	116283697	50,6	8	26,49	SYNCRIP (hnRNPQ)
21	4505773	29,8	7	45,59	Prohibitin
22	33875177	29,4	7	41,73	YBX1 Protein, partiell
23	5729877	70,9	7	15,33	verwandtes Hitzeschockprotein 71 kDa, Isoform 1
24	4885381	22,6	6	22,57	Histon H1.5
25	4503101	20,9	6	45,6	Cystein- und Glycin-reiches Protein 2
26	40254924	34,9	6	30,62	Leucin-reiches repeat-containing Protein 59
27	120587023	318,2	6	3,3	small subunit processome component 20 homolog
28	4826760	45,6	6	31,08	hnRNPF
29	4504447	36	6	24,63	hnRNPA2B1, Isoform A2
30	111494085	67,8	6	15,32	hnRNPR
31	30795231	22,7	5	52,42	BASP1
32	4885375	21,4	5	24,41	Histon H1.2
33	49257460	33,3	5	28	PTRF Protein
34	224586882	40,1	5	20,7	DNA-Bindeprotein A, Isoform A (YBX3)
35	4504517	22,8	5	40	Hitzeschockprotein Beta-1
36	9624998	49,2	5	18,26	hnRNPH2
37	91208426	273,4	5	3	PRPF8
38	54112117	145,7	5	5,06	SF3B1, Isoform 1
39	55956921	30,6	5	15,79	hnRNPAB, Isoform B
40	5031875	65,1	4	12,06	Lamin, Isoform C

41	433344	31,5	4	15,73	p37 AUF 1
42	13128860	55,1	4	11,41	Histondeacetylase 1 (HDAC1)
43	21626466	94,6	4	8,5	Matrin-3, Isoform A
44	300934782	97,3	4	6,17	Transportin-3, Isoform 2
45	119573569	98,7	4	5,64	Adenosindeaminase, RNA-spezifisch, Isoform CRA_b (ADAR)
46	62955803	195,9	4	3,26	Nucleoporin Nup 188 Homolog
47	295054210	271,5	4	2,78	RIF1, Isoform 2
48	301171475	71,3	4	8,36	DDX3X, Isoform 3
49	4502491	31,3	4	29,08	SF2P32
50	21536301	83	3	6,18	STAT1, Isoform Beta
51	338753429	79,8	3	5,6	Nup93, Isoform 2
52	148596949	73,6	3	5,15	NOLC1
53	11225260	90,7	3	4,84	DNA-Topoisomerase 1
54	4504981	14,7	3	42,22	Galectin-1
55	48429165	26,9	3	26,85	Tho4
56	118582269	22,4	3	26,37	SRSF1, Isoform 2
57	52632385	50,5	3	14,47	hnRNPL, Isoform B
58	197692223	53,1	3	11,68	U2AF65, Isoform B
59	119620769	15,2	3	30,3	SRSF7
60	10800138	13,9	2	19,05	Histon H2B Typ 1-D
61	4758302	12,3	2	30,77	enhancer of rudimentary Homolog (ERH)
62	83641870	28,4	2	16,22	Nucleophosmin, Isoform 3
63	4506007	37	2	9,29	PPP1CC, Isoform 1
64	5453555	24,4	2	8,8	nukleäres GTP-Bindeprotein Ran
65	4507353	61,5	2	6,96	TAF15, Isoform 2
66	4758844	148,9	2	1,58	Nup155, Isoform 2
67	5174449	22,5	2	10,33	Histon H1x
68	4504433	10,7	2	19,79	HMG A1, Isoform B
69	4504183	23,3	2	18,57	Glutathion-S-transferase P
70	13376840	33,6	2	12,13	WDR61
71	296439283	227,8	2	1,29	Nup205
72	40217847	244,4	2	1,59	U5 200 kDa (snRNP200)
73	7657381	55,1	2	7,54	PRP 19
74	402794208	54	2	7,62	PUF60, Isoform H
75	7661920	46,8	2	9,98	eIF4A3
76	197692189	27,9	2	12,92	U2AF35, Isoform A
77	4504517	22,8	2	13,17	HspB1
78	345197228	21,9	2	19,15	Tra2B, Isoform 2
79	119577432	84,4	2	4,65	hnRNP U-like 1, Isoform CRA_c
80	39753957	66,2	1	2,06	Torsin-1A-interaktierendes Protein 1, Isoform 2
81	13775200	10,1	1	17,44	SF3B5
82	31455228	19,8	1	10,78	U2AF35
83	4507129	10,8	1	11,96	SmE
84	5803036	30,8	1	6,56	hnRNPAO

#### 4.2.1 Galectin-3 interagiert mit U2AF65 *in vitro*

Bei der Affinitätschromatographie konnten neben dem hnRNPA2B1 noch weitere Spleißosomkomponenten gefunden werden, welche mögliche Interaktionspartner von Galectin-3 im Zellkern sind (Abb. 4-5 und Tab. 4-1). Eine dieser Komponenten ist das U2AF65, ein wichtiger Faktor während der Initiierung des Spleißens. Es erkennt und bindet den Polypyrimidin-Trakt, eine der Erkennungssequenzen auf dem Intron (Zamore *et al.* 1992). Zur Abklärung der Interaktion zwischen Galectin-3 und U2AF65 wurde nukleärer Extrakt aus HeLa-Zellen mit einem  $\alpha$ -U2AF65 Antikörper immunpräzipitiert. Die co-präzipitierten Proteine wurden auf einem SDS-Polyacrylamidgel separiert und auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Für die Analyse wurden Antikörper gegen Galectin-3 und U2AF65 verwendet. In der Negativkontrolle (Abb. 4-6 A Mock) wurde kein Antikörper für die Immunpräzipitation eingesetzt, um unspezifische Bindungen an die Protein L Agarose-Beads auszuschließen. In dieser Spur zeigt jedoch U2AF65 unspezifische Bindungen an die Beads (Abb. 4-6 A). Diese Bande ist aber im Vergleich mit der IP-Probe viel schwächer. In der mit  $\alpha$ -U2AF65 Antikörper immunpräzipitierten Probe zeigt sich eine deutliche Bande für Galectin-3 und eine Bande für U2AF65 (Abb. 4-6 A). Dies weist daraufhin, dass U2AF65 mit Galectin-3 gemeinsam präzipitiert wird. Daraus ergab sich die Fragestellung, ob beide Proteine auch in einem Komplex im Zellkern zu finden sind. Um dieser Frage nachzugehen, wurde eine Dichtegradientenzentrifugation mit einem Glycerolgradienten durchgeführt. Nukleärer Extrakt aus HeLa-Zellen wurde auf einen 12 - 32 % igen Glycerolgradienten aufgetragen und für 4 Stunden bei 44000 rpm zentrifugiert. Die einzelnen Fraktionen (16 Fraktionen) wurden von oben beginnend abgenommen und mittels SDS-PAGE separiert. Zur Analyse wurde das Gel einem Western Blot unterzogen und mit Antikörpern gegen Galectin-3 und U2AF65 inkubiert (Abb. 4-6 B). Beide Proteine zeigen ein Verteilungsmuster über mehrere Fraktionen, aber in den Fraktionen 5 – 8 sind beide zu finden, dies führt zu der Idee, dass sie sich größtenteils im selben Komplex aufhalten könnten (Abb. 4-6 B). Zur Abklärung, ob beide Proteine in diesen Fraktionen auch interagieren, wurden die Fraktionen 5 und 6 zu einer Probe vereint und mit  $\alpha$ -Galectin-3 immunpräzipitiert. In Abb. 4-6 C ist zu erkennen, dass in Spur 2 Banden für U2AF65 und Galectin-3 sichtbar sind. Dies spricht dafür, dass U2AF65 mit Galectin-3 in den Fraktionen 5 und 6 gemeinsam präzipitiert werden.

Es konnte gezeigt werden, dass Galectin-3 mit einer weiteren Komponente des Spleißosoms interagiert, dem U2AF65. Und weiterhin konnte gezeigt werden, dass sich beide Proteine größtenteils in einem Komplex befinden können. Die Interaktion zwischen Galectin-3 und U2AF65 ist Laktose-abhängig, und U2AF65 könnte auch der mögliche Zwischen-Interaktionspartner für die indirekte Interaktion von Galectin-3 mit hnRNPA2B1 sein.



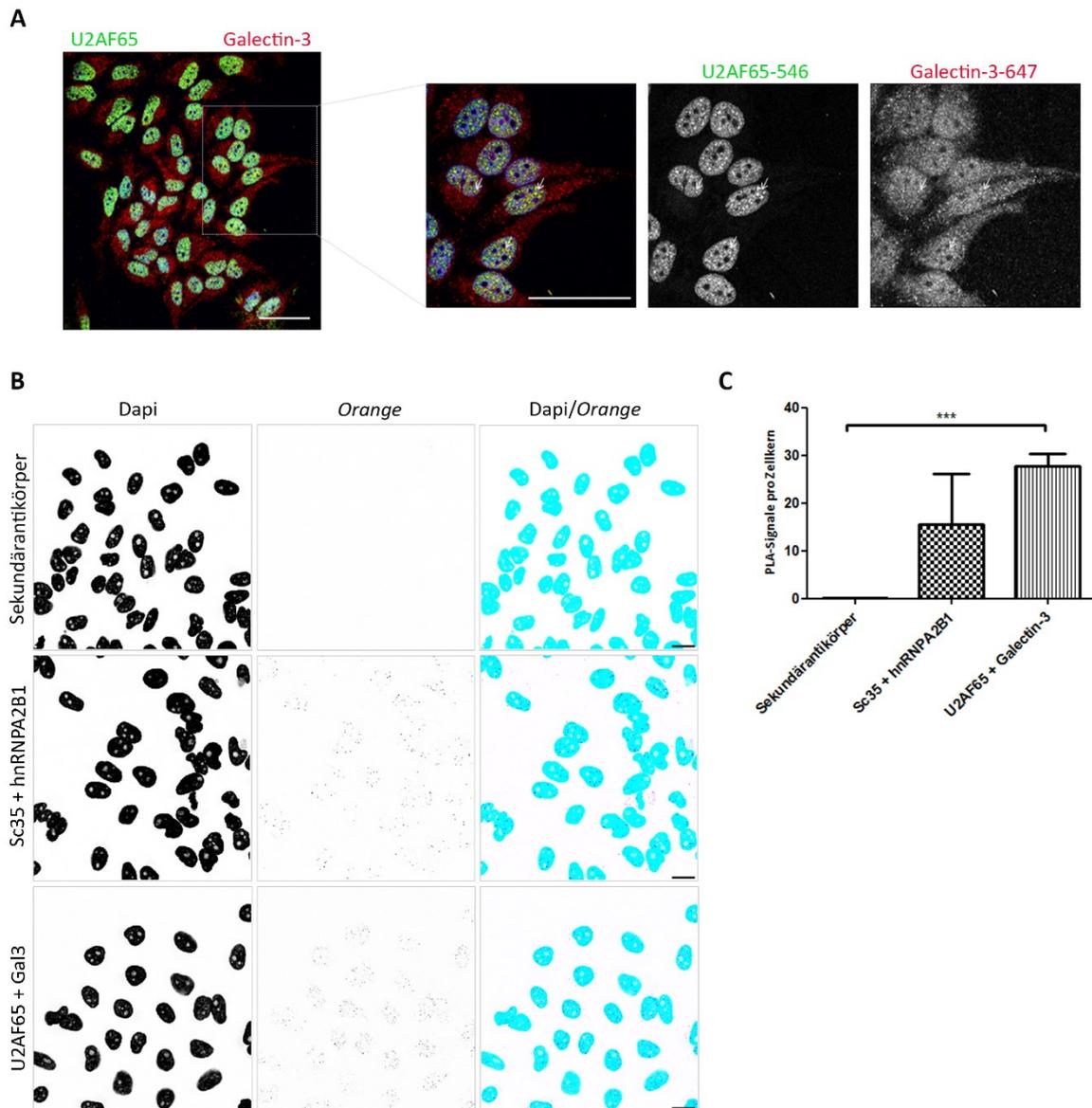
**Abb. 4-6 Galectin-3 interagiert mit U2AF65.**

**(A)** U2AF65 wurde mit nukleärem Extrakt aus HeLa-Zellen und Agarose-Beads gekoppelt mit Protein L immunpräzipitiert. Anschließend wurde die Immunpräzipitation mittels Western Blot und Antikörpern gegen U2AF65 und Galectin-3 (IB) analysiert. In der Negativkontrolle (Mock) wurde der Antikörper bei der Immunpräzipitation weggelassen. Das Probenlysat diente der Expressionskontrolle der zu untersuchenden Proteine (Lysat). **(B)** Nukleärer Extrakt aus HeLa-Zellen wurde auf einen 12 – 32 % igen Glycerolgradienten aufgetragen und für 4 Stunden bei 44000 rpm zentrifugiert. Fraktionen (16 Fraktionen) wurden von oben nach unten abgenommen und mittels SDS-PAGE separiert. Die Analyse erfolgte per Western Blot und Antikörpern gegen U2AF65 und Galectin-3. 1 – 16 Fraktionen, 12 % -Fraktion 1-6, 22 % - Fraktion 6 – 11, 32 % - Fraktion 12 -16. **(C)** Fraktionen 5 und 6 wurden als eine Probe vermischt und mit  $\alpha$ -Galectin-3 immunpräzipitiert (IP Gal3). Mittels Western Blot und Antikörpern gegen U2AF65 und Galectin-3 (IB) wurde die Immunpräzipitation analysiert. Fraktion 15 diente als Negativkontrolle (Mock), hier wurde der Antikörper bei der Immunpräzipitation weggelassen.

#### 4.2.2 Galectin-3 kolokalisiert mit U2AF65 *in vivo*

Mit Hilfe von Immunfluoreszenz und *Proximity Ligation Assay* sollte nun auch die Interaktion von Galectin-3 und U2AF65 *in vivo* betrachtet werden. Zunächst wurde eine doppelte Immunfluoreszenzmarkierung mit Antikörpern gegen Galectin-3 und U2AF65 in HeLa-Zellen durchgeführt. Die Immunfluoreszenz-Bilder in Abb. 4-7 A zeigen einige Kolokalisationen (Pfeile) zwischen dem endogenen U2AF65 und dem endogenen Galectin-3. Durch die Markierung des Zellkerns mit Hoechst wird auch deutlich, dass sich diese Kolokalisationen in den Regionen des Zellkerns befinden (Abb. 4-7 A). Anschließend wurde zur genaueren Abklärung der Kolokalisation ein PLA verwendet. Zunächst wurden HeLa-Zellen einer Immunfluoreszenzmarkierung mit Antikörpern gegen U2AF65 und Galectin-3 unterzogen. Die schwarzen Fluoreszenzsignale im mittleren Bild in Abb. 4-7 B weisen auf positive Interaktionen zwischen Galectin-3 und U2AF65 hin (Abb. 4-7 B). Zum Vergleich diente wieder eine Positivkontrolle mit Antikörpern gegen Sc35 und hnRNPA2B1 (Abb. 4-7 B). Die Negativkontrolle erfolgte ohne Inkubation mit einem Primärantikörper (Abb. 4-7 B, Sekundärantikörper). Die Signale wurden quantifiziert und aus diesem Diagramm ist deutlich ersichtlich, dass durch Zugabe von Antikörpern gegen Galectin-3 und U2AF65 im Vergleich zur Negativkontrolle die Zahl der PLA-Signale um circa 30 pro Zellkern erhöht wird (Abb. 4-7 C).

Die *in vivo* Untersuchungen zur Interaktion von Galectin-3 mit U2AF65 zeigen einige Kolokalisationen im Bereich des Zellkerns. Diese Kolokalisationen scheinen sich in einem Maximalabstand von 40 nm zu befinden. Diese Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchung unterstützen die biochemischen Interaktionsstudien von U2AF65 mit Galectin-3. Als Resultat findet man eine Interaktion zwischen U2AF65 und Galectin-3, die Laktose-abhängig und im Zellkern zu finden ist.



**Abb. 4-7 Galectin-3 kolokalisiert mit U2AF65 *in vivo*.**

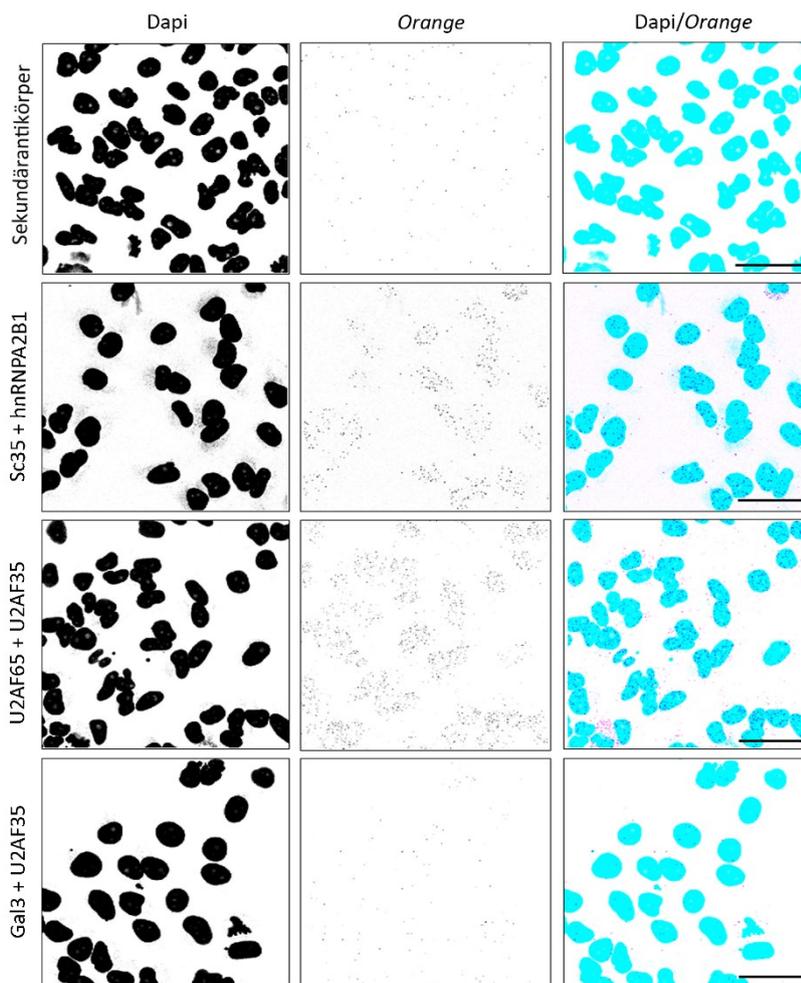
(A) HeLa-Zellen wurden zunächst für 2 - 3 Tage auf Deckgläschen kultiviert. Anschließend wurden sie fixiert, permeabilisiert und einer Immunfluoreszenz-Markierung mit  $\alpha$ -U2AF65/Alexa 546 und  $\alpha$ -Galectin-3/Alexa 647 unterzogen. Die Zellkerne wurden mittels Hoechst 33258 sichtbar gemacht. Das linke Bild zeigt eine Übersichtsaufnahme und die 3 rechten Bilder zeigen Vergrößerungen des gleichen Bildes. Es zeigen sich einige Kolokalisationen im Zellkern, welche mit weißen Pfeilen markiert sind.  $\alpha$ -U2AF65/Alexa 546 – grün,  $\alpha$ -Galectin-3/Alexa 647 – rot, Kerne/Hoechst 33258 – blau, Maßstab – 50  $\mu$ m. (B) Für 2 - 3 Tage auf Deckgläschen kultivierte HeLa-Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und mit Primärantikörpern gegen Galectin-3 und U2AF65 inkubiert. Daraufhin folgte der *Proximity Ligation Assay*. Für die Negativkontrolle wurden die HeLa-Zellen nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert und als Positivkontrolle dienten Antikörper gegen Sc35 und hnRNP A2B1. Die Interaktionen sind als PLA-Signale (schwarze Punkte) sichtbar und sind das Resultat der Nähe ( $\leq 40$  nm) der Oligonukleotid-gekoppelten Sekundärantikörper. Orange – Fluorophor, Zellkerne – DAPI, Maßstab – 10  $\mu$ m. (C) Für die statistische Analyse wurden die PLA-Signale quantifiziert und in einem Diagramm sichtbar gemacht. Das Diagramm zeigt die PLA-Signale pro Zellkern +/- Standardabweichung,  $n = 3$  (\*\*\*)  $p = 0,0001$ .

#### 4.2.3 Galectin-3 und U2AF35 scheinen sich in einem Abstand $\geq 40$ nm voneinander entfernt zu befinden

U2 snRNP *auxiliary factor* (U2AF) ist ein Heterodimer bestehend aus der großen Untereinheit U2AF65 (65 kDa) und der kleineren Untereinheit U2AF35 (35 kDa) (Zamore und Green 1989). Während U2AF65 den Polypyrimidintrakt erkennt und bindet (Zamore *et al.* 1992), interagiert U2AF35 mit den AG Dinukleotiden an der 3' Spleißseite, welches eine weitere Erkennungssequenz auf dem zu entfernenden Intron ist (Merendino *et al.* 1999; Wu *et al.* 1999; Zorio und Blumenthal 1999). Da U2AF65 und U2AF35 ein Heterodimer bilden und somit miteinander interagieren, lag die Vermutung nahe, dass Galectin-3 neben der großen Untereinheit U2AF65 auch mit der kleineren Untereinheit U2AF35 interagiert bzw. kolokalisiert. Daher wurde ein *Proximity Ligation Assay* mit Antikörpern gegen U2AF35 und Galectin-3 durchgeführt. In der Abb. 4-8 A ist zu erkennen, dass die Fluoreszenzsignale in der Probe gering sind im Vergleich zu den Positivproben (Sc35 + hnRNPA2B1, sowie U2AF65 + U2AF35). Wenn man die Signale quantifiziert, sieht man dass die Anzahl der Signale in der Probe in etwa gleich den Signalen in der Negativkontrolle (Sekundärantikörper) sind (Abb. 4-8 B). Dieser nicht signifikante Unterschied zwischen der Probe und der Negativkontrolle lässt darauf schließen, dass Galectin-3 und U2AF35 sich weiter als 40 nm voneinander befinden. Die Positivkontrolle mit Antikörpern gegen Sc35 und hnRNPA2B1 zeigte viele Signale im Zellkern und zeigte eine deutliche Verbindung zwischen beiden Proteinen (Abb. 4-8). Es wurde auch noch eine zweite Positivkontrolle eingebaut, hierbei wurden Antikörper gegen U2AF65 und U2AF35 verwendet, beide Proteine müssen sich in einem Maximalabstand von 40 nm befinden, da sie ein Heterodimer bilden. Auch diese Positivkontrolle zeigt viele Signale im Zellkern von HeLa-Zellen (Abb. 4-8), daher ist die Funktionalität des Versuchs bestätigt.

Es scheint als interagiert Galectin-3 zwar mit U2AF65, aber nicht mit der kleineren Untereinheit U2AF35. Dies bleibt jedoch eine Vermutung, da der Versuch nur einmal durchgeführt werden konnte und noch nicht durch weitere Experimente bestätigt wurde.

A



B

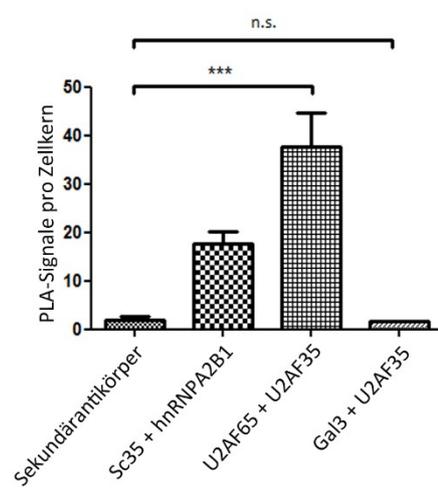


Abb. 4-8 Galectin-3 und U2AF35 scheinen sich nicht in einem Maximalabstand von 40 nm zu befinden.

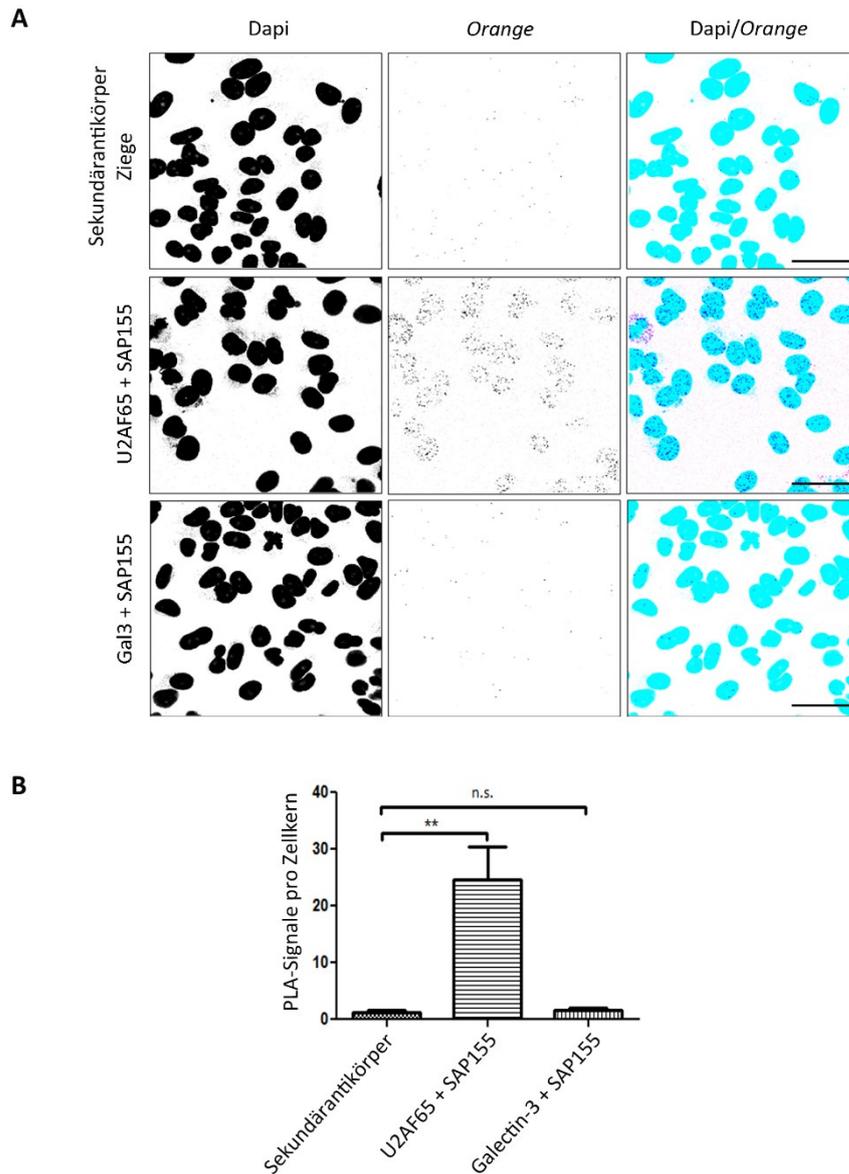
(Legende siehe folgende Seite)

**(A)** Für 2 - 3 Tage auf Deckgläschen kultivierte HeLa-Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und mit Primärantikörpern gegen Galectin-3 und U2AF35 inkubiert. Daraufhin erfolgte der *Proximity Ligation Assay*. Für die Negativkontrolle wurden die HeLa-Zellen nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert und als Positivkontrolle dienten Antikörper gegen Sc35 und hnRNPA2B1. Für eine zweite Positivkontrolle wurden Antikörper gegen U2AF65 und U2AF35 verwendet. Die Interaktionen sind als PLA-Signale (schwarze Punkte) sichtbar und sind das Resultat der Nähe ( $\leq 40$  nm) der Oligonukleotid-gekoppelten Sekundärantikörper. Orange – Fluorophor, Zellkerne – DAPI, Maßstab – 10  $\mu\text{m}$ . **(B)** Für die statistische Analyse wurden die PLA-Signale quantifiziert und in einem Diagramm sichtbar gemacht. Das Diagramm zeigt die PLA-Signale pro Zellkern +/- Standardabweichung, (\*\*\*)  $p = 0,001$ .

#### 4.2.4 Galectin-3 scheint weiter als 40 nm vom U2 snRNP SAP155 entfernt zu sein

Die Spleißfaktoren SF3A und SF3B sind Komponenten des U2 snRNP, diese sind besonders wichtig für die Bindung der U2 snRNP an die *branchpoint* Sequenz. Der Spleißfaktor SF3B besteht aus 4 Untereinheiten, eine dieser Untereinheit ist das SAP155 (SF3B155), und ist besonders wichtig für die Verankerung des U2 snRNP an die pre-mRNA (zusammengefasst in (Krämer 1996; Reed 1996; Will und Lührmann 1997)). Gozani *et al.* konnten zeigen, dass U2AF mit SAP155 interagiert, und vermuten dass die Bindung von U2AF65 an den Polypyrimidintrakt zur Interaktion mit SAP155 führt und dies wiederum führt zur Rekrutierung des U2 snRNP an die *branchpoint* Sequenz (Gozani *et al.* 1998). Daher lag die Idee nahe, dass sich auch Galectin-3 möglicherweise in der Nähe des SAP 155 befindet. Um der Fragestellung nachzugehen, wurden HeLa-Zellen zunächst einer Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen Galectin-3 und SAP155 unterzogen, im Anschluss erfolgte der *Proximity Ligation Assay*. Die Negativkontrolle (Sekundärantikörper Ziege) zeigt zwar minimale Signale (Abb. 4-9), aber im Vergleich zu der Positivkontrolle war ein deutlicher Unterschied zu erkennen. Die Positivkontrolle U2AF65 + SAP155 zeigt deutliche Signale im Zellkern (Abb. 4-9). Der PLA der Probe (Galectin-3 + SAP155) zeigt hingegen nur wenige Signale (Abb. 4-9 A). Auch die Quantifizierung ergibt, dass die Signale auf dem Niveau der Negativkontrollen liegen und daher nicht signifikant sind (Abb. 4-9 B).

Ebenso wie U2AF35 ist vermutlich auch dieser U2AF65-Interaktionspartner weiter als 40 nm von Galectin-3 entfernt. Jedoch wurde auch der Versuch nur einmal durchgeführt und es fehlen weitere biochemische Analysen.

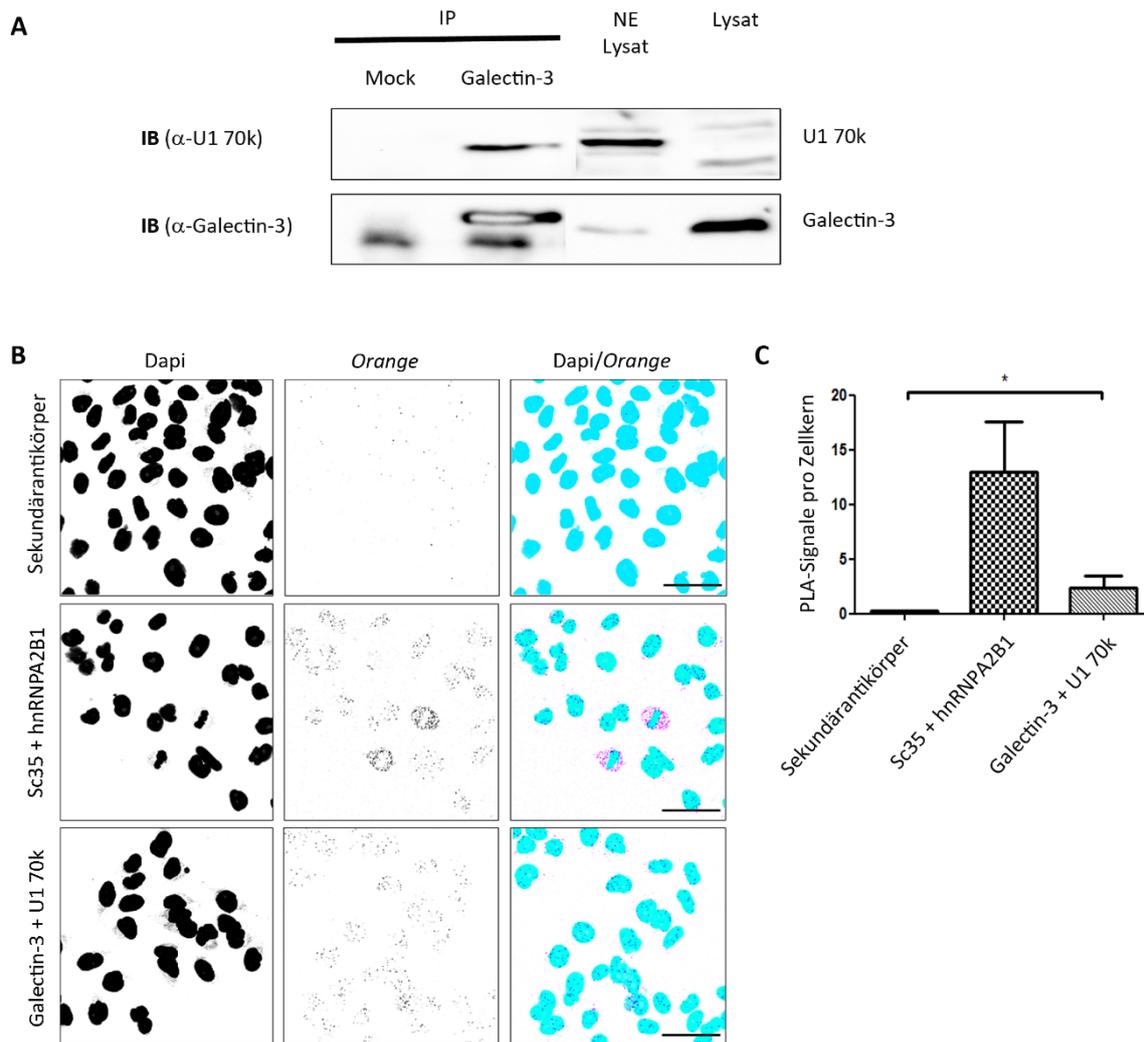


**Abb. 4-9 Galectin-3 und SAP155 scheinen weiter als 40 nm voneinander entfernt zu sein.**

**(A)** Für 2 - 3 Tage auf Deckgläschen kultivierte HeLa-Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und mit Primärantikörpern gegen Galectin-3 und SAP155 inkubiert. Daraufhin erfolgte der *Proximity Ligation Assay*. Für die Negativkontrolle wurden die HeLa-Zellen nur mit den Sekundärantikörpern Maus + Ziege inkubiert und als Positivkontrolle dienten Antikörper gegen U2AF65 und SAP155. Die Interaktionen sind als PLA-Signale (schwarze Punkte) sichtbar und sind das Resultat der Nähe ( $\leq 40$  nm) der Oligonukleotid-gekoppelten Sekundärantikörper. Orange – Fluorophor, Zellkerne – DAPI, Maßstab – 10  $\mu$ m. **(B)** Für die statistische Analyse wurden die PLA-Signale quantifiziert und in einem Diagramm sichtbar gemacht. Das Diagramm zeigt die PLA-Signale pro Zellkern +/- Standardabweichung, (\*\* $p = 0,002$ ).

#### 4.2.5 Galectin-3 interagiert mit U1 70k

Ein weiteres wichtiges Protein in der Initiierung des Spleißvorgangs ist U1 70k. U1 70k, U1-C und U1-A (Bringmann und Lührmann 1986; Hinterberger *et al.* 1983) sind die drei Proteinkomponenten der U1 snRNP, welches die Initiierungssequenz an der 5' Spleißseite des zu entfernenden Introns erkennt und bindet (Lacadie und Rosbash 2005; Lund und Kjems 2002). Die Resultate von Haudek *et al.* zeigten bereits, dass Galectin-3 mit U1 70k co-präzipitiert (Haudek *et al.* 2009). Aufbauend darauf erfolgte die Immunfluoreszenz-Untersuchung mittels *Proximity Ligation Assay*. Zunächst wurde die Immunpräzipitation mit  $\alpha$ -Galectin-3 Antikörper und nukleärem Extrakt aus HeLa-Zellen durchgeführt. Hierbei wird das Ergebnis von Haudek *et al.* bestätigt, da Galectin-3 mit U1 70k gemeinsam präzipitiert (Abb. 4-10 A). Als nächste Untersuchung erfolgte der *in vivo*-Versuch mittels PLA. Hierzu wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen Galectin-3 und U1 70k gemacht, gefolgt von einem PLA-Assay. Die Positivkontrolle (Sc35 + hnRNP A2/B1) zeigt viele Signale im Zellkern und die Negativkontrolle (Sekundärantikörper) zeigt den Anteil der Hintergrundsignale an (Abb. 4-10 B). Die Probe (Galectin-3 + U1 70k) zeigt einige Signale im Zellkern und die Quantifizierung ergibt dass diese Signale auch signifikant sind (Abb. 4-10 B, C). Jedoch wurde der Versuch nur zweimal durchgeführt und daher kann man nur vermuten, dass sich beide Proteine in einem Maximalabstand von 40 nm befinden.



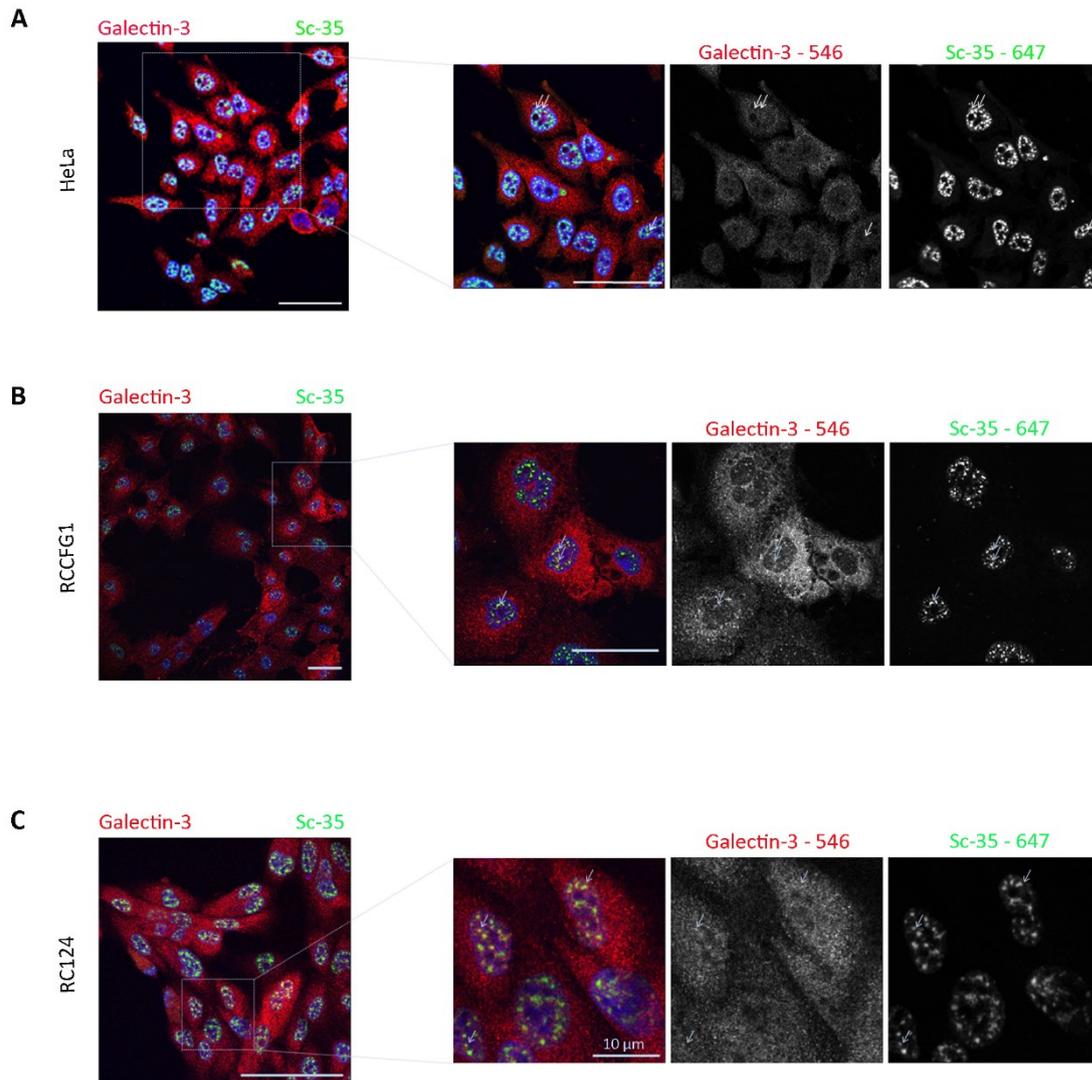
**Abb. 4-10 Galectin-3 interagiert mit U1 70k im Zellkern**

**(A)** Die Immunpräzipitation erfolgte mit  $\alpha$ -Galectin-3 Antikörper und nukleärem Extrakt aus HeLa-Zellen zusammen mit Dynabeads® Protein G. Anschließend wurde die Immunpräzipitation mittels Western Blot und den Antikörpern gegen U1 70k und Galectin-3 (IB) analysiert. In der Negativkontrolle (Mock) wurde der Antikörper bei der Immunpräzipitation weggelassen. Das Probenlysat und das NE-Lysat dienen der Expressionskontrolle der zu untersuchenden Proteine (Lysat). NE – nukleärer Extrakt. **(B)** Für 2 - 3 Tage auf Deckgläschen kultivierte HeLa-Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und mit Primärantikörpern gegen Galectin-3 und U1 70k inkubiert. Daraufhin erfolgte der *Proximity Ligation Assay*. Für die Negativkontrolle wurden die HeLa-Zellen nur mit den Sekundärantikörpern inkubiert und als Positivkontrolle dienten Antikörper gegen Sc35 und hnRNP A2B1. Die Interaktionen sind als PLA-Signale (schwarze Punkte) sichtbar und sind das Resultat der Nähe ( $\leq 40$  nm) der Oligonukleotid-gekoppelten Sekundärantikörper. Orange – Fluorophor, Zellkerne – DAPI, Maßstab – 10  $\mu$ m. **(C)** Für die statistische Analyse wurden die PLA-Signale quantifiziert und in einem Diagramm sichtbar gemacht. Das Diagramm zeigt die PLA-Signale pro Zellkern +/- Standardabweichung, (\* $p = 0,0339$ ).

#### **4.2.6 Galectin-3 kolokalisiert mit Speckles in verschiedenen Zelllinien**

Nukleäre Speckles sind Strukturen, die durch die Anreicherung der meisten pre-mRNA Faktoren gekennzeichnet sind. Diese Speckles werden auch Sc35-Domänen genannt, da der Serin- und Argininreiche Spleißfaktor Sc35 immer vorhanden ist (zusammengefasst in (Spector 1993); (Fu und Maniatis 1990)). Galectin-3 als Komponente des Spleißosoms sollte mit den nukleären Speckles kolokalisieren. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit Antikörpern gegen Galectin-3 und Sc35 durchgeführt. Diese Färbungen wurden in 3 verschiedenen Zelllinien, den HeLa-, RCC-FG1- und RC124-Zellen, ausgeführt. Alle drei Zelllinien zeigen Kolokalisationen zwischen Galectin-3 und Sc35, diese sind in Abb. 4-11 durch weiße Pfeile gekennzeichnet.

Unabhängig von der Zelllinie scheint Galectin-3 Bestandteil nukleärer Speckles zu sein. Dies könnte ein Hinweis auf seine Funktion als Spleißfaktor sein.



**Abb. 4-11 Galectin-3 kolokalisiert mit Speckles.**

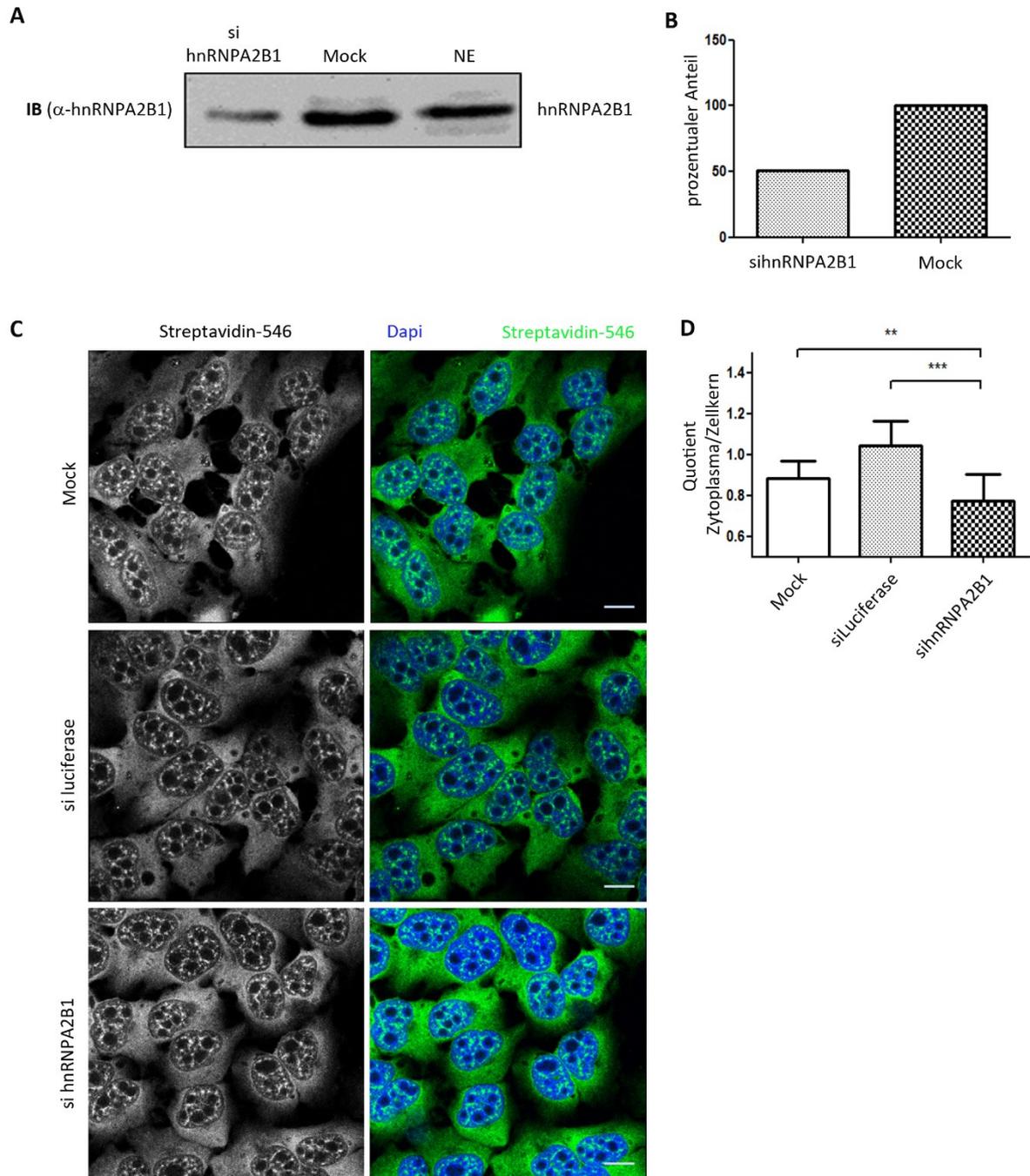
HeLa-Zellen **(A)**, RCC-FG1-Zellen **(B)** und RC124-Zellen **(C)** wurden zunächst für 2 - 3 Tage auf Deckgläschen kultiviert. Anschließend wurden sie fixiert, permeabilisiert und einer Immunfluoreszenz-Markierung mit  $\alpha$ -Galectin-3/Alexa 546 und  $\alpha$ -Sc35/Alexa 647 unterzogen. Die Zellkerne wurden mittels Hoechst 33258 sichtbar gemacht. Das linke Bild zeigt eine Übersichtsaufnahme und die 3 rechten Bilder zeigen Vergrößerungen des gleichen Bildes. Es zeigen sich einige Kolokalisationen im Bereich des Zellkerns, welche mit weißen Pfeilen markiert sind.  $\alpha$ -Galectin-3/Alexa 546 – rot,  $\alpha$ -Sc35/Alexa 647 – grün, Kerne/Hoechst 33258 – blau, Maßstab – 50  $\mu$ m.

### 4.3 Galectin-3/Galectin-1 und hnRNPA2B1 sind an der Prozessierung von mRNA beteiligt

Nukleäres Galectin-3 weist eine Vielzahl von Funktionen auf, eine dieser Funktionen ist seine Notwendigkeit im pre-mRNA Spleißen (Dagher *et al.* 1995) als Spleißfaktor. Das hnRNPA2B1 ist ebenso involviert im mRNA-Spleißen (zusammengefasst in (Martinez-Contreras *et al.* 2007)), aber auch zusätzlich noch im Export der mRNA (Brumwell *et al.* 2002). Um eine Rolle für Galectin-3 in der Prozessierung von mRNA festzustellen, analysierten wir die Verteilung der mRNA nach einer siRNA-vermittelte Verminderung der Galectin-3-Expression.

#### 4.3.1 Die Verminderung von hnRNPA2B1 führt zur Akkumulation von mRNA im Zellkern

Um ein Vergleichsmodell zu besitzen, wurde zunächst die Verteilung der mRNA zwischen Zellkern und Zytoplasma nach der Depletion von hnRNPA2B1 untersucht. HeLa-Zellen wurden am Anfang einer Elektroporation mit siRNA zur Verminderung der Expression von hnRNPA2B1 und als Kontrolle mit Luciferase-siRNA unterzogen. Die Verminderung wurde per Immunoblot untersucht und die Banden wurden quantifiziert. Die Depletion reduzierte die Expressionsrate von hnRNPA2B1 um 50 % (Abb. 4-12 A, B). Zur Ermittlung der Verteilung der mRNA zwischen Zellkern und Zytoplasma erfolgte nach der Depletion eine Fluoreszenz-*In-situ*-Hybridisierung (FISH). Diese diente der Markierung der mRNA mit einer Fluorophor-gekoppelten Oligo-dT-Sonde. Abb. 4-12 C zeigt die Mikroskop-Bilder, hier ist jedoch mit bloßem Auge kein Unterschied wahrnehmbar, daher wurden die Bilder mittels Leica LAS Software analysiert und das Verhältnis zwischen dem nukleären und zytoplasmatischen mRNA-Level wurde quantifiziert. Die Quantifizierung ergibt eine signifikante Veränderung der subzellulären Verteilung der mRNA in Richtung Zellkern (Abb. 4-12 D). Dies führt zu der Schlußfolgerung, dass schon eine um die Hälfte verminderte Depletion von hnRNPA2B1 zu einer Akkumulation von mRNA im Zellkern führt.

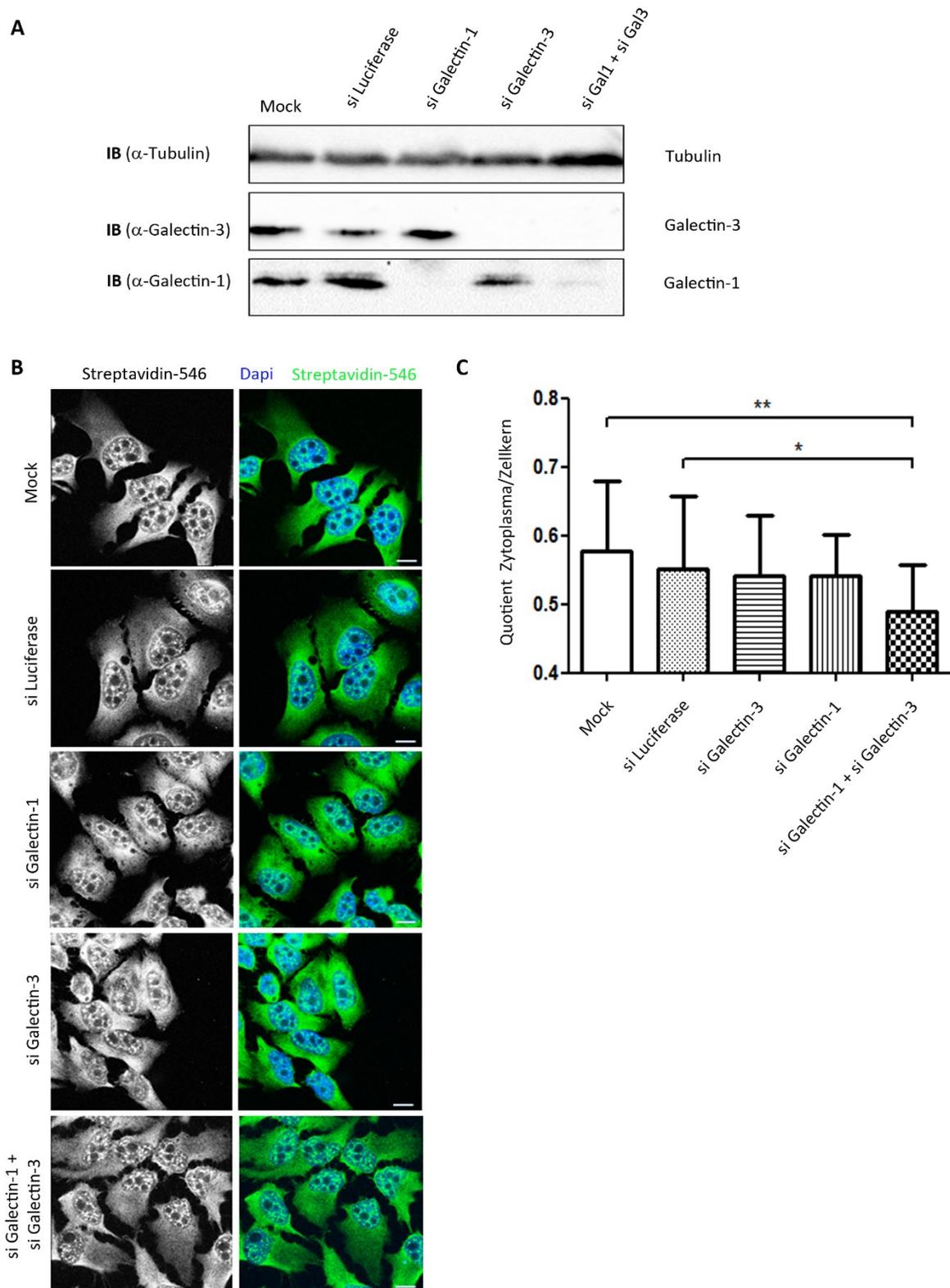


**Abb. 4-12 FISH-Analyse der hnRNP A2B1-depletierten HeLa-Zellen.**

(A) HeLa-Zellen wurden mit siRNA transfiziert, um die Expressionsrate von hnRNP A2B1 zu vermindern. Als Kontrolle diente die nicht depletierende Luciferase siRNA. Die Effizienz der Depletion wurde per Immunoblot (IB) überprüft. NE – nukleärer Extrakt. (B) Die Quantifizierung der Depletionseffizienz anhand der Bandenstärke des Immunblots. (C) Nach der Transfektion wurden die Zellen zunächst fixiert und die mRNA wurde mit Biotin-Oligo-dT/Streptavidin-AlexaFluor 546 markiert. Der Zellkern wurde mit Hoechst 33342 markiert. mRNA – grün, Zellkern – blau, Mock – Wildtyp-Zellen, Maßstab 10 µm. (D) Die Verteilung der Fluoreszenz-markierten mRNA, dargestellt in (C), zwischen Zellkern und Zytoplasma wurde mit Hilfe der Leica LAS Software quantifiziert. Dargestellt ist der Quotient (mit Standardabweichung) aus zytoplasmatischer durch nukleärer Färbung der mRNA.  $n = 3$  (\*\* $p = 0,0014$  und \*\*\* $p < 0,0001$ ).

#### 4.3.2 Der Doppel-*knockdown* von Galectin-1 und Galectin-3 führt zu einer Akkumulation von mRNA im Zellkern

Im nächsten Schritt wurde nach der subzellulären Verteilung der mRNA in Galectin-3-*knockdown* Zellen geschaut. Hierzu wurden zu Beginn die HeLa-Zellen mit siRNA transfiziert, um die Expressionsrate von Galectin-3 stark zu vermindern bzw. ganz zu verhindern. Als Kontrolle diente Luciferase-siRNA. Die Verminderung wurde per Immunoblot untersucht (Abb. 4-13 A) und zeigt deutlich, dass kein Galectin-3 mehr nach der Depletion detektierbar ist und daher kann man von einer effizienten Depletion sprechen. Die Untersuchung der Verteilung der mRNA zwischen Zellkern und Zytoplasma erfolgte mittels Fluoreszenz-*In-situ*-Hybridisierung (FISH). Hierbei wurde die mRNA mit einer Fluorophor-gekoppelten Oligo-dT-Sonde markiert. Die Abb. 4-13 B zeigt die KLSM (konfokale Laser-*scanning* Mikroskop)-Bilder, jedoch ist hier mit bloßem Auge kein Unterschied wahrnehmbar, daher wurde das Verhältnis zwischen dem nukleären und zytoplasmatischen mRNA-Level quantifiziert. Die Quantifizierung ergibt keine signifikante Veränderung der subzellulären Verteilung der mRNA in Galectin-3-*knockdown* Zellen (Abb. 4-13 C). Darauf folgende Recherchen in Bezug auf Galectin-3 im Spleißosom ergaben, dass Galectin-3 und Galectin-1 sich gegenseitig kompensieren können und beide nukleäre Lokalisation zeigen (Vyakaranam *et al.* 1997). Daher kam die Überlegung eine Doppeldepletion zur Verminderung beider Proteine durchzuführen. Der Doppel-*knockdown* von Galectin-3 und Galectin-1 war effizient (Abb. 4-13 A) und zeigt auch eine signifikante Retention der nukleären mRNA (Abb. 4-13 C), während der Einzel-*knockdown* von Galectin-1 auch keine Veränderung in der subzellulären Verteilung der mRNA zeigt. Galectin-1 und Galectin-3 scheinen beide an der mRNA Prozessierung und deren Export beteiligt zu sein, jedoch scheint dies in einer redundanten Art und Weise zu geschehen. Der Versuch macht außerdem deutlich, dass beide Proteine das Fehlen des Anderen kompensieren können.



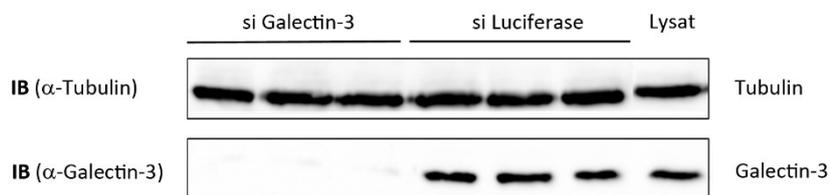
**Abb. 4-13** FISH-Analyse der HeLa-Zellen nach Doppel-*knockdown* von Galectin-1 und Galectin-3.

(Legende siehe folgende Seite)

**(A)** HeLa- wurden mit siRNA transfiziert, um die Expressionsrate von Galectin-3, Galectin-1 sowie beiden Galectinen zu vermindern. Als Kontrolle diente die nicht depletierende Luciferse siRNA. Die Effizienz der Depletion wurde per Immunoblot (IB) überprüft. Mock – Wildtyp-Zelllysate. **(B)** Nach der Transfektion wurden die Zellen zunächst fixiert und die mRNA wurde mit Biotin-Oligo-dT/Streptavidin-AlexaFluor546 markiert. Der Zellkern wurde mit Hoechst 33342 markiert. mRNA – grün, Zellkern – blau, Maßstab 10  $\mu\text{m}$ . **(C)** Die subzelluläre Verteilung der Fluoreszenz-markierten mRNA, dargestellt in (B), wurde mit Hilfe der Leica LAS Software quantifiziert. Dargestellt ist der Quotient (mit Standardabweichung) aus zytoplasmatischer durch nukleärer Färbung der mRNA.  $n = 9$  (\* $p = 0,05$  und \*\* $p = 0,005$ ).

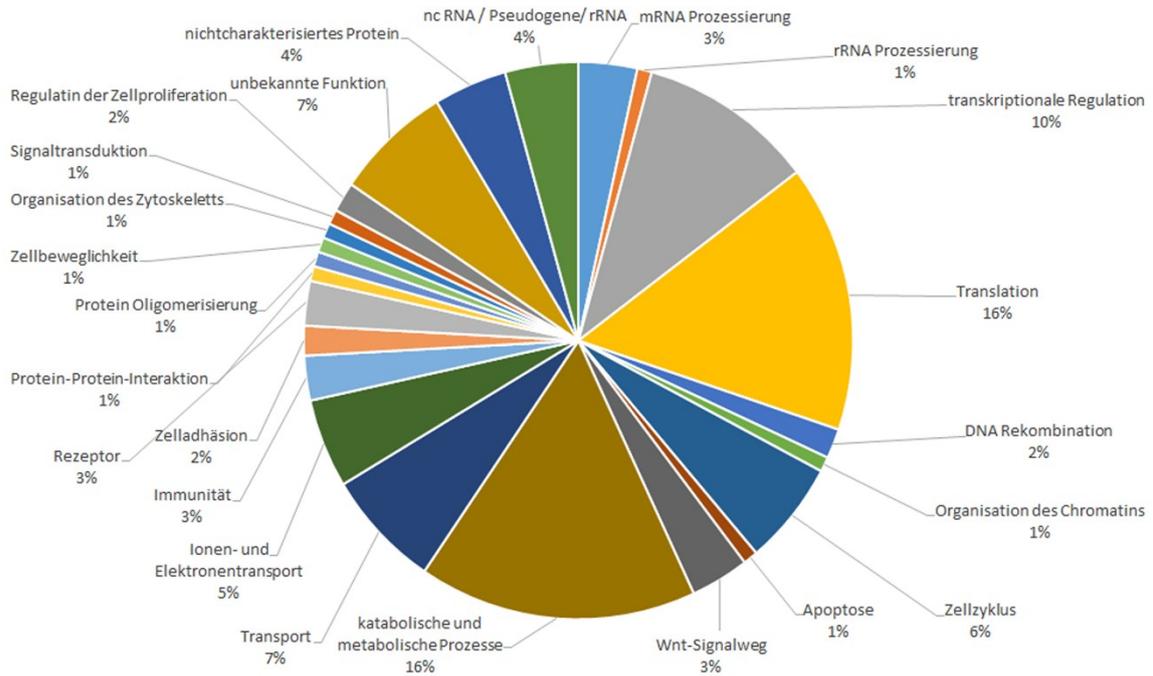
#### 4.4 RNA-Sequenzierung

Die Interaktionen mit einzelnen Spleißkomponenten und bisherige Veröffentlichungen (Dagher *et al.* 1995) zeigen, dass Galectin-3 eine Funktion während des Spleißens von pre-mRNA haben könnte. Um einen genaueren Einblick in dessen Funktion zu erhalten, wurde mRNA sequenziert, welche aus HeLa-Zellen stammte, die eine verminderte Expression von Galectin-3 besaßen und zum Vergleich aus Kontroll-HeLa-Zellen. Die Depletion von Galectin-3 und die Behandlung der Kontrollzellen mit Luciferase siRNA erfolgte per Elektroporation und die Effizienz wurde per Immunoblot überprüft (Abb. 4-14). Die *knockdown*-Effizienz war sehr gut, sodass von einer deutlichen Depletion von Galectin-3 ausgegangen wurde (Abb. 4-14), und die Proben für die mRNA-Sequenzierung verwendet wurden. Sequenziert wurde via *paired-end* Sequenzierung, dies ergab 2 x 50 bp *paired reads* und es wurde damit eine Bibliothek erstellt. Es konnten bei der Analyse keine großen Veränderungen im mRNA-Expressionsbild von Galectin-3-*knockdown* Zellen beobachtet werden. Dennoch wurden für einige Gene statistisch signifikante Veränderungen im Spleißbild gefunden. Hierbei waren vor allem Gene betroffen, die in Transkription- und Translationsregulation, Zellmetabolismus, intrazellulärer Transport oder Zellzyklus-Kontrolle involviert sind (Abb. 4-15 und Tab. 4-2). Aber diese geringe Anzahl an betroffenen Genen weist zusätzlich auf die Kompensation des Fehlens von Galectin-3 durch Galectin-1 hin. Ein deutlicheres Ergebnis würde ein Doppel-*knockdown* von beiden Galectinen zeigen.



**Abb. 4-14 Knockdown-Effizienz nach Galectin-3 Depletion.**

HeLa-Zellen wurden mit siRNA per Elektroporation transfiziert, um die Expressionsrate von Galectin-3 stark zu vermindern. Als Kontrolle diente die nicht depletierende Luciferase siRNA. Die Effizienz der Depletion wurde per Immunoblot (IB) überprüft. Das Zelllysate (Lysat) diente zur Kontrolle der Expression der Proteine.



**Abb. 4-15 Nach Funktionen gruppierte Isoformen beeinflusst durch Galectin-3-knockdown.**

HeLa-Zellen wurden mit Galectin-3-siRNA und Luciferase-siRNA als Kontrolle transfiziert. Die isolierte mRNA wurde sequenziert und Gene, die verschiedene Spleißvarianten, im Vergleich zwischen den Galectin-3-knockdown und Kontroll-Zellen aufwiesen, wurden nach ihren Funktionen gruppiert und im Diagramm dargestellt. Der signifikante Unterschied zwischen den Proben lag bei  $p \leq 0,05$ .

Tab. 4–2 Isoformen beeinflusst durch *knockdown* von Galectin-3.

<i>stable_id</i>	<i>padj</i>	Transkript	Name	Funktion
ENSG0000005893	0,02173585	ENST00000540603	LAMP2	Signaltransduktion
ENSG00000022840	0,0498587	ENST00000537376	RNF10	transkriptionale Regulation
ENSG00000047315	0,03048084	ENST00000381227	POLR2B	transkriptionale Regulation
	0,00960713	ENST00000381227	POLR2B	transkriptionale Regulation
ENSG00000054523	0,0064032	ENST00000497835	KIF1B	Transport
ENSG00000063046	0,01240177	ENST00000550390	EIF4B	Translation
ENSG00000063177	0,00271401	ENST00000550671	RPL18	Translation
	0,00606828	ENST00000550671	RPL18	Translation
ENSG00000070756	0,02128759	ENST00000517990	PABPC1	mRNA Prozessierung
ENSG00000071564	0,00447609	ENST00000586164	TCF3	transkriptionale Regulation
ENSG00000072042	0,01322597	ENST00000557331	RDH11	katabolische und metabolische Prozesse
ENSG00000075624	0,0163336	ENST00000425660	ACTB	Zellbeweglichkeit
ENSG00000078304	0,03281571	ENST00000556493	PPP2R5C	Regulation der Zellproliferation
ENSG00000079841	0,01117241	ENST00000517433	RIMS1	Transport
	0,00830955	ENST00000517433	RIMS1	Transport
	0,01780655	ENST00000517433	RIMS1	Transport
	0,0069257	ENST00000517433	RIMS1	Transport
ENSG00000081181	0,00060702	ENST00000557120	ARG2	katabolische und metabolische Prozesse
ENSG00000087077	0,00189214	ENST00000437505	TRIP6	Zelladhäsion
ENSG00000089157	0,00387036	ENST00000546989	RPLP0	Translation
	0,03040067	ENST00000546989	RPLP0	Translation
	0,01981512	ENST00000546989	RPLP0	Translation
	0,02445019	ENST00000546989	RPLP0	Translation
ENSG00000092853	0,03348098	ENST00000520551	CLSPN	Zellzyklus
ENSG00000096746	4,95E-08	ENST00000354695	HNRNPH3	mRNA Prozessierung
ENSG00000089157	1,48E-05	ENST00000546989	RPLP0	Translation
	2,08E-06	ENST00000546989	RPLP0	Translation
ENSG00000099622	0,01989357	ENST00000590171	CIRBP	Translation
ENSG00000103018	0,0017749	ENST00000512062	CYB5B	Ionen- und Elektro- nentransport
ENSG00000105968	0,00243361	ENST00000381124	H2AFV	transkriptionale Regulation
ENSG00000108788	5,56E-07	ENST00000590050	MLX	transkriptionale Regulation
ENSG00000109475	0,01894095	ENST00000394668	RPL34	Translation
	0,0163336	ENST00000394668	RPL34	Translation
	2,37E-12	ENST00000394668	RPL34	Translation

ENSG00000109685	1,66E-06	ENST00000382895	WHSC1	transkriptionale Regulation
ENSG00000109861	0,04115452	ENST00000529974	CTSC	Immunität
ENSG00000111640	0,0163336	ENST00000229239	GAPDH	Translation
ENSG00000112245	9,37E-05	ENST00000578299	PTP4A1	Zellzyklus
ENSG00000113552	0,04627731	ENST00000504139	GNPDA1	katabolische und metabolische Prozesse
ENSG00000115252	0,03846657	ENST00000358139	PDE1A	katabolische und metabolische Prozesse
ENSG00000117868	0,02291362	ENST00000435514	ESYT2	Transport
ENSG00000113719	0,03999813	ENST00000519796	ERGIC1	Transport
ENSG00000119048	0,02173585	ENST00000511807	UBE2B	Wnt-Signalweg
ENSG00000119335	9,64E-05	ENST00000480217	SET	Zellzyklus
ENSG00000120256	0,04005437	ENST00000463728	LRP11	Rezeptor
ENSG00000120685	0,01117241	ENST00000602899	PROSER1	Protein-Protein-Interaktion
	0,00274453	ENST00000602899	PROSER1	Protein-Protein-Interaktion
ENSG00000123080	0,00030463	ENST00000371761	CDKN2C	Zellzyklus
ENSG00000124243	0,00089011	ENST00000485049	BCAS4	unbekannte Funktion
ENSG00000127540	0,00541498	ENST00000589880	UQCR11	Ionen-und Elektronentransport
ENSG00000129625	0,00319942	ENST00000504247	REEP5	Rezeptor
ENSG00000130558	0,00023207	ENST00000539529	OLFM1	Protein-Oligomerisierung
	0,01884108	ENST00000539529	OLFM1	Protein-Oligomerisierung
ENSG00000130826	0,01622641	ENST00000475966	DKC1	katabolische und metabolische Prozesse
ENSG00000131069	0,04285654	ENST00000480978	ACSS2	katabolische und metabolische Prozesse
ENSG00000131470	0,00153715	ENST00000589505	PSMC3IP	DNA Rekombination
ENSG00000131473	0,04537347	ENST00000590770	ACLY	katabolische und metabolische Prozesse
ENSG00000132199	4,82E-05	ENST00000578647	ENOSF1	katabolische und metabolische Prozesse
ENSG00000132341	0,00014559	ENST00000464211	RAN	Transport
ENSG00000132846	0,00830955	ENST00000505685	ZBED3	Wnt-Signalweg
ENSG00000133112	0,01045759	ENST00000533567	TPT1	Ionen-und Elektronentransport
ENSG00000134748	0,02072701	ENST00000487160	PRPF38A	mRNA Prozessierung
ENSG00000136938	0,00086202	ENST00000486769	ANP32B	Zellzyklus
ENSG00000138035	0,03230769	ENST00000260604	PNPT1	mRNA Prozessierung
ENSG00000138326	0,0163336	ENST00000465692	RPS24	Translation
	0,02699893	ENST00000465692	RPS24	Translation
ENSG00000142089	0,03407771	ENST00000526811	IFITM3	Immunität

ENSG00000142541	0,00197168	ENST00000472481	RPL13A	Translation
	0,04568049	ENST00000472481	RPL13A	Translation
ENSG00000142676	0,04537347	ENST00000482370	RPL11	Translation
ENSG00000143641	0,00711084	ENST00000366672	GALNT2	katabolische und me- tabolische Prozesse
ENSG00000145592	0,04797616	ENST00000504562	RPL37	Translation
	0,03281571	ENST00000504562	RPL37	Translation
ENSG00000145730	0,00098568	ENST00000506260	PAM	katabolische und me- tabolische Prozesse
ENSG00000147687	0,00192782	ENST00000522810	TATDN1	Ionen-und Elektronen- transport
ENSG00000149136	0,02406436	ENST00000526696	SSRP1	transkriptionale Regu- lation
ENSG00000149925	0,00192782	ENST00000562679	ALDOA	katabolische und me- tabolische Prozesse
	0,04446963	ENST00000562679	ALDOA	katabolische und me- tabolische Prozesse
ENSG00000155755	0,00169529	ENST00000286196	TMEM237	Wnt-Signalweg
ENSG00000159131	0,04209808	ENST00000441403	GART	katabolische und me- tabolische Prozesse
ENSG00000160991	0,024743	ENST00000488996	ORAI2	Ionen-und Elektronen- transport
ENSG00000161010	0,01240177	ENST00000520698	C5orf45	unbekannte Funktion
ENSG00000161960	0,03407771	ENST00000581384	EIF4A1	Translation
ENSG00000161970	0,04603954	ENST00000584164	RPL26	Translation
	0,03021406	ENST00000584164	RPL26	Translation
	0,03368222	ENST00000584164	RPL26	Translation
	0,02927271	ENST00000584164	RPL26	Translation
ENSG00000163291	0,03394755	ENST00000512299	PAQR3	Rezeptor
ENSG00000163597	2,65E-07	ENST00000493536	SNHG16	nc RNA
ENSG00000163946	0,03394755	ENST00000478052	FAM208A	unbekannte Funktion
ENSG00000164032	0,0230666	ENST00000529158	H2AFZ	transkriptionale Regu- lation
ENSG00000164855	0,00456324	ENST00000449955	TMEM184A	unbekannte Funktion
ENSG00000165609	0,03342627	ENST00000378927	NUDT5	katabolische und me- tabolische Prozesse
ENSG00000166130	0,01488349	ENST00000420861	IKBIP	Apoptose
ENSG00000166164	0,0019218	ENST00000475877	BRD7	Zellzyklus
ENSG00000166441	0,00086202	ENST00000314138	RPL27A	Translation
	0,03092736	ENST00000314138	RPL27A	Translation
ENSG00000166741	0,00023309	ENST00000542647	NNMT	katabolische und me- tabolische Prozesse
ENSG00000167526	0,02173585	ENST00000472354	RPL13	Translation
	0,00189436	ENST00000472354	RPL13	Translation
	0,00024114	ENST00000472354	RPL13	Translation
ENSG00000167552	0,01780655	ENST00000295766	TUBA1A	Transport

	0,00619385	ENST00000295766	TUBA1A	Transport
ENSG00000168542	0,01462764	ENST00000467886	COL3A1	Ionen-und Elektronen-transport
ENSG00000168610	0,04561908	ENST00000588065	STAT3	transkriptionale Regulation
ENSG00000169851	0,03758912	ENST00000361762	PCDH7	Zelladhäsion
ENSG00000169955	1,48E-05	ENST00000252799	ZNF747	transkriptionale Regulation
ENSG00000173442	0,01061915	ENST00000533237	EHBP1L1	unbekannte Funktion
ENSG00000173786	0,00086202	ENST00000393888	CNP	katabolische und metabolische Prozesse
ENSG00000175061	0,03048084	ENST00000580180	C17orf76-AS1	nc RNA
ENSG00000177954	0,00016062	ENST00000392558	RPS27	Translation
ENSG00000182054	0,03348098	ENST00000559482	IDH2	katabolische und metabolische Prozesse
ENSG00000182372	0,00197168	ENST00000524258	CLN8	katabolische und metabolische Prozesse
ENSG00000184014	0,01240177	ENST00000529977	DENND5A	Transport
ENSG00000187109	0,00185846	ENST00000552147	NAP1L1	Regulation der Zellproliferation
	0,01117241	ENST00000552147	NAP1L1	Regulation der Zellproliferation
ENSG00000187260	0,03394755	ENST00000334493	WDR86	unbekannte Funktion
ENSG00000187514	1,48E-05	ENST00000341369	PTMA	transkriptionale Regulation
ENSG00000188343	0,00084753	ENST00000522803	FAM92A1	unbekannte Funktion
ENSG00000188846	0,03348098	ENST00000416518	RPL14	Translation
	0,04754824	ENST00000416518	RPL14	Translation
ENSG00000188895	0,04115452	ENST00000581246	MSL1	Organisation des Chromatins
ENSG00000189306	0,00711084	ENST00000483303	RRP7A	rRNA Prozessierung
ENSG00000196428	0,03696615	ENST00000480589	TSC22D2	transkriptionale Regulation
ENSG00000197111	0,04710537	ENST00000548933	PCBP2	Immunität
	0,00959888	ENST00000548933	PCBP2	Immunität
ENSG00000198755	0,01117241	ENST00000464112	RPL10A	Translation
ENSG00000205542	0,00218405	ENST00000380636	TMSB4X	Organisation des Zytoskeletts
	0,04539845	ENST00000380636	TMSB4X	Organisation des Zytoskeletts
ENSG00000211448	0,00551967	ENST00000553594	DIO2	katabolische und metabolische Prozesse
ENSG00000211460	0,04115452	ENST00000536142	TSN	DNA Rekombination
ENSG00000213923	0,00020474	ENST00000451964	CSNK1E	Wnt-Signalweg
	0,0230666	ENST00000451964	CSNK1E	Wnt-Signalweg
	0,00456324	ENST00000451964	CSNK1E	Wnt-Signalweg

ENSG00000214182	0,04115452	ENST00000607242	PTMAP5	Pseudogen
ENSG00000221983	0,00052147	ENST00000595683	UBA52	Translation
ENSG00000242259	0,03048084	ENST00000509549	C22orf39	unbekannte Funktion
ENSG00000245532	0,00122219	ENST00000601801	NEAT1	nc RNA
ENSG00000250232	0,01989357	ENST00000376358	AF196779.12	nichtcharakterisiertes Protein
ENSG00000258891	0,04568049	ENST00000555916	RP5-1021120.5	Nichtcharakterisiertes Protein
ENSG00000258964	0,04603954	ENST00000555937	RP11-618G20.1	Nichtcharakterisiertes Protein
ENSG00000260916	0,01583578	ENST00000569205	CCPG1	Zellzyklus
ENSG00000261459	0,03345417	ENST00000569360	ZNF747	
ENSG00000263809	0,03281571	ENST00000582471	RP11-849F2.7	Nichtcharakterisiertes Protein
ENSG00000265500	0,0230666	ENST00000579777	SEN3-EIF4A1	nc RNA
	0,04590137	ENST00000579777	SEN3-EIF4A1	nc RNA
	0,01117241	ENST00000579777	SEN3-EIF4A1	nc RNA
	0,0185882	ENST00000579777	SEN3-EIF4A1	nc RNA
ENSG00000266658	0,00029035	ENST00000579027	RNA28S5	rRNA
ENSG00000268083	0,03646614	ENST00000594769	AC104534.3	Nichtcharakterisiertes Protein
	0,02817458	ENST00000594769	AC104534.3	Nichtcharakterisiertes Protein
ENSG00000268173	0,00154597	ENST00000593731	PIK3R2	Transport
	0,00897405	ENST00000593731	PIK3R2	Transport
	0,03457181	ENST00000593731	PIK3R2	Transport
	0,00154597	ENST00000593731	PIK3R2	Transport
	5,91E-06	ENST00000593731	PIK3R2	Transport
	1,48E-05	ENST00000593731	PIK3R2	Transport
	0,00041371	ENST00000593731	PIK3R2	Transport
	2,45E-05	ENST00000593731	PIK3R2	Transport
	0,01932015	ENST00000593731	PIK3R2	Transport
ENSG00000270800	0,04627731	ENST00000605528	RPS10-NUDT3	Katabolische und metabolische Prozesse

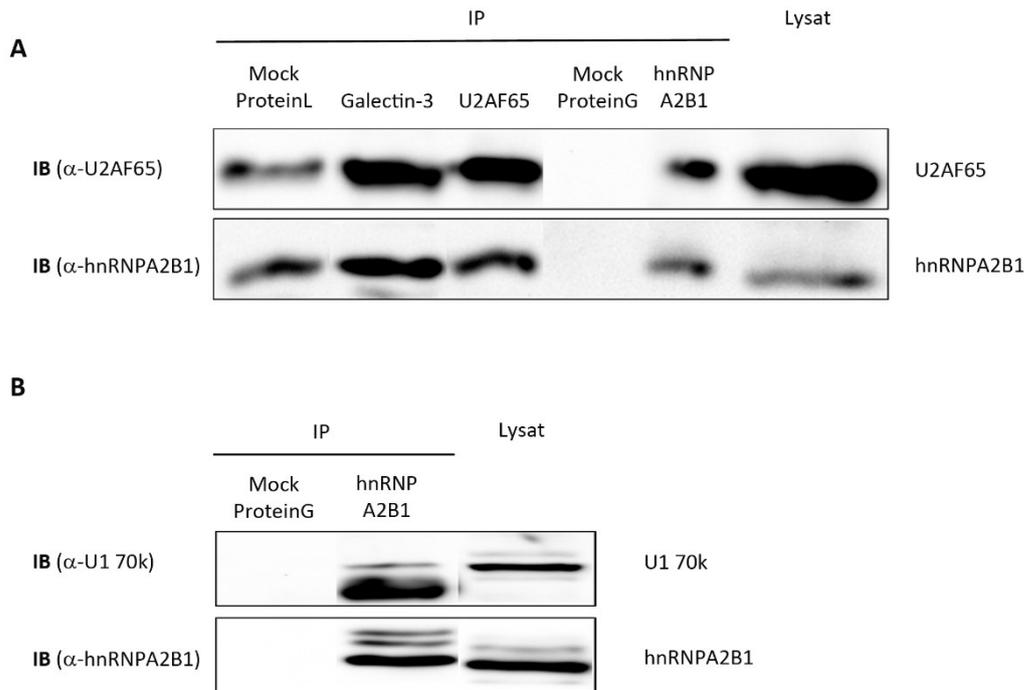
## 4.5 Die Analyse der Bindung der Galectin-3-Interaktionspartner untereinander

### 4.5.1 hnRNPA2B1 präzipitiert gemeinsam mit U2AF65 und U1 70k

Das hnRNPA2B1, U2AF65 und U1 70k sind Spleißkomponenten, die mit Galectin-3 interagieren. Daher stellt sich die Frage, wie stehen die drei Proteine untereinander in Verbindung. Zur Klärung der Frage wurde nukleärer Extrakt aus HeLa-Zellen einer Immunpräzipitation mit verschiedenen Antikörpern unterzogen. Die co-präzipitierten Proteine wurden auf einem SDS-PAGE separiert und für die Analyse auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. In der ersten Immunpräzipitation wurde mit einem  $\alpha$ -Galectin-3 Antikörper, einem  $\alpha$ -U2AF65 Antikörper und einem  $\alpha$ -hnRNPA2B1 Antikörper immunpräzipitiert (Abb. 4-16 A). Als Ergebnis zeigte sich, dass obwohl U2AF65 und hnRNPA2B1 auch unspezifische Bindungen an die Protein L-Agarose-*Beads* aufweisen, sie trotzdem deutliche Banden in den immunpräzipitierten Proben zeigen (Abb. 4-16 A). Daher scheint es, als würden auch U2AF65 und hnRNPA2B1 interagieren.

Die gleiche Untersuchung erfolgte für das hnRNPA2B1 und dem U1 70k. Hierbei wurde mit einem  $\alpha$ -hnRNPA2B1 Antikörper und Dynabeads® Protein G immunpräzipitiert. Die Analyse des Immunoblots zeigt eine deutliche Bande für U1 70k in der IP-Probe (Abb. 4-16 B) und daher scheint auch das U1 70k mit hnRNPA2B1 zu interagieren.

Die Untersuchungen in Bezug auf die Interaktionen der einzelnen Spleißkomponenten ergeben, dass hnRNPA2B1 mit U2AF65 und U1 70k interagiert und alle drei Proteine interagieren mit Galectin-3. Jedoch besteht auch die Möglichkeit, dass die Proteine über die Interaktion mit Galectin-3 untereinander co-präzipitieren.



**Abb. 4-16 hnRNPA2B1 interagiert mit U2AF65 und U1 70k.**

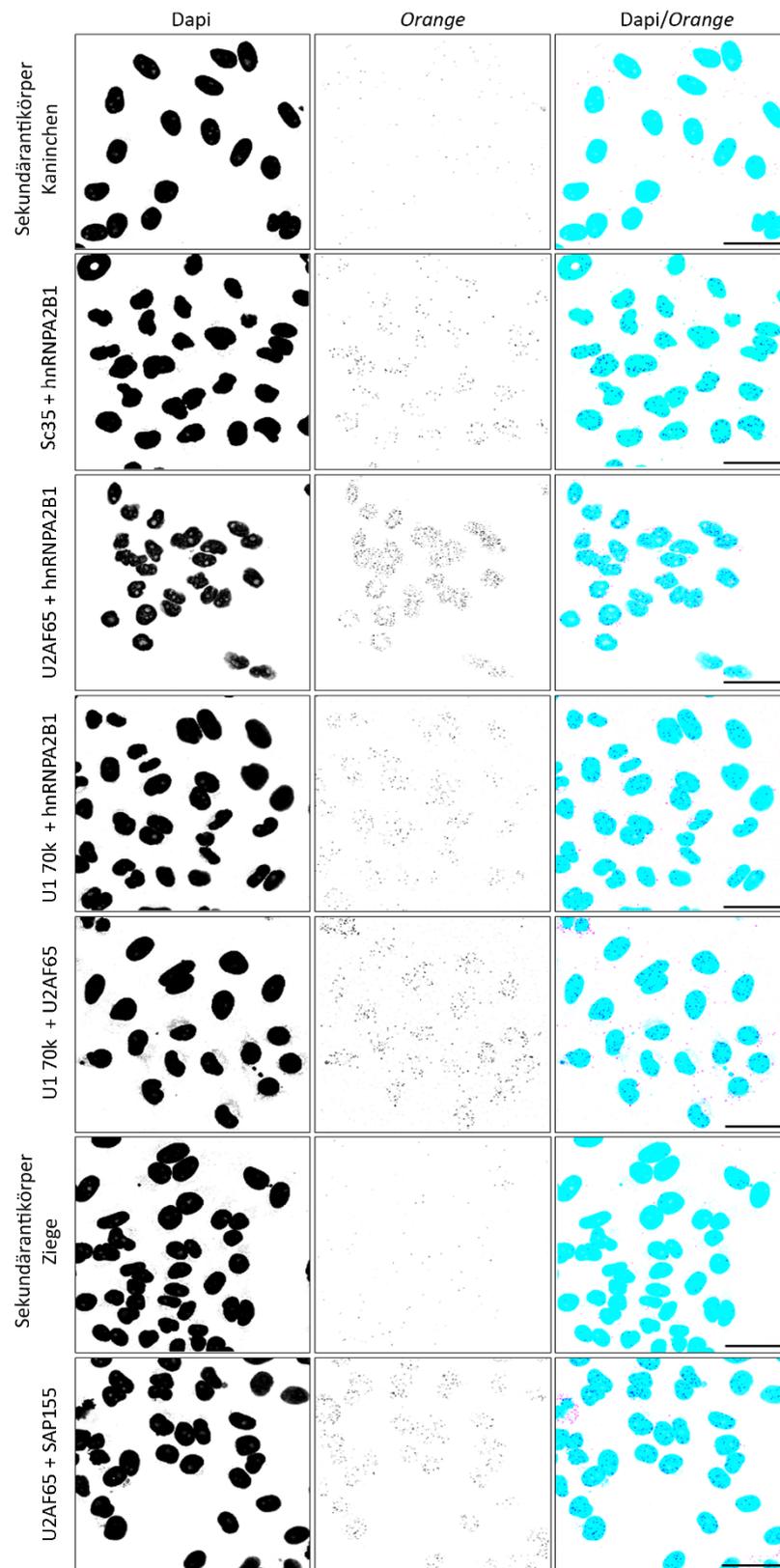
**(A)** Die Immunpräzipitation erfolgte mit α-Galectin-3 Antikörper, α-U2AF65 Antikörper und α-hnRNPA2B1 Antikörper zusammen mit nukleärem Extrakt aus HeLa-Zellen und Protein L-Agarose-*Beads* sowie Dynabeads® Protein G. Die Proben wurden mittels Western Blot und Antikörpern gegen U2AF65 und hnRNPA2B1 (IB) analysiert. In der Negativkontrolle (Mock) wurde der Antikörper bei der Immunpräzipitation weggelassen. Das Probenlysat diente der Kontrolle der Expression der zu untersuchenden Proteine (Lysat). IP – Immunpräzipitation, Protein L – Protein L-Agarose-*Beads*, Protein G – Dynabeads® Protein G. **(B)** Die Immunpräzipitation erfolgte mit α-hnRNPA2B1 Antikörper und nukleärem Extrakt aus HeLa-Zellen zusammen mit Dynabeads® Protein G. Für die Analyse wurde der Immunoblot mit Antikörpern gegen hnRNPA2B1 und U1 70k inkubiert. In der Negativkontrolle (Mock) wurde der Antikörper bei der Immunpräzipitation weggelassen. Das Probenlysat diente der Kontrolle der Expression der zu untersuchenden Proteine (Lysat).

#### **4.5.2 Die untersuchten Spleißkomponenten befinden sich in einem Maximalabstand von 40 nm zueinander**

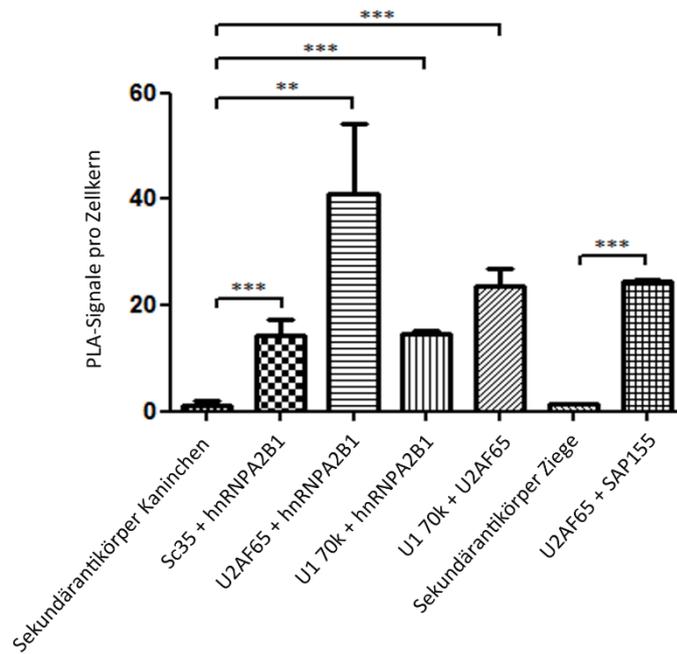
Auf die Frage der Interaktionen untereinander folgte die Frage der Anordnung der Proteine. Hierzu wurde der *Proximity Ligation Assay* verwendet. Zunächst wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen U2AF65 und hnRNPA2B1, U1 70k und hnRNPA2B1, U1 70k und U2AF65, gefolgt vom PLA. In Bezug auf die Interaktion SAP155 + U2AF65 wurden die Ergebnisse aus 4.2.4 (Abb. 4-9) verwendet. Die Positivkontrolle (Sc35 + hnRNPA2B1) zeigt viele Signale im Zellkern und die Negativkontrollen (Sekundärantikörper Kaninchen + Sekundärantikörper Ziege) zeigen nur minimale Signale, die vernachlässigbar sind (Abb. 4-17 A). Alle 4 Proben zeigen deutliche Signale im Zellkern (Abb. 4-17 B). Somit ergibt sich, dass U2AF65 und hnRNPA2B1, U1 70k und hnRNPA2B1, U1 70k und U2AF65 sowie U2AF65 und SAP155 in einem Maximalabstand von 40 nm voneinander entfernt vorliegen. Da jedoch die Versuche, außer bei U2AF65 + hnRNPA2B1, nur zweimal durchgeführt wurden, müssten die Daten in weiteren Experimenten verifiziert werden.

Zusammenfassend lässt sich vermuten, dass hnRNPA2B1 mit U2AF65 und U1 70k interagiert und dass diese Proteine sich in einem Abstand von maximal 40 nm befinden. Ebenso ist bekannt, dass U2AF65 und SAP155 miteinander interagieren (Gozani *et al.* 1998) und diese Interaktion scheint sich in einem Maximalabstand von 40 nm abzuspielen.

A



B



**Abb. 4-17 Die Spleißkomponenten U2AF65, U1 70k, hnRNP A2B1 und SAP155 befinden sich maximal 40 nm voneinander entfernt.**

**(A)** Für 2 - 3 Tage auf Deckgläschen kultivierte HeLa-Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und mit Primärantikörpern gegen U2AF65 und hnRNP A2B1, U1 70k und hnRNP A2B1, U1 70k und U2AF65 inkubiert. Daraufhin erfolgte der *Proximity Ligation Assay*. Für die Negativkontrolle wurden die HeLa-Zellen nur mit den Sekundärantikörpern Maus + Kaninchen inkubiert und als Positivkontrolle dienten Antikörper gegen Sc35 und hnRNP A2B1. Die Interaktion zwischen SAP155 und U2AF65 stammt aus dem Versuch beschrieben in 4.2.4. Die Interaktionen sind als PLA-Signale (schwarze Punkte) sichtbar und sind das Resultat der Nähe ( $\leq 40$  nm) der Oligonukleotid-gekoppelten Sekundärantikörper. Orange – Fluorophor, Zellkerne – DAPI, Maßstab – 10  $\mu$ m. **(B)** Für die statistische Analyse wurden die PLA-Signale quantifiziert und in einem Diagramm dargestellt. Das Diagramm zeigt die PLA-Signale pro Zellkern +/- Standardabweichung, (\*\* $p = 0,0016$  und \*\*\* $p \leq 0,0001$ ).

## 5 Diskussion

### 5.1 Galectin-3 interagiert mit Komponenten des Spleißosoms

Durch frühere Arbeiten ist bekannt, dass Galectin-3 vermehrt im Zellkern verschiedener Zelllinien zu finden ist (Gaudin *et al.* 2000; Moutsatsos *et al.* 1987; Openo *et al.* 2000). In weiteren Versuchen konnten auch schon einige Interaktionspartner von nukleärem Galectin-3 identifiziert werden, dazu zählen unter anderem der Transkriptionsfaktor TTF-1 (Paron *et al.* 2003) und über die direkte Bindung an  $\beta$ -Catenin der Transkriptionsfaktor Tcf-4 (Shimura *et al.* 2004). Neben der Funktion der Regulation der Genexpression (Nakahara und Raz 2007), wurde Galectin-3 auch eine Rolle im Spleißen von pre-mRNA zugeschrieben (Dagher *et al.* 1995) und Depletionsstudien zeigten, dass durch ein Fehlen von Galectin-3 der Zusammenbau des Spleißosoms im H/E-Komplex arretiert (Dagher *et al.* 1995; Vyakarnam *et al.* 1997). Zwar konnten Haudek *et al.* zeigen, dass Galectin-3 mit dem U1 snRNP Protein U1 70k interagiert (Haudek *et al.* 2009), aber bisher sind noch keine weiteren Spleißosomkomponenten als Interaktionspartner von Galectin-3 identifiziert wurden. Diese Arbeit diente zur Identifikation von neuen Interaktionspartnern von nukleärem Galectin-3, welche sich als Komponenten des Spleißosoms herausstellten und somit die Inkorporation von Galectin-3 im Spleißen der pre-mRNA näher beleuchteten.

#### 5.1.1 Galectin-3 kolokalisiert mit dem Speckles-Marker Sc35 und ist selbst eine Komponente des Spleißosoms

Bezüglich der Tatsache, dass Galectin-3 eine Komponente des Spleißosoms ist, wurde dies auch in den für die Arbeit verwendeten Zelllinien nochmals überprüft. Hierzu wurden Kolokalisationsstudien mit dem Speckles-Marker Sc35 in HeLa-Zellen sowie in den Nierenepithelzellen RC124 und RCC FG1 durchgeführt. Die Speckles stehen für eine Anreicherung von pre-mRNA Spleißfaktoren im Zellkern und werden auch als Sc35-Domänen bezeichnet, da der Serin/Arginin-reiche Spleißfaktor Sc35 immer vorhanden ist (zusammengefasst in (Spector 1993); (Fu und Maniatis 1990)). Die Aufnahmen dieser Kolokalisationsstudien zeigten mehrere Übereinstimmungen von Sc35 mit Galectin-3 im Zellkern aller drei verwendeten Zelllinien (Abb. 4-11). So scheint es, dass Galectin-3, unabhängig vom Zelltyp, eine Komponente des Spleißosoms ist.

#### 5.1.2 Galectin-3 interagiert mit hnRNPA2B1 im Zellkern

Fasst man alle Ergebnisse zusammen (Abb. 4-1, 4-2, 4-3, 4-5 und Tab. 4-1), kann man sagen, dass Galectin-3 mit hnRNPA2B1 interagiert. Diese Interaktion ist gekennzeichnet durch ihre Laktose-Abhängigkeit und ihre RNA-Unabhängigkeit, außerdem scheint die Interaktion auf den Zellkern begrenzt zu sein. Offen ist ob es sich um eine direkte oder indirekte Bindung handelt. Da die Bindung über die

Glykosylierung von hnRNPA2B1 ausgeschlossen werden konnte (Abb. 4-4), besteht auch noch die Möglichkeit einer Protein-Protein-Interaktion. Beide Proteine sind in der Lage Protein-Protein-Interaktionen einzugehen (zusammengefasst in (Dreyfuss *et al.* 2002; Dunic *et al.* 2006); (He und Smith 2009)). Im Fall von Galectin-3 könnte die Laktose den Bindepartner verdrängen, da hier die Affinität zum Saccharid höher ist, oder durch die Bindung mit dem Saccharid käme es zu einer Konformationsänderung, was zum Lösen des Bindepartners führt (Barondes *et al.* 1994 b; Seetharaman *et al.* 1998). Dies erklärt die Laktose-Abhängigkeit der Interaktion, gibt aber keinen Hinweis auf eine direkte oder indirekte Bindung, da der Bindepartner zwischen beiden Proteinen ebenfalls Laktose-abhängig binden kann.

Die hnRNP A/B Proteine bilden zusammen mit den hnRNP C1 und C2 den Kern der HeLa 40S Ribonukleoprotein Partikel. Diese Partikel lagern sich direkt an das freiwerdende Transkript der Polymerase II an. Sie stabilisieren dadurch die pre-mRNA und schützen sie vor vorzeitiger Degradation. Direkt um die pre-mRNA lagern sich die hnRNP Proteine A2, B1 und B2 an. Diese bilden entweder Tetramere oder Pentamere. Peripher davon gelegen sind die hnRNP Proteine A1, C1 und C2 (Beyer *et al.* 1977; Lothstein *et al.* 1985; Pullman und Martin 1983; Wilk *et al.* 1983). Bezüglich einer direkten Bindung zwischen Galectin-3 und dem hnRNPA2B1 ist die Möglichkeit aufgrund von sterischen Beschaffenheiten eher gering, da hnRNPA2B1 sich im Inneren der Ribonukleoprotein Partikel befindet. Aufgrund der Nähe beider Proteine von bis zu 40 nm zueinander, ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass sich ein anderes Ribonukleoprotein dazwischen befindet, wie zum Beispiel das hnRNPA1 (Tab 4-1). Da das hnRNPA1 sich peripher an die internen hnRNP Proteine anlagert, könnte es die Verbindung zwischen Galectin-3 und hnRNPA2B1 sein. Und dies unterstützt auch die RNA-Unabhängigkeit der Interaktion und weist auf eine Protein-Protein-Interaktion hin. Ein zweiter Hinweis, dass sich Galectin-3 an die hnRNP Ribonukleoprotein Partikel anlagert, lieferten frühere Untersuchungen, in denen sich zeigte, dass sich Galectin-3 nach einer Dichtegradientenzentrifugation im gleichen Dichtebereich wie hnRNP Partikel und snRNPs ansiedelt. Hierbei konnte jedoch nicht gezeigt werden, ob eine Interaktion zu den Partikeln besteht (zusammengefasst in (Wang *et al.* 2004); (Laing und Wang 1988)). Die Ergebnisse dieser Arbeit geben einen guten Hinweis auf die Interaktion von Galectin-3 in den hnRNP Partikeln und weisen auf die potentiellen Bindepartner von Galectin-3 in diesen Komplexen hin. Nähere Untersuchungen bezüglich des direkten Bindepartners in den hnRNP Partikeln wären der nächste Schritt und könnten möglicherweise auch einen Hinweis liefern, inwiefern Galectin-3 funktionell zu diesen Partikeln steht.

Neben der Funktion von hnRNPA2B1 im Zellkern, konnte für das Protein auch nachgewiesen werden, dass es für den Transport von miRNA in Exosomen zuständig ist (Villarroya-Beltri *et al.* 2013). Galectin-3 könnte hnRNPA2B1 auf seinen Weg vom Zellkern zu den Exosomen stabilisieren, indem es einen

Komplex mit dem Protein bildet. In Verbindung mit dem hnRNPQ konnte solch eine Funktion von Galectin-3 bereits nachgewiesen werden. Die Ergebnisse von Yoo et al. zeigten, dass das hnRNPQ im Komplex mit dem Galectin-3 stabilisiert wird und somit Einfluss auf das Protein hat (Yoo *et al.* 2009). Daher könnte auch eine Komplexformation zwischen hnRNP2B1 und Galectin-3 im Export von miRNA möglich sein. Hierzu müsste zunächst die Interaktion beider Proteine im Zytoplasma und auch in den Exosomen nachgewiesen werden. Würde sich hier eine Interaktion zeigen, könnten Folgeexperimente Aufschluss über die Wahl der miRNA geben und somit zur Funktion von Galectin-3 in diesem Schritt führen.

Da hnRNP2B1 eine wichtige Komponente des alternativen Spleißens ist (zusammengefasst in (He und Smith 2009)), besteht die Möglichkeit der Interaktion zwischen Galectin-3 und hnRNP2B1 im alternativen Spleißen bestimmter Gene. Dieser Punkt wird im Abschnitt 5.4 näher beleuchtet.

Es gibt viele Hypothesen in Bezug auf die Interaktion zwischen Galectin-3 und hnRNP2B1, bisher konnte nur sicher dargelegt werden, dass eine Interaktion im Zellkern verschiedener Zelltypen besteht und diese Interaktion sich in einer Entfernung von maximal 40 nm befindet. Aufbauend auf dieser Grundlage, sollte die Interaktion näher beleuchtet werden und könnte somit zur Identifizierung einer neuen Funktion von Galectin-3 im Zellkern führen.

### 5.1.3 Galectin-3 interagiert mit U2AF65, aber nicht mit dessen direkten Bindepartnern

Mit Hilfe der Affinitätschromatographie konnten weitere Interaktionspartner von Galectin-3 im Zellkern identifiziert werden (Abb. 4-5 und Tab. 4-1). Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen auf eine laktoseabhängige Interaktion zwischen Galectin-3 und U2AF65 im Zellkern hin. Diese Interaktion könnte aufgrund der Nähe von maximal 40 nm auch eine direkte Bindung sein, aber dies gilt es noch zu untersuchen.

U2AF65 bindet im E-Komplex die Initiierungssequenz des Polypyrimidintraktes und ist daher ein essentieller Initiator des pre-mRNA Spleißens (Zamore *et al.* 1992). Die Interaktion mit Galectin-3 könnte auf eine wichtige Funktion von Galectin-3 während des Zusammenbaus des Spleißosoms hinweisen und unterstützt die Ergebnisse, dass eine Depletion von Galectin-3 zum Arrest des Spleißosoms-Zusammenbaus im H/E-Komplex führt (Dagher *et al.* 1995; Vyakarnam *et al.* 1997). Die Interaktion zwischen Galectin-3 und U2AF65 könnte aber auch im alternativen Spleißen stattfinden. Dieser Punkt wird im Abschnitt 5.4 näher beleuchtet.

U2AF65 gehört zusammen mit U2AF35 zu dem Heterodimer U2AF (Ruskin *et al.* 1988; Zamore und Green 1989). Daher lag die Vermutung nahe, dass Galectin-3 auch mit U2AF35 interagiert. Ein weiteres mögliches Indiz für diese Interaktion lieferte die Affinitätschromatographie (Abb. 4-5 und Tab. 4-1), hier wurde das U2AF35 im Eluat nach Elution mit Laktose nachgewiesen (Abb. 4-5 und Tab 4-1). Aber

der *Proximity Ligation Assay* zeigte hingegen keine positiven Signale. Daher scheinen sich beide Proteine weiter als 40 nm entfernt voneinander zu befinden (Abb. 4-8). Jedoch wurde der PLA bisher nur einmal durchgeführt und außerdem fehlen weitere Untersuchungen zur Interaktion zwischen U2AF35 und Galectin-3, wie zum Beispiel eine Immunpräzipitation. Die Detektion von U2AF35 im Eluat der Affinitätschromatographie könnte auch aufgrund der Bindung an das U2AF65 erfolgt sein und liefert keinen Beweis für eine Interaktion mit Galectin-3. Aber bisher scheint es möglich zu sein, dass Galectin-3 zwar mit der größeren Untereinheit des U2AF, aber nicht mit der kleineren Untereinheit U2AF35, interagiert. Dies könnte ein Hinweis auf die Lage bzw. seine mögliche Funktion im alternativen Spleißen sein. Auch andere Proteine weisen dieses Bindungsverhalten auf. So interagiert der Spleißfaktor PUF60 ebenfalls nur mit U2AF65, aber nicht mit U2AF35 (Page-McCaw *et al.* 1999).

Ein weiterer Interaktionspartner von U2AF65 ist das SAP155 bzw. SF3b155 (Gozani *et al.* 1998). Das SAP155 gehört zur aktiven 17 S U2 snRNP und ist ein Protein der SF3b-Untereinheit (zusammengefasst in (Hodges und Beggs 1994); (Brosi *et al.* 1993 a, b)). Zusammen mit dem U2AF65 stabilisiert es die Basenpaarung zwischen der Verzweigungssequenz (BS) und der U2 snRNA (Fleckner *et al.* 1997; Shen und Green 2004; Valcárcel *et al.* 1996). Auch hier wurde eine mögliche Interaktion mit dem Galectin-3 vermutet, jedoch zeigte der *Proximity Ligation Assay*, dass beide Proteine weiter als 40 nm voneinander entfernt sind (Abb. 4-9). Dieser Assay wurde jedoch nur einmal durchgeführt. Wohingegen das SAP155 auch im Eluat der Affinitätschromatographie zu finden war (Abb. 4-5 und Tab 4-1), aber auch hier ist die Möglichkeit groß, dass dies nur aufgrund der Bindung an das U2AF65 detektiert wurde. Um hier genauere Aussagen treffen zu können, müssen noch einige Versuche bezüglich der Interaktionen folgen.

Bisher scheint es, dass Galectin-3 nicht direkt mit SAP155 und U2AF35 interagiert, da die Proteine weiter als 40 nm von Galectin-3 entfernt sind. Eine indirekte Interaktion zwischen den Proteinen scheint hier wahrscheinlicher zu sein, wobei das U2AF65 der direkte Interaktionspartner zu U2AF35 und SAP155 ist, und möglicherweise auch zu Galectin-3. Jedoch ist bisher unklar wann eine solche Interaktion stattfindet. Zwei Hypothesen hierzu sind vorhanden, zum einen könnte Galectin-3 eine Komponente für den Zusammenbau des Spleißosoms sein und somit seine Funktion im H/E-Komplex ausüben. Aber zum anderen könnte die Interaktion auch im alternativen Spleißen erfolgen und dort über die Interaktion mit hnRNPA2B1 ihren funktionellen Einfluss zeigen. Aufgrund dieser Vermutungen sollte die Interaktion zwischen U2AF65 und Galectin-3 näher beleuchtet werden und mit Hilfe von Folgeexperimenten, wie zum Beispiel eine direkte Interaktionsstudien mit rekombinanten Proteinen, näher charakterisiert werden, um auch auf diesem Weg einen Hinweis über die Funktion von Galectin-3 zu erlangen.

#### 5.1.4 Galectin-3 interagiert mit U1 70k

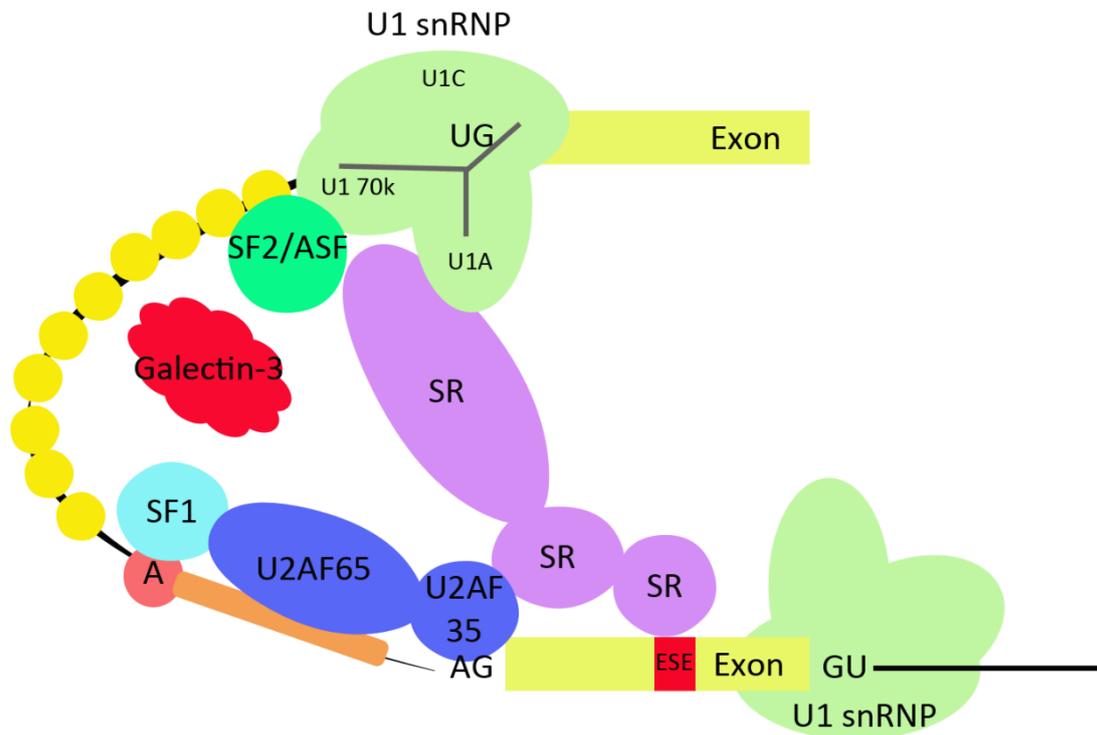
Die 5' Spleißseite ist eine Initiierungssequenz welche durch die U1 snRNA erkannt und gebunden wird. Die U1 snRNA wird dabei im Komplex als U1 snRNP durch U1 spezifische Proteine unterstützt und stabilisiert. Eines dieser Proteine ist das U1 70k (zusammengefasst in (Will und Lührmann 2011)). Die Beobachtungen von Haudek *et al.*, dass U1 70k mit Galectin-3 interagiert (Haudek *et al.* 2009), konnten im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. Die Ergebnisse weisen auf eine Interaktion beider Proteine im Zellkern hin und zeigen, dass diese Interaktion sich in einem Abstand von maximal 40 nm befindet. Ob diese Interaktion sich auf den Zellkern beschränkt oder auch im Zytoplasma zu finden ist, muss noch untersucht werden, weiterhin fehlt die Aussage, ob es sich dabei um eine direkte oder indirekte Interaktion handelt. Wie auch die Interaktionen von Galectin-3 mit hnRNPA2B1 und U2AF65 könnte diese Interaktion während des Zusammenbaus des Spleißosoms stattfinden. Aber auch hier besteht die Möglichkeit, dass Galectin-3 während des alternativen Spleißens Einfluss auf U1 70k nimmt. Bezüglich des U1 70k besteht hier noch eine dritte Vermutung, die auch schon Haudek *et al.* in Betracht gezogen hatten (Haudek *et al.* 2009). Galectin-3 könnte über die Bindung zu U1 70k am Zusammenbau der U1 snRNP im Zytoplasma beteiligt sein und so seinen Weg zum Spleißosom finden. Auf diese Spekulation wird im Abschnitt 5.1.5 noch einmal näher eingegangen.

#### 5.1.5 Galectin-3 im E/A-Komplex des Spleißosoms

Der Spleißvorgang der pre-mRNA beginnt mit dem Zusammenbau des Spleißosoms um die pre-mRNA. Sobald die pre-mRNA aus der Transkriptionsmaschinerie frei wird, lagern sich die hnRNP Proteine um die mRNA und bilden den H-Komplex (Das *et al.* 2000). Der nächste Schritt ist die Erkennung und Bindung der Initiierungssequenzen. Die Nukleotide der 5' Spleißseite werden über Basenpaarung von der U1 snRNP gebunden (Abb. 5-1 und 5-2), während die Verzweigungsstelle mit dem Adenosin (BS), der Polypyrimidintrakt und die Dinukleotide der 3' Spleißseite durch den Proteinkomplex, bestehend aus SF1/BBP, U2AF65 sowie U2AF35, erkannt und gebunden werden (Abb. 5-1 und 5-2). Die Bindung der Initiierungssequenzen wird als *early* oder E-Komplex bezeichnet. Der anschließende A-Komplex ist gekennzeichnet durch die Bindung der U2 snRNP über Basenpaarung mit der BS an die pre-mRNA, dadurch wird der Spleißfaktor SF1/BBP frei gelassen. Alle drei Komplexe bilden das Prä-Spleißosom, also vor der enzymatischen Reaktion (zusammengefasst in (Wahl *et al.* 2009; Will und Lührmann 2011)). Nun stellt sich die Frage welche Rolle spielt Galectin-3 während des Zusammenbaus des Spleißosoms. Galectin-3 interagiert mit hnRNPA2B1, der Komponente, die direkt an die pre-mRNA angelagert ist. Nicht bekannt ist, ob diese Interaktion direkt oder indirekt ist. Hingegen konnte gezeigt werden, dass beide Proteine sich in einem Maximalabstand von 40 nm befinden (Abb. 4-2 B, C). Das ergäbe genügend Platz für einen weiteren Interaktionspartner beider Proteine. Ein Kandidat für diese Rolle wäre das hnRNPA1, das auch in der Affinitätschromatographie im Eluat detektiert werden konnte

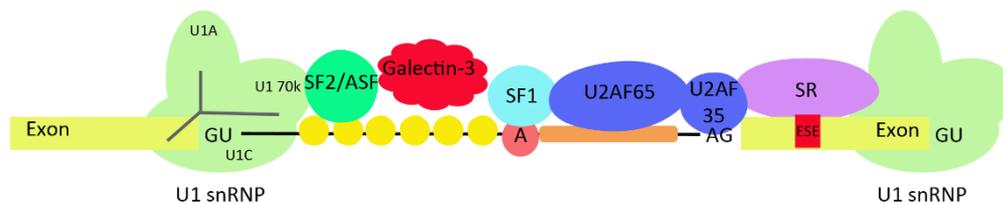
(Tab. 4-1) und außerdem peripher an das hnRNPA2B1 angelagert ist (Beyer *et al.* 1977; Lothstein *et al.* 1985). Durch diese Interaktion könnte Galectin-3 schon zu Beginn des Zusammenbaus des Spleißosoms als Komponente fungieren. Es könnte aber auch erst im E-Komplex präsent sein. Hier interagiert es mit dem U1 70k, dem U1 snRNP spezifischen Protein, und mit U2AF65 (Abb. 4-6, 4-7 und 4-10). Beide Interaktionspartner scheinen in einem Maximalabstand von 40 nm voneinander entfernt zu sein, aber unbekannt ist ob es sich um direkte Interaktionen handelt. Somit können auch hier andere direkte Bindepartner von Galectin-3 dazwischen liegen. Auch hier gibt es potentielle Kandidaten, die im Eluat der Affinitätschromatographie detektiert werden konnten. Einer dieser Kandidaten wäre das Protein SF2/ASF, dies ist ein Spleißfaktor, der eine Brücke zwischen der U1 snRNP und dem U2AF bilden kann (Kohzt *et al.* 1994). Ein weiterer Kandidat ist der Spleißfaktor PUF60, der mit dem U2AF65 interagiert (Page-McCaw *et al.* 1999). Anhand dieser Konstellation würde sich Galectin-3 im Bereich zwischen der U1 snRNP und dem U2AF65 anlagern und auch dort möglicherweise fungieren (Abb. 5-1 und 5-2). Dies ist jedoch nur eine Hypothese, die durch Folgeexperimente erst belegt werden muss.

Eine zweite Frage wäre, wie gelangt Galectin-3 zum Aufbau des Spleißosoms. Eine Möglichkeit wäre über den Zusammenbau der U snRNP im Zytoplasma. Nach der Transkription gelangen die U snRNAs zur Reifung ins Zytoplasma. Im Zytoplasma lagern sich um die U snRNAs die 7 Sm Proteine (B/B', D1, D2, D2, D3, E, F und G). Diese Anlagerung erfolgt mit Hilfe des SMN Proteinkomplexes und den GEMINen. Nach dieser Reifung gelangen die U snRNPs wieder in den Zellkern (zusammengefasst in (Matera und Wang 2014)). Galectin-3 interagiert direkt mit dem Gemin4, einer Komponente des SMN/GEMIN-Proteinkomplex (Park *et al.* 2001). Die Arbeitsgruppe um So fand heraus, dass im Fall der Reifung der U1 snRNA das U1 snRNP spezifische Protein U1 70k eine Brücke bildet zwischen der U1 snRNA und dem SMN/GEMIN-Proteinkomplex (So *et al.* 2016). Somit wäre auch hier schon eine Interaktion zwischen dem Galectin-3 und U1 70k möglich, wodurch Galectin-3 zum Prä-Spleißosom gelangen könnte. Eine zweite Möglichkeit wäre über die Interaktion mit dem Sm Protein SmE, welches im Eluat der Affinitätschromatographie detektiert wurde (Tab. 4-1). Galectin-3 könnte über die Interaktion mit Gemin4 im Zytoplasma zum U snRNP gelangen und dann über die Interaktion mit dem SmE oder mit U1 70k, im Fall der U1 snRNP, den Aufbau des Spleißosoms erreichen. Diese Hypothese gilt es jedoch noch zu beweisen.



**Abb. 5-1** Spleißosomaler E-Komplex während der Intron-Definition.

Die gelben Kreise stellen die hnRNP Proteine dar, darunter das hnRNPA2B1. Der orange Kasten steht für den Polypyrimidintrakt. SR – SR Proteine (zum Beispiel 9G8 oder Tra2B), A – Verzweigungs-Adenosin, ESE – *exon splicing enhancer*. (Modifiziert nach (Matlin *et al.* 2005))



**Abb. 5-2** Spleißosomaler E-Komplex während der Exon Definition.

Die gelben Kreise stellen die hnRNP Proteine dar, darunter das hnRNPA2B1. Der orange Kasten steht für den Polypyrimidintrakt. SR – SR Proteine (zum Beispiel 9G8 oder Tra2B), A – Verzweigungs-Adenosin, ESE – *exon splicing enhancer*. (Modifiziert nach (Matlin *et al.* 2005))

## 5.2 Galectin-3 und Galectin-1 sind an der Prozessierung der mRNA beteiligt

Eine der Funktionen, die Galectin-3 im Zellkern aufweist, ist seine Beteiligung beim Spleißen der pre-mRNA (Dagher *et al.* 1995). Aufbauend darauf sollte in dieser Arbeit die Rolle von Galectin-3 während der gesamten Prozessierung der pre-mRNA untersucht werden. Hierzu wurde nach der Depletion von Galectin-3, die mRNA mit einer fluoreszierenden Sonde markiert. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mit Hilfe einer Software analysiert und dabei wurde der Quotient der Grauwerte des Zellkerns und des Zytoplasmas gebildet und mit den Kontrollen verglichen. Es stellte sich heraus, dass die Depletion von Galectin-3 keinen Einfluss auf die Verteilung der mRNA hat (Abb. 4-13 B, C). Dies spricht dafür, dass Galectin-3 keine große Bedeutung für die Prozessierung der mRNA hat. Oder es handelt sich um eine Einflussnahme nur unter bestimmten Bedingungen, wie zum Beispiel beim alternativen Spleißen bestimmter Isoformen.

Frühere Arbeiten zeigten jedoch, dass ein Fehlen von Galectin-3 durch Galectin-1 kompensiert werden konnte (Vyakarnam *et al.* 1997). Daher wurde die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung wiederholt, jedoch wurden zuvor Galectin-3 und Galectin-1 bzw. nur Galectin-1 depletiert. Im Falle der Depletion von Galectin-1 alleine, zeigte sich ein ähnliches Bild wie für die Depletion von Galectin-3 (Abb. 4-13 B, C). Die Depletion von Galectin-1 hat keinen Einfluss auf die Prozessierung der mRNA. Schaut man sich die Ergebnisse der Doppel-Depletion von Galectin-3 mit Galectin-1 an, zeigte sich hier ein Effekt (Abb. 4-13 B, C). Es war eine signifikante Akkumulation der mRNA im Zellkern zu beobachten (Abb. 4-13 C). Unklar ist jedoch, ob Galectin-3 bzw. Galectin-1 dabei ihre Funktionen während des Spleißens der pre-mRNA ausüben oder am Export der gespleißten mRNA beteiligt sind. Möglich wäre auch die Teilnahme an der gesamten Prozessierung der mRNA bis hin zur Translation. Dies gilt es aber mit Hilfe weiterer Versuche zu analysieren. Daten dieser Arbeit zeigen, dass Galectin-3 schon während des Spleißens der pre-mRNA einen Einfluss ausüben könnte. Auch frühere Arbeiten bezüglich der Rolle von Galectin-3 während des Spleißens der pre-mRNA zeigten, dass es nach der Depletion von Galectin-3 zum Arretieren des Zusammenbaus des Spleißosoms im H/E-Komplex kommt und dies zum fehlenden Spleißen der pre-mRNA führte (Dagher *et al.* 1995; Vyakarnam *et al.* 1997). Diese Ergebnisse sprechen eher für die Rolle des Galectin-3 während des Zusammenbaus des Spleißosoms, aber auch im alternativen Spleißen.

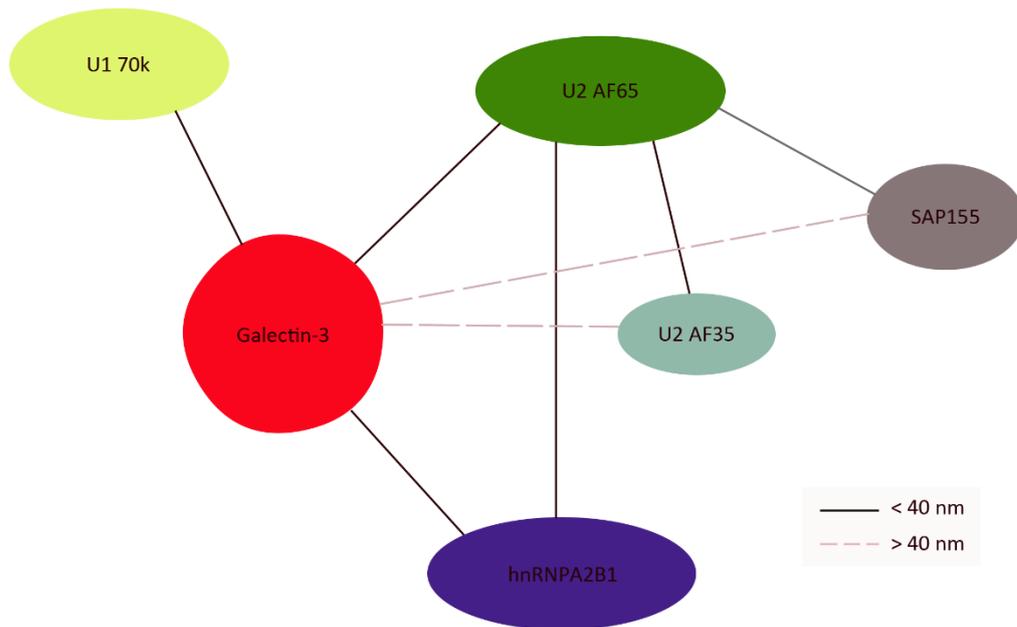
Unter der Annahme der Hypothese, dass Galectin-3 eine Rolle während des Spleißens der pre-mRNA einnimmt, stellte sich die Frage, ob dieser Einfluss das gesamte Genom betrifft oder nur bestimmte Gene. Oder im Fall einer Funktion von Galectin-3 im alternativen Spleißen, ob Galectin-3 nur bei bestimmten Isoformen Teil des Spleißosoms ist. Die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung nach Galectin-3 *knockdown* zeigten, dass Galectin-3 keinen Einfluss auf die Expression ganzer Gene hat, sondern nur auf Isoformen einzelner Gene (Abb. 4-15 und Tab. 4-2). Hierbei scheint auch keine bestimmte Gruppe von Genen betroffen zu sein, sondern die Isoformen betreffen eine Vielzahl an funktionellen Genen,

wie zum Beispiel Gene der Translation, der Zelladhäsion, des Zellzykluses oder der transkriptionalen Regulation. Dieses Ergebnis führt zu der Hypothese, dass Galectin-3 eher eine Rolle im alternativen Spleißen bestimmter Gene spielt, als dass es einen generellen Einfluss auf das Spleißen der pre-mRNA des gesamten Genoms ausübt. Man sollte hierbei aber nicht vernachlässigen, dass es sich nur um eine Depletion von Galectin-3 handelte und gravierende Effekte durch Galectin-1 kompensiert werden können. Dies könnte eine Erklärung für den geringen Einfluss der Depletion auf die RNA sein. Um also eine genauere Aussage bezüglich des Einflusses von Galectin-3 bzw. Galectin-1 auf das Spleißen bestimmter mRNAs machen zu können, müsste eine Analyse der RNA nach einer Doppel-Depletion von Galectin-3 und Galectin-1 erfolgen.

### **5.3 Die Spleißkomponenten hnRNPA2B1, U2AF65 und U1 70k interagieren untereinander**

In dieser Arbeit wurden Interaktionen von Galectin-3 mit den Spleißkomponenten hnRNPA2B1, U2AF65 und U1 70k nachgewiesen (Abb. 4-1, 4-6 und 4-10 A). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass diese Interaktionen in einem Abstand von maximal 40 nm stattfinden (Abb. 4-2, 4-7 und 4-10). Basierend darauf ergab sich die Frage, wie die einzelnen Spleißkomponenten untereinander in Verbindung standen. Die Ergebnisse zeigen, dass die drei Spleißkomponenten nicht nur mit Galectin-3 interagieren, sondern dass hnRNPA2B1 mit U2AF65 sowie U1 70k interagiert. Jedoch gibt eine Immunpräzipitation keinen Aufschluß über eine direkte bzw. indirekte Bindung. Daher besteht die Möglichkeit, dass hier keine direkte Bindung besteht und die Proteine nur gemeinsam präzipitieren, weil sie einen bisher unbekanntem gemeinsamen direkten Bindepartner besitzen. Es könnte sein, dass Galectin-3 hier die Verbindung zwischen den Proteinen darstellt, aber um diese Hypothese zu bestätigen, benötigt man spezifischere Bindeexperimente, die eine direkte Bindung zwischen Proteinen nachweisen, wie zum Beispiel ein *GST-Pulldown* mit rekombinanten Proteinen.

Fügt man die Ergebnisse aus den PLA-Versuchen hinzu, so scheint sich ein Bild zu ergeben, indem sich die Spleißkomponenten U1 70k, U2AF65 und hnRNPA2B1 in einem Umkreis von maximal 40 nm befinden und auch das Galectin-3 in diesem Abstand zu den Proteinen zu finden ist (Abb. 5-3). Welche Faktoren sich in dieser Komposition zusätzlich noch befinden, ist bisher unklar und könnte Teil zukünftiger Untersuchungen sein, ebenso wie die direkten Verbindungen der Proteine untereinander. Mögliche Kandidaten für weitere Interaktionspartner bzw. direkte Verbindungspartner könnten die SR-Proteine SF1/ASF, 9G8 oder Tra2B sein. Diese drei Kandidaten konnten als mögliche Interaktionspartner von Galectin-3 im Eluat der Affinitätschromatographie detektiert werden (Tab. 4-1).



**Abb. 5-3 Entfernung der Proteine untereinander anhand der PLA-Signale.**

Im *Proximity Ligation Assay* wurden die Interaktionen der verschiedenen Proteine untereinander untersucht. Positive PLA-Signale zeigten an, dass sich die beiden untersuchten Proteine in einem Abstand von maximal 40 nm voneinander entfernt befanden.

#### 5.4 Galectin-3 und seine Rolle im Spleißen der pre-mRNA

Anhand der bisherigen Ergebnisse scheint Galectin-3 im Prä-Spleißosom bzw. im H/E-Komplex zu agieren. Hier interagiert es mit dem hnRNPA2B1, dem U2AF65 sowie dem U1 70k. Anhand weiterer Experimente konnte gezeigt werden, dass eine gemeinsame Depletion von Galectin-3 mit Galectin-1 zur geringen, aber signifikanten Akkumulationen von mRNA im Zellkern führt, was unter anderem bedeuten kann, dass das Spleißen der pre-mRNA gestört ist. Dies stimmt in etwa mit Beobachtungen früherer Publikationen überein, in denen es zum Arrest der pre-mRNA im H/E-Komplex nach der Depletion von Galectin-3 kam (Dagher *et al.* 1995; Vyakarnam *et al.* 1997). Die Daten der RNA-Sequenzierung deuten auf einen Einfluss von Galectin-3 nur bei bestimmten Isoformen bestimmter Gene hin, dies könnte ein Hinweis für die Rolle von Galectin-3 im alternativen Spleißen sein und unterstützt somit den geringen Einfluss nach der Depletion von Galectin-3 bei der Verteilung der mRNA im FISH-Assay.

Ein weiterer wichtiger Punkt, der für die Rolle von Galectin-3 im alternativen Spleißen spricht, ist seine Interaktion mit hnRNPA2B1. Zum Beispiel kann hnRNPA1 mit ESS/ISS assoziieren und die 3' Spleißseite inhibieren oder die Verwendung fernerer 5' Spleißseiten beeinflussen. Es kann aber auch die Assoziation von U2 snRNP mit der pre-mRNA verhindern und auf diesem Weg den Zusammenbau des Spleißosoms inhibieren. Das hnRNPA2B1 scheint während des alternativen Spleißens ähnlich wie hnRNPA1 zu

agieren (zusammengefasst in (He und Smith 2009)). Ebenfalls wird durch die Bindung von hnRNP A/B Proteinen an ESS der Zusammenbau des E-Komplex inhibiert, indem sie die Bindung von U2AF65 an den Polypyrimidintrakt verhindern (Domsic *et al.* 2003).

Die Arbeitsgruppe um Golan-Gerstl fand heraus, dass hnRNPA2B1 als Proto-Onkogen agiert und das alternative Spleißen von Tumor-Suppressoren wie *BIN1*, *WWOX*, dem anti-apoptotischen Protein *c-FLIP* und Caspase-9B verändert, indem es die Expression der onkogenetischen Isoformen dieser Proteine verstärkt (Golan-Gerstl *et al.* 2011). Auf diesem Weg spielt das alternative Spleißen eine wichtige Rolle in der Tumorentwicklung und der Tumorerhaltung, und könnte ein Grund für die Überexpression von hnRNPA2B1 in verschiedenen Tumoren wie zum Beispiel Glioblastomen, Lungen- und Brusttumoren sein (zusammengefasst in (Golan-Gerstl *et al.* 2011)). Galectin-3 zeigt ebenfalls eine erhöhte Expressionsrate in Glioblastomen und Lungentumorzellen (zusammengefasst in (Song *et al.* 2014)). Hier könnte eine Verbindung der beiden Proteine bestehen, indem Galectin-3 im alternativen Spleißen mittels hnRNPA2B1 aktiv ist und möglicherweise eine Funktion in der Koordination von hnRNPA2B1 zu den entsprechenden *cis*-agierenden Sequenzen übernimmt. Dies ist aber reine Spekulation und müsste erst experimentell überprüft werden. Eine Hypothese entsprechend der Koordination von hnRNPA2B1 zu den *cis*-agierenden Sequenzen könnte aufgrund der Clusterbildung von Galectin-3 geschehen. Galectin-3 ist in der Lage in Anwesenheit eines Liganden Cluster zu bilden und dadurch die Liganden zu sammeln bzw. in eine nähere Umgebung zu bringen. Diese Clusterbildung wurde zwar bisher nur für die apikale Sortierung von Glykoliganden nachgewiesen und ist wichtiger Bestandteil im apikalen Transport polarer Zellen, aber dennoch konnte bisher nicht gezeigt werden (Delacour *et al.* 2006; Delacour *et al.* 2007), dass Galectin-3 auch während der Ausübung anderer Funktionen Cluster bilden kann. Durch eine Clusterbildung könnte Galectin-3 hnRNPA2B1 bzw. auch hnRNPA1 zu den *cis*-agierenden Sequenzen bringen und somit das alternative Spleißen steuern. Gleichzeitig könnte es auf diesem Weg SR-Proteine ebenfalls an den Ort ihrer Funktion bringen und somit die einzelnen Komponenten, die für das alternative Spleißen eines entsprechenden Gens benötigt werden in unmittelbare Nähe zueinander und zu den *cis*-agierenden Sequenzen bringen. Hier könnte Galectin-3 eine Rolle als Vermittler der einzelnen Komponenten untereinander agieren und würde entsprechend dem zu spleißenden Gen auch die entsprechenden Komponenten miteinander verbinden. Eine Analyse bezüglich dieser Theorie müsste zunächst mit der Untersuchung beginnen, ob Galectin-3 im Zellkern in der Lage ist Cluster zu bilden und Folgeexperimente könnten danach auf die Clusterkomponenten eingehen. Eine weitere Möglichkeit der Kooperation zwischen Galectin-3 und hnRNPA2B1 könnte in der Regulation des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg sein. Galectin-3 kann  $\beta$ -Catenin direkt binden und somit entgeht das Protein der Phosphorylierung. Das  $\beta$ -Catenin wandert gemeinsam mit Galectin-3 in den Zellkern und beide induzieren dort die transkriptionale Aktivität vom Transkriptionsfaktor Tcf-4. Dadurch kommt es zur vermehrten Expression von c-myc und Cyclin D sowie weiteren Genen, die wichtig sind

für die zelluläre Proliferation, Morphologie, Zellbewegung, Achsenformation und Organentwicklung. Dieser Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg findet in vielen Tumorzellen vermehrt statt (Huelsenken *et al.* 2000; Miller *et al.* 1999; Shimura *et al.* 2004; Shtutman *et al.* 1999; Tetsu und McCormick 1999). Das Protoonkogen c-myc ist auch in der Lage die Expression von hnRNPA2B1 hochzuregulieren (David *et al.* 2010). Und hnRNPA2B1 wiederum ist in der Lage die Expression von  $\beta$ -Catenin über mRNA 3'UTR *cis*-regulierenden Regionen zu regulieren (Stockley *et al.* 2014). Auch hier könnte es sein, dass Galectin-3 den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg schon auf pre-mRNA-Ebene beeinflusst, indem es beim alternativen Spleißen mit Hilfe von hnRNPA2B1 die Expression von  $\beta$ -Catenin steuert. Diese Hypothese unterliegt jedoch bisher nur Vermutungen, aber könnte ein Anstoß für weitere Experimente sein.

## 5.5 Ausblick

Im Rahmen dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass Galectin-3 mit den Spleißkomponenten hnRNPA2B1, U2AF65 und U1 70k im Zellkern interagiert. Weiterhin wurde gezeigt, dass Galectin-3 bzw. Galectin-1 einen Einfluss auf die Prozessierung der mRNA haben und Galectin-3 für das Spleißen bestimmter Isoformen verschiedener Gene wichtig ist. Aufbauend auf diesen Ergebnissen steht die genauere Charakterisierung der Interaktionen aus. Dabei wäre es sehr interessant herauszufinden, welcher vor allem im spleißosomalen E-Komplex der direkte Bindepartner von Galectin-3 ist. Mit Hilfe der Affinitätschromatographie konnten weitere Kandidaten neben den drei bisher identifizierten Interaktionspartnern hnRNPA2B1, U2AF65 und U1 70k gefunden werden. Hierbei würden sich direkte Bindestudien anbieten, wie zum Beispiel ein GST-*pull-down* Assay mit rekombinanten Proteinen. Da bei diesem *Pull-down*-Versuch nur die zu untersuchenden Proteine vorhanden wären, gäbe es eine eindeutige Bindung oder keine Bindung, wenn der entsprechende Zwischenpartner fehlt. Mikroskopisch könnte man die Interaktionen mit hochauflösenden Mikroskopen in der Zelle untersuchen. Hier bieten sich Elektronenmikroskope oder ultrahochauflösende Fluoreszenzmikroskope an. Diese Anwendung könnte auch einen genaueren Einblick auf die Lage und Verteilung der Proteine geben. Wenn der direkte Bindepartner von Galectin-3 im Spleißosom gefunden wäre, könnte man daraus auf die genauere Funktion schließen und hinsichtlich dieser weitere Versuche durchführen. Hilfreich wäre auch eine wiederholte RNA-Sequenzierung nach der Depletion von Galectin-3 und Galectin-1, um so die betroffenen Gene besser bestimmen zu können.

Auch ein interessanter Ansatz wären die möglichen Zusammenhänge zwischen Galectin-3 und hnRNPA2B1 in Tumorzellen. Beide Proteine sind in Glioblastomen und Lungentumorzellen hochreguliert und dienen in vielen Tumoren als Tumormarker (Fielding *et al.* 1999; Golan-Gerstl *et al.* 2011; Song *et al.* 2014). Hierbei ist bekannt, dass zytoplasmatisches Galectin-3 eher eine anti-apoptotische Funktion ausübt, indem es über vielfältige Wege die Apoptose hemmt (Hsu und Liu 2004; Hsu *et al.*

2006). Und nukleäres Galectin-3 agiert fördernd auf Tumorzellen, indem es über die Bindung an den Transkriptionsfaktor TTF-1 die Zellproliferation verstärkt (Paron et al. 2003). Außerdem bindet Galectin-3  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma. Beide wandern in den Zellkern und binden den Transkriptionsfaktor Tcf-4, wodurch es unter anderem zur Expression von Gene wie c-myc und Cyclin D kommt, welche auch einen Einfluss auf die zelluläre Proliferation ausüben (zusammengefasst in (Shimura et al. 2005) (Shimura et al. 2004)). Inwieweit hierbei die Interaktion mit dem hnRNPA2B1 eine Rolle spielt, wäre eine interessante Fragestellung für weitere Versuche.

Ebenfalls sollte ein Augenmerk auf die Phosphorylierung von Galectin-3 im Zellkern gelenkt werden. Da nukleäres Galectin-3 auch in unphosphorylierter Form im Zellkern vorkommen kann, könnte hier ein Hinweis auf eine bestimmte Funktion stecken. Durch die Phosphorylierung kommt es zur Konformationsänderung und zu einer reduzierten Bindung von Liganden (zusammengefasst in (Barondes et al. 1994 b); (Mazurek et al. 2000)). Die Fragen, die sich dabei stellen sind, warum kommt Galectin-3 nur im Zellkern in unphosphorylierter Form vor, wie unterscheidet sich hierbei seine Fähigkeit Liganden zu binden und welche Auswirkung hat das auf seine Funktion im Vergleich zur phosphorylierten Form. Welche Form ist die wichtige Form, die während des Spleißens agiert und unterscheidet möglicherweise eine Phosphorylierung, ob Galectin-3 am Zusammenbau des Spleißosoms involviert ist oder im alternativen Spleißens agiert? Hinsichtlich dieser Fragestellungen könnten Untersuchungen einen weiteren Hinweis bezüglich der genauen Funktion von Galectin-3 während des Spleißens von pre-mRNA liefern.

## 6 Literaturverzeichnis

- Abovich, N. und Rosbash, M. (1997) **"Cross-intron bridging interactions in the yeast commitment complex are conserved in mammals."** *Cell* 89(3): 403 – 412.
- Agrwal, N., Sun, Q., Wang, S.Y. und Wang, J.L. (1993) **"Carbohydrate-binding protein 35. I. Properties of the recombinant polypeptide and the individuality of the domains."** *J Biol Chem* 268(20): 14932 - 14939.
- Ainger, K., Avossa, D., Diana, A.S., Barry, C., Barbarese, E. und Carson, J.H. (1997) **"Transport and localization elements in myelin basic protein mRNA."** *J Cell Biol* 138(5): 1077 – 1087.
- Anders, S., Reyes, A. und Huber, W. (2012) **"Detecting differential usage of exons from RNA-seq data."** *Genome Research* 22: 2008 – 2017.
- Ast, G. (2004) **"How did alternative splicing evolve?"** *Nat Rev Genet* 5(10): 773 – 782.
- Bach, M., Krol, A. und Lührmann R. (1990) **"Structure-probing of U1 snRNPs gradually depleted of the U1-specific proteins A, C and 70k. Evidence that A interacts differentially with developmentally regulated mouse U1 snRNA variants."** *Nucleic Acids Res* 18(3): 449 – 457.
- Barnett, S.F., Theyry, T.A. und LeSturgeon, W.M. (1991) **"The core proteins A2 and B1 exist as (A2)<sub>3</sub>B1 tetramers in 40S nuclear ribonucleoprotein particles."** *Mol Cell Biol* 11(2): 864 – 871.
- Barondes, S.H., Castronovo, V., Cooper, D.N., Cummings, R.D., Drickamer, K., Feizi, T., Gitt, M.A., Hirabayashi, J., Hughes, C., Kasai, K. *et al.* (1994 a) **"Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins."** *Cell* 76(4): 597 – 598.
- Barondes, S.H., Cooper, D.N., Gitt, M.A. und Leffler, H. (1994 b) **"Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins."** *J Biol Chem* 269(33): 20807 – 20810.
- Behrens, J., Jerchow, B.A., Würtele, M., Grimm, J., Asbrand, C., Wirtz, R., Kühl, M., Wedlich, D. und Birchmeier, W. (1998) **"Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta."** *Science* 280(5363): 596 – 599.

- Behrens, S.E., Tyc, K., Kastner, B., Reichelt, J. und Lührmann, R. (1993) **“Small nuclear ribonucleoprotein (RNP) U2 contains numerous additional proteins and has a bipartite RNP structure under splicing conditions.”** *Mol Cell Biol* 13(1): 307 – 319.
- Beyer, A.L., Christensen, M.E., Walker, B.W. und LeSturgeon, W.M. (1977) **“Identification and characterization of the packaging proteins of core 40S hnRNP particles.”** *Cell* 11(1): 127 – 138.
- Biamonti, G., Ruggiu, M., Saccone, S., Della Valle, G. und Riva, S. (1994) **“Two homologous genes, originated by duplication, encode the human hnRNP proteins A2 and A1.”** *Nucleic Acids Res* 22(11): 1996 – 2002.
- Black, D.L. (2000) **“Protein diversity from alternative splicing: a challenge for bioinformatics and postgenome biology.”** *Cell* 103(3): 367 – 370.
- Black, D.L. (2003) **“Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing.”** *Annu Rev Biochem* 72: 291 – 336.
- Braeuer, R.R., Zigler, M., Kamiya, T., Dobroff, A.S., Huang, L., Choi, W., McConkey, D.J., Shoshan, E., Mobley, A.K., Song, R., Raz, A. und Bar-Eli, M. (2012) **“Galectin-3 contributes to melanoma growth and metastasis via regulation of NFAT1 and autotaxin.”** *Cancer Res* 72(22): 5757 – 5766.
- Brewer, F.C. (2002) **“Binding and cross-linking properties of galectins.”** *Biochim Biophys Acta* 1572 (2-3): 255 – 262.
- Bringmann, P. und Lührmann, R. (1986) **“Purification of the individual snRNPs U1, U2, U5 and U4/U6 from HeLa cells and characterization of their protein constituents.”** *EMBO J* 5(13): 3509 – 3516.
- Brosi, R., Gröning, K., Behrens, S.E., Lührmann, R. und Krämer, A. (1993 a) **“Interaction of mammalian splicing factor SF3a with U2 snRNP and relation of its 60-kD subunit to yeast PRP9.”** *Science* 262(5130): 102 – 105.
- Brosi, R., Hauri, H.P. und Krämer, A. (1993 b) **“Separation of splicing factor SF3 into two components and purification of SF3a activity.”** *J Biol Chem* 268(23): 17640 – 17646.
- Brumwell, C., Antolik, C., Carson, J.H. und Barbaresi, E. (2002) **“Intracellular trafficking of hnRNP A2 in oligodendrocytes.”** *Exp Cell Res* 279(2): 310 – 320.

- Burd, C.G. und Dreyfuss, G. (1994) **“Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins.”** *Science* 265(5172): 615 – 621.
- Burd, C.G., Swanson, M.S., Görlach, M. und Dreyfuss, G. (1989) **“Primary structures of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2, B1, and C2 proteins: a diversity of RNA binding proteins is generated by small peptide inserts.”** *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(24): 9788 – 9792.
- Burge, C.B., Tuschl, T. und Sharp, P.A. (1999) **“Splicing of precursors to mRNAs by the spliceosomes.”** *The RNA world, 2<sup>nd</sup> ed, Gesteland R.F. et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press:* 525 – 560.
- Burnette, W.N. (1981) **“Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A.”** *Anal Biochem* 112(2): 195 – 203.
- Califice, S., Castronovo, V., Bracke, M. und van den Brûle, F. (2004) **“Dual activities of galectin-3 in human prostate cancer: tumor suppression of nuclear galectin-3 vs tumor promotion of cytoplasmic galectin-3.”** *Oncogene* 23(45): 7527 – 7536.
- Camacho-Vanegas, O., Weighardt, F., Ghigna, C., Amaldi, F., Riva, S. und Biamonti, G. (1997) **“Growth-dependent and growth-independent translation of messengers for heterogeneous nuclear ribonucleoproteins.”** *Nucleic Acids Res* 25(19): 3950 – 3954.
- Cao, W. und Garcia-Blanco, M.A. (1998) **“A serine/arginine-rich domain in the human U1 70k protein is necessary and sufficient for ASF/SF2 binding.”** *J Biol Chem* 273(32): 20629 – 20635.
- Chabot, B. und Shkreta, L. (2016) **“Defective control of pre-messenger RNA splicing in human disease.”** *J Cell Biol* 2016 212(1): 13 – 27.
- Chakraborty, P., Satterly, N. und Fontoura, B.M. (2006) **“Nuclear export assays for poly(A) RNAs.”** *Methods* 39(4): 363 – 369.
- Chiara, M.D., Palandjian, L., Feld Kramer, R. und Reed, R. (1997) **“Evidence that U5 snRNP recognizes the 3' splice site for catalytic step II in mammals.”** *EMBO J* 16(15): 4746 – 4759.
- Cho, M. und Cummings, R.D. (1997) **“Galectin-1: oligomeric structure and interactions with poly(lactosamine).”** *Trends Glycosci Glycotech* 9(45): 47 – 56.

- Cho, S., Hoang, A., Sinha, R., Zhong, X.Y., Fu, X.D., Krainer, A.R. und Ghosh, G. (2011) **“Interaction between the RNA binding domains of Ser-Arg splicing factor 1 and U1 70k snRNP protein determines early spliceosome assembly.”** *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(20): 8233 – 8238.
- Cooper, D.N. (2002) **“Galectinomics: finding themes in complexity.”** *Biochim Biophys Acta* 1572(2-3): 209 – 231.
- Cooper, D.N. und Barondes, S.H. (1999) **“God must love galectins; he made so many of them.”** *Glycobiology* 9(10): 979 – 984.
- Dagher, S.F., Wang, J.L. und Patterson, R.J. (1995) **“Identification of galectin-3 as a factor in pre-mRNA splicing.”** *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(4): 1213 – 1217.
- Das, R., Zhou, Z. und Reed, R. (2000) **“Functional association of U2 snRNP with the ATP-independent spliceosomal complex E.”** *Mol Cell* 5(5): 779 – 787.
- David, C.J., Chen, M., Assanah, M., Canoll, P. und Manley, J.L. (2010) **“HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer.”** *Nature* 463(7279): 364 – 368.
- Davidson, P.J., Davis, M.J., Patterson, R.J., Ripoche, M.A., Poirier, F. und Wang, J.L. (2002) **“Shuttling of galectin-3 between the nucleus and catoplasm.”** *Glycobiology* 12(5): 329 – 337.
- Davidson, P.J., Li, S.Y., Lohse, A.G., Vandergaast, R., Verde, E., Pearson, A., Patterson, R.J., Wang, J.L. und Arnoys, E.J. (2006) **“Transport of galectin-3 between the nucleus and cytoplasm. I. Conditions and signals for nuclear import.”** *Glycobiology* 16(7): 602 – 611.
- Delacour, D., Cramm-Behrens, C.I., Drobecq, H., Le Bivic, A., Naim, H.Y. und Jacob, R. (2006) **“Requirement for galectin-3 in apical protein sorting.”** *Curr Biol* 16(4): 408 – 414.
- Delacour, D., Greb, C., Koch, A., Salomonsson, E., Leffler, H., Le Bivic, A. und Jacob, R. (2007) **“Apical sorting by galectin-3-dependent glycoprotein clustering.”** *Traffic* 8(4): 379 – 388.
- Demetriou, M., Granovsky, M., Quaggin, S. und Dennis, J.W. (2001) **“Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation.”** *Nature* 409(682): 733 – 739.
- Dietz, H. (1998) **“Polishing the cutting edge of gems.”** *Nat Genet* 20(4): 321 – 322.

- Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M. und Gingeras, T.R. (2013) **“STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner.”** *Bioinformatics* 29(1): 15 – 21
- Domsic, J.K., Wang, Y., Mayeda, A., Krainer, A.R. und Stoltzfus, C.M. (2003) **“Human immunodeficiency virus type 1 hnRNP A/B-dependent exonic splicing silencer ESSV antagonizes binding of U2AF65 to viral polypyrimidine tracts.”** *Mol Cell Biol* 23(23): 8762 – 8772.
- Dreyfuss, G., Kim, V.N. und Kataoka, N. (2002) **“Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry.”** *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(3): 195 – 205.
- Dreyfuss, G., Matunis, M.J., Pinol-Roma, S. und Burd, C.G. (1993) **“hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA.”** *Annu Rev Biochem* 62: 289 – 321.
- Dumic, J., Dabelic, S. und Flögel, M. (2006) **“Galectin-3: an open-ended story.”** *Biochim Biophys Acta* 1760(4): 616 – 635.
- Fica, S.M., Tuttle, N., Novak, T., Li, N.S., Lu, J., Koodathingal, P., Dai, Q., Staley, J.P. und Piccirilli, J.A. (2013) **“RNA catalyzes nuclear pre-mRNA splicing.”** *Nature* 503(7475): 229 – 234.
- Fielding, P., Turnbull, L., Prime, W., Walshaw, M. und Field, J.K. (1999) **“Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 up-regulation in bronchial lavage specimens: a clinical marker of early lung cancer detection.”** *Clin Cancer Res* 5(12): 4048 – 4052.
- Fischer, U., Liu, Q. und Dreyfuss, G. (1997) **“The SMN-SIP1 complex has an essential role in spliceosomal snRNP biogenesis.”** *Cell* 90(6): 1023 – 1029.
- Fleckner, J., Zhang, M., Valcárcel, J. und Green, M.R. (1997) **“U2AF65 recruits a novel human DEAD box protein required for the U2 snRNP-branchpoint interaction.”** *Genes Dev* 11(14): 1864 – 1872.
- Fowles, D., Colnot, C., Ripoche, M.A. und Poirier, F. (1995) **“Galectin-3 is expressed in the notochord, developing bones, and skin of the postimplantation mouse embryo.”** *Dev Dyn* 203(2): 241 – 251.
- Fredericks, A.M., Cygan, K.J., Brown, B.A. und Fairbrother, W.G. (2015) **“RNA-binding proteins: Splicing factors and disease.”** *Biomolecules* 5(2): 893 – 909.

- Fu, X.D. und Maniatis, T. (1990) **“Factor required for mammalian spliceosome assembly is localized to discrete regions in the nucleus.”** *Nature* 343(6257): 437 – 441.
- Gaudin, J.C., Mehul, B. und Hughes, R.C. (2000) **“Nuclear localisation of wild type and mutant galectin-3 in transfected cells.”** *Biol Cell* 92(1): 49 – 58.
- Golan-Gerstl, R., Cohen, M., Shilo, A., Suh, S.S., Bakàcs, A., Coppola, L. und Karni, R. (2011) **“Splicing factor hnRNP A2/B1 regulates tumor suppressor gene splicing and is an oncogenic driver in glioblastoma.”** *Cancer Res* 71(13): 4464 – 4472.
- Gozani, O., Potashkin, J. und Reed, R. (1998) **“A potential role for U2AF-SAP 155 interactions in recruiting U2 snRNP to the branch site.”** *Mol Cell Biol* 18(8): 4752 – 4760.
- Graveley, B.R. (2000) **“Sorting out the complexity of SR protein functions.”** *RNA* 6(9): 1197 – 1211.
- Guiro, J. und O’Reilly, D. (2015) **“Insights into the U1 small nuclear ribonucleoprotein complex superfamily.”** *Wiley Interdiscip Rev RNA* 6(1): 79 – 92.
- Hart, G.W., Housley, M.P. und Slawson, C. (2007) **“Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins.”** *Nature* 446(7139): 1017 – 1022.
- Haudek, K.C., Spronk, K.J., Voss, P.G., Patterson, R.J., Wang, J.L. und Arnoys, E.J. (2010) **“Dynamics of galectin-3 in the nucleus and cytoplasm.”** *Biochim Biophys Acta* 1800(2): 181 – 189.
- Haudek, K.C., Voss, P.G., Locascio, L.E., Wang, J.L. und Patterson, R.J. (2009) **“A mechanism for incorporation of galectin-3 into the spliceosome through its association with U1 snRNP.”** *Biochemistry* 48(32): 7705 – 7712.
- He, Y. und Smith, R. (2009) **“Nuclear functions of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A/B.”** *Cell Mol Life Sci* 66(7): 1239 – 1256.
- Hinterberger, M., Pettersson, I. und Steitz, J.A. (1983) **“Isolation of small nuclear ribonucleoproteins containing U1, U2, U4, U5, and U6 RNAs.”** *J Biol Chem* 258(4): 2604 – 2613.
- Hirabayashi, J. (1997) **“Recent topics on galectins.”** *Trends Glycosci Glycotech* 9: 1 – 184.

- Hirabayashi, J., Hashidate, T., Arata, Y., Nishi, N., Nakamura, T., Hirashima, M., Urashima, T., Oka, T., Futai, M., Muller, W.E., Yagi, F. und Kasai, K. (2002) **“Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography.”** *Biochim Biophys Acta* 19(1572): 232 – 254.
- Hodges, P.E. und Beggs, J.D. (1994) **“RNA splicing. U2 fulfils a commitment.”** *Curr Biol* 4(3): 264 – 267.
- Honjo, Y., Inohara, H., Akahani, S., Yoshii, T., Takenaka, Y., Yoshida, J., Hattori, K., Tomiyama, Y., Raz, A. und Kubo, T. (2000) **“Expression of cytoplasmic galectin-3 as a prognostic marker in tongue carcinoma.”** *Clin Cancer Res* 6(12): 4635 – 4640.
- Honjo, Y., Nangia-Makker, P., Inohara, H. und Raz, A. (2001) **“Down-regulation of galectin-3 suppresses tumorigenicity of human breast carcinoma cells.”** *Clin Cancer Res* 7(3): 661 – 668.
- Hsu, D.K. und Liu, F.T. (2004) **“Regulation of cellular homeostasis by galectins.”** *Glycoconj J* 19(7-9): 507 – 515.
- Hsu, D.K., Yang, R.Y. und Liu, F.T. (2006) **“Galectins in apoptosis.”** *Methods Enzymol* 417: 256 – 273.
- Huelsken, J., Vogel, R., Brinkmann, V., Erdmann, B., Birchmeier, C. und Birchmeier, W. (2000) **“Requirement for beta-catenin in anterior-posterior axis formation in mice.”** *J Cell Biol* 148(3): 567 – 578.
- Iervolino, A., Santilli, G., Trotta, R., Guerzoni, C., Cesi, V., Bergamaschi, A., Gambacorti-Passerini, C., Calabretta, B. und Perrotti, D. (2002) **“hnRNP A1 nucleocytoplasmic shuttling activity is required for normal myelopoiesis and BCR/ABL leukemogenesis.”** *Mol Cell Biol* 22(7): 2255 – 2266.
- Iurisci, I., Tinari, N., Natoli, C., Angelucci, D., Cianchetti, E. und Iacobelli, S. (2000) **“Concentrations of galectin-3 in the sera of normal controls and cancer patients.”** *Clin Cancer Res* 6(4): 1389 – 1393.
- Jamison, S.F., Pasman, Z., Wang, J., Will, C., Lührmann, R., Manley, J.L. und Garcis-Blanco, M.A. (1995) **“U1 snRNP-ASF/SF2 interaction and 5' splice site recognition: characterization of required elements.”** *Nucleic Acids Res* 23(16): 3260 – 3267.
- Karas, M. und Krüger, R. (2003) **“Ion formation in MALDI: the cluster ionization mechanism.”** *Chem Rev* 103(2): 427 - 440

- Katz, Y., Wang, E.T., Airoidi, E.M. und Burgeet, C.B. (2010) **“Analysis and design of RNA sequencing experiments for identifying isoform regulation.”** *Nature Methods* 7: 1009 – 1015.
- Kent, O.A. und MacMillan, A.M. (2002) **“Early organization of pre-mRNA during spliceosome assembly.”** *Nat Struct Biol* 9(8): 576 – 581.
- Kent, O.A., Reayi, A., Foong, L., Chilibeck, K.A. und MacMillan, A.M. (2003) **“Structuring of the 3' splice site by U2AF65.”** *J Biol Chem* 278(50): 50572 – 50577.
- Kielkopf, C.L., Rodionova, N.A., Green, M.R. und Burley, S.K. (2001) **“A novel peptide recognition mode revealed by the X-ray structure of a core U2AF35/U2AF65 heterodimer.”** *Cell* 106(5): 595 – 605.
- Kikuchi, A. (1999) **“Roles of axin in the Wnt signaling pathway.”** *Cell Signal* 11(11): 777 – 788.
- Kim, S.J., Shin, J.Y., Cheong, T.C., Choi, I.J., Lee, Y.S., Park, S.H. und Chun, K.H. (2011) **“Galectin-3 germline variant at position 191 enhances nuclear accumulation and activation of  $\beta$ -catenin in gastric cancer.”** *Clin Exp Metastasis* 28(8): 743 – 750.
- Kishida, S., Yamamoto, H., Ikeda, S., Kishida, M., Sakamoto, I., Koyama, S. und Kikuchi, A. (1998) **“Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, directly interacts with adenomatous polyposis coli and regulates the stabilization of beta-catenin.”** *J Biol Chem* 273(18): 10823 – 10826.
- Kohtz, J.D., Jamison, S.F., Will, C.L., Zuo, P., Lührmann, R., Garcia-Blanco, M.A. und Manley, J.L. (1994) **“Protein-protein interactions and 5' splice site recognition in mammalian mRNA precursors.”** *Nature* 368(6467): 119 – 124.
- Krämer, A. (1996) **“The structure and function of proteins involved in mammalian pre-mRNA splicing.”** *Annu Rev Biochem* 65: 367 – 409.
- Krämer, A., Grüter, P., Gröning, K. und Kastner, B. (1999) **“Combined biochemical and electron microscopic analyses reveal the architecture of the mammalian U2 snRNP.”** *J Cell Biol* 145(7): 1355 – 1368.
- Krecic, A.M. und Swanson, M.S. (1999) **“hnRNP complexes: composition, structure, and function.”** *Curr Opin Cell Biol* 11(3):363 – 371.

- Krzeglak, A. und Lipinska, A. (2004) **“Galectin-3 as a multifunctional protein.”** *Cell Mol Biol Lett* 9(2): 305 – 328.
- Kumar, A., Williams, K.R. und Szer, W. (1986) **“Purification and domain structure of core hnRNP proteins A1 and A2 and their relationship to single-stranded DNA-binding proteins.”** *J Biol Chem* 261(24): 11266 – 11273.
- Lacadie, S.A. und Rosbash, M. (2005) **“Cotranscriptional spliceosome assembly dynamics and the role of U1 snRNA:5' splice base pairing in yeast.”** *Mol Cell* 19(1): 65 – 75.
- Laemmli, U.K. (1970) **“Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.”** *Nature* 227(5259): 680 – 685.
- Laing J.G. und Wang, J.L. (1988) **“Identification of carbohydrate binding protein 35 in heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex.”** *Biochemistry* 27(14): 5329 – 5334.
- Lee, C.H., Lum, J.H., Cheung, B.P., Wong, M.S., Butt, Y.K., Tam, M.F., Chan, W.Y., Chow, C., Hui, P.K., Kwok, F.S., Lo, S.C. und Fan, D.M. (2005) **“Identification of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 as the antigen for the gastrointestinal cancer specific monoclonal antibody MG7.”** *Proteomics* 5(4): 1160 – 1166.
- Lee, C.L., Hsiao, H.H., Lin, C.W., Wu, S.P., Huang, S.Y., Wu, C.Y., Wang, A.H. und Khoo, K.H. (2003) **“Strategic shotgun proteomics approach for efficient construction of an expression map of targeted protein families in hepatoma cell lines.”** *Proteomics* 3(12): 2472 – 2486.
- Leffler, H., Carlsson, S., Hedlund, M., Qian, Y. und Poirier, F. (2004) **“Introduction to galectins.”** *Glycoconj J* 19(7-9): 433 – 440.
- Leser, G.P., Escara-Wilke, J. und Martin, T.E. (1984) **“Monoclonal antibodies to heterogeneous nuclear RNA-protein complexes. The core proteins comprise a conserved group of related polypeptides.”** *J Biol Chem* 259(3): 1827 – 1833.
- Li, S.Y., Davidson, P.J., Lin, N.Y., Patterson, R.J., Wang, J.L. und Arnoys, E.J. (2006) **“Transport of galectin-3 between the nucleus and cytoplasm. II. Identification of the signal for nuclear export.”** *Glycobiology* 16(7): 612 – 622.
- Liu, F.T. und Rabinovich, G.A. (2005) **“Galectins as modulators of tumour progression.”** *Nat Rev Cancer* 5(1): 29 – 41.

- Lothstein, L., Arenstorff H.P., Chung, S.Y., Walker, B.W., Wooley, J.C. und LeStourgeon, W.M. (1985) **“General organization of protein in HeLa 40S nuclear ribonucleoprotein particles.”** *J Cell Biol* 100(5): 1570 – 1581.
- Lotz, M.M., Andrews Jr., C.W., Korzelius, C.A., Lee, E.C., Steele Jr., G.D., Clarke, A., et al. (1993) **“Decreased expression of Mac-2 (carbohydrate binding protein 35) and loss of its nuclear localization are associated with the neoplastic progression of colon carcinoma.”** *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(8): 3466 – 3470.
- Love, M.I., Huber, W. und Anders, S. (2014) **“Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2.”** *Genome Biology* 15(12): 550 – 570.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. und Randall, R.J. (1951) **“Protein measurement with the folin phenol reagent.”** *J Biol Chem* 193(1): 265 – 275.
- Lund, M. und Kjems, J. (2002) **“Defining a 5′ splice site by functional selection in the presence and absence of U1 snRNA 5′ end.”** *RNA* 8(2): 166 – 179.
- Makarov, E.M, Makarov, O.V., Urlaub, H., Gentzel, M., Will, C.L., Wilm, M. und Lührmann, R. (2002) **“Small nuclear ribonucleoprotein remodeling during catalytic activation of the spliceosome.”** *Science* 298(5601): 2205 – 2208.
- Maniatis, T. und Reed, R. (1987) **“The role of small nuclear ribonucleoprotein particles in pre-mRNA splicing.”** *Nature* 325(6106): 673 – 678.
- Martinez-Contreras, R., Cloutier, P., Shkreta, L., Fiset, J.F., Revil, T. und Chabot, B. (2007) **“hnRNP proteins and splicing control.”** *Adv Exp Med Biol* 623: 123 – 147.
- Massa, S.M., Cooper, D.N., Leffler, H. und Barondes, S.H. (1993) **“L-29, an endogenous lectin, binds to glycoconjugate ligands with positive cooperativity.”** *Biochemistry* 32(1): 260 – 267.
- Matera, A.G. und Frey, M.R. (1998) **“Coiled bodies and gems: Janus or gemini?”** *Am J Hum Genet* 63(2): 317 – 321.
- Matera, A.G. und Wang, Z. (2014) **“A day in the life of the spliceosome.”** *Nat Rev Mol Cell Biol* 15(2): 108 – 121.

- Matlin, A.J., Clark, F. und Smith, C.W. (2005) **“Understanding alternative splicing: towards a cellular code.”** *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(5): 386 – 398.
- Mattaj, I.W. (1998) **“Ribonucleoprotein assembly: clues from spinal muscular atrophy.”** *Curr Biol* 8(3): R93 – R95.
- Mayeda, A., Munroe, S.H., Cáceres, J.F. und Krainer, A.R. (1994) **“Function of conserved domains of hnRNPA1 and other hnRNP A/B proteins.”** *EMBO J* 13(22): 5483 – 5495.
- Mazurek, N., Byrd, J.C., Sun, Y., Ueno, S. und Bresalier, R.S. (2011) **“A galectin-3 sequence polymorphism confers TRAIL sensitivity to human breast cancer cells.”** *Cancer* 117(19): 4375 – 4380.
- Mazurek, N., Conklin, J., Byrd, J.C., Raz, A. und Bresalier, R.S. (2000) **“Phosphorylation of the beta-galactoside-binding protein galectin-3 modulates binding to its ligands.”** *J Biol Chem* 275(46): 36311 – 36315.
- Meister, G., Bühler, D., Laggerbauer, B., Zobawa, M., Lottspeich, F. und Fischer, U. (2000) **“Characterization of a nuclear 20S complex containing the survival of motor neurons (SMN) protein and a specific subset of spliceosomal Sm proteins.”** *Hum Mol Genet* 9(13): 1977 – 1986.
- Menon, R.P. und Hughes, R.C. (1999) **“Determinants in the N-terminal domains of galectin-3 for secretion by a novel pathway circumventing the endoplasmic reticulum-Golgi complex.”** *Eur J Biochem* 264(2): 569 – 576.
- Merendino, L., Guth, S., Bilbao, D., Martínez, C. und Valcárcel, J. (1999) **“Inhibition of msl-2 splicing by Sex-lethal reveals interaction between U2AF35 and the 3' splice site AG.”** *Nature* 402(6763): 838 – 841.
- Miller, J.R., Hocking, A.M., Brown, J.D. und Moon, R.T. (1999) **“Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca<sup>2+</sup> pathways.”** *Oncogene* 18(55): 7860 – 7872.
- Minoo, P., Sullivan, W., Solomon, L.R., Martin, T.E., Toft, D.O. und Scott, R.E. (1989) **“Loss of proliferative potential during terminal differentiation coincides with the decreased abundance of a subset of heterogeneous ribonuclear proteins.”** *J Cell Biol* 109(5): 1937 – 1946.

- Moran-Jones, K., Grindlay, J., Jones, M., Smith, R. und Norman, J.C. (2009) **“hnRNP A2 regulates alternative mRNA splicing of TP53INP2 to control invasive cell migration.”** *Cancer Res* 69(24): 9219 – 9227.
- Moutsatsos, I.K., Wade, M., Schindler, M. und Wang, J.L. (1987) **“Endogenous lectins from cultured cells: nuclear localization of carbohydrate-binding protein 35 in proliferating 3T3 fibroblasts.”** *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(18): 6452 – 6456.
- Muto, Y., Pomeranz Krummel, D., Oubridge, C., Hernandez, H., Robinson, C.V., Neuhaus, D. und Nagai, K. (2004) **“The structure and biochemical properties of the human spliceosomal protein U1C.”** *J Mol Biol* 341(1): 185 – 198.
- Nakahara, S., Hogan, V., Inohara, H. und Raz, A. (2006) **“Importin-mediated nuclear translocation of galectin-3.”** *J Biol Chem* 281(51): 39649- 39659.
- Nakahara, S. und Raz, A. (2007) **“Regulation of cancer-related gene expression by galectin-3 and the molecular mechanism of its nuclear import pathway.”** *Cancer Metastasis Rev* 26(3-4): 605 – 610.
- Nangia-Makker, P., Hogan, V., Honjo, Y., Baccharini, S., Tait, L., Bresalier, R. und Raz, A. (2002) **“Inhibition of human cancer cell growth and metastasis in nude mice by oral intake of modified citrus pectin.”** *J Natl Cancer Inst* 94(24): 1854 – 1862.
- Nangia-Makker, P., Honjo, Y., Sarvis, R., Akahani, S., Hogan, V., Pienta, K.J. und Raz, A. (2000) **“Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis.”** *Am J Pathol* 156(3): 899 – 909.
- Nelissen, R.L., Will, C.L., van Venrooij, W.J. und Lührmann, R. (1994) **“The association of the U1-specific 70K and C proteins with U1 snRNPs is mediated in part by common U snRNP proteins.”** *EMBO J* 13(17): 4113 – 4125.
- Openo, K.P., Kadrofske, M.M., Patterson, R.J. und Wang, J.L. (2000) **“Galectin-3 expression and sub cellular localization in senescent human fibroblasts.”** *Exp Cell Res* 255(2): 278 – 290.
- Oubridge, C., Ito, N., Evans, P.R., Teo, C.H. und Nagai, K. (1994) **“Crystal structure at 1.92 Å resolution of the RNA-binding domain of the U1A spliceosomal protein complexed with an RNA hairpin.”** *Nature* 372(6505): 432 – 438.

- Page-McCaw, P.S., Amonlirdviman, K. und Sharp, P.A. (1999) **"PUF60: a novel U2AF65-related splicing activity."** *RNA* 5(12): 1548 – 1560.
- Park, J.W., Voss, P.G., Grabski, S., Wang, J.L. und Patterson, R.J. (2001) **"Association of galectin-1 and galectin-3 with Gemin4 in complexes containing the SMN protein."** *Nucleic Acids Res* 29: 3595 – 3602.
- Parker, R., Siliciano, P.G. und Guthrie, C. (1987) **"Recognition of the TACTAAC box during mRNA splicing in yeast involves base pairing to the U2-like snRNA."** *Cell* 49(2): 229 – 239.
- Paron, I., Scaloni, A., Pines, A., Bachi, A., Liu, F.T., Puppini, C., Pandolfi, M., Ledda, L., Di Loreto, C., Damante, G. und Tell, G. (2003) **"Nuclear localization of galectin-3 in transformed thyroid cells: a role in transcriptional regulation."** *Biochem Biophys Res Commun* 302(3): 545 – 553.
- Partridge, E.A., Le Roy, C., Di Guglielmo, G.M., Pawling, J., Cheung, P., Granovsky, M., Nabi, I.R., Wrana, J.L. und Dennis, J.W. (2004) **"Regulation of cytokine receptors by golgi N-glycan processing and endocytosis."** *Science* 306(5693): 120 – 124.
- Patton, J.R. und Pederson, T. (1988) **"The Mr 70,000 protein of the U1 small nuclear ribonucleoprotein particle binds to the 5' stem-loop of U1 RNA and interacts with Sm domain proteins."** *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(3): 747 – 751.
- Pellizzoni, L., Kataoka, N., Charroux, B. und Dreyfuss, G. (1998) **"A novel function for SMN, the spinal muscular atrophy disease gene product, in pre-mRNA splicing."** *Cell* 95(5): 615 – 624.
- Pienta, K.J., Naik, H., Akhtar, A., Yamazaki, K., Replogle, T.S., Lehr, J., Donat, T.L., Tait, L., Hogan, V. und Raz, A. (1995) **"Inhibition of spontaneous metastasis in a rat prostate cancer model by oral administration of modified citrus pectin."** *J Natl Cancer Inst* 87(5): 348 – 353.
- Pinol-Roma, S. (1997) **"HnRNP proteins and the nuclear export of mRNA."** *Semin Cell Dev Biol* 8(1): 57 – 63.
- Pinol-Roma, S., Choi, Y.D., Matunis, M.J. und Dreyfuss, G. (1988) **"Immunopurification of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles reveals an assortment of RNA-binding proteins."** *Genes Dev* 2(2): 215 – 227.
- Pinol-Roma, S. und Dreyfuss, G. (1992) **"Shuttling of pre-mRNA binding proteins between nucleus and cytoplasm."** *Nature* 355(6362): 730 – 732.

- Platt, D. und Raz, A. (1992) **“Modulation of the lung colonization of B16-F1 melanoma cells by citrus pectin.”** *J Natl Cancer Inst* 84(6): 438 – 442.
- Poirier, F. (2002) **“Roles of galectins in vivo.”** *Biochem Soc Symp* 69: 95 – 103.
- Pomeranz Krummel, D.A., Oubridge, C., Leung, A.K., Li, J. und Nagai, K. (2009) **“Crystal structure of human spliceosomal U1 snRNP at 5.5 Å resolution.”** *Nature* 458(7237): 475 – 480.
- Pullman, J.M. und Martin, T.E. (1983) **“Reconstitution of nucleoprotein complexes with mammalian heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) core proteins.”** *J Cell Biol* 97(1): 99 – 111.
- Query, C.C., Bentley, R.C. und Keene, J.D. (1989 a) **“A common RNA recognition motif identified within a defined U1 RNA binding domain of the 70K U1 snRNP protein.”** *Cell* 57(1): 89 – 101.
- Query, C.C., Bentley, R.C. und Keene, J.D. (1989 b) **“A specific 31-nucleotide domain of U1 RNA directly interacts with the 70K small nuclear ribonucleoprotein component.”** *Mol Cell Biol* 9(11): 4872 – 4881.
- Rambaruth, N.D., Greenwell, P. und Dwek, M.V. (2012) **“The lectin helix pomatia agglutinin recognizes O-GlcNAc containing glycoproteins in human breast cancer.”** *Glycobiology* 22(6): 839 – 848.
- Reed, R. (1996) **“Initial splice-site recognition and pairing during pre-mRNA splicing.”** *Curr Opin Genet Dev* 6(2): 215 – 220.
- Roscigno, R.F., Weiner, M. und Garcia-Blanco, M.A. (1993) **“A mutational analysis of the polypyrimidine tract of introns. Effects of sequence differences in pyrimidine tracts on splicing.”** *J Biol Chem* 268(15): 11222 – 11229.
- Ruskin, B., Zamore, P.D. und Green, M.R. (1988) **“A factor, U2AF, is required for U2 snRNP binding and splicing complex assembly.”** *Cell* 52(2): 207 – 219.
- Sacchettini, J.C., Baum, L.G. und Brewer, C.F. (2001) **“Multivalent protein-carbohydrate interactions. A new paradigm for supermolecular assembly and signal transduction.”** *Biochemistry* 40(10): 3009 – 3015.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.P. und Russell, D.W. (2001) **“Molecular cloning: a laboratory manual.”** 3. ed Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Satoh, H., Kamma, H., Ishikawa, H., Horiguchi, H., Fujiwara, M., Yamashita, Y.T., Ohtsuka, M. und Sekizawa, K. (2000) **“Expression of hnRNP A2/B1 proteins in human cancer cell lines.”** *Int J Oncol* 16(4): 763 – 767.
- Scherly, D., Boelens, W., Dathan, N.A., van Venrooij, W.J. und Mattaj, I.W. (1990) **“Major determinants of the specificity of interaction between small nuclear ribonucleoproteins U1A und U2B” and their cognate RNAs.”** *Nature* 345(6275): 502 – 506.
- Seetharaman, J., Kanigsberg, A., Slaaby, R., Leffler, H., Barondes, S.H. und Rini, J.M. (1998) **“X-ray crystal structure of the human galectin-3 carbohydrate recognition domain at 2.1-Å resolution.”** *J Biol Chem* 273(21): 13047- 13052.
- Shen, H. und Green, M.R. (2004) **“A pathway of sequential arginine-serine-rich domain-splicing signal interactions during mammalian spliceosome assembly.”** *Mol Cell* 16(3): 363 – 373.
- Shibata, T., Noguchi, T., Takeno, S., Takahashi, Y., Fumoto, S. und Kawahara, K. (2005) **“Impact of nuclear galectin-3 expression on histological differentiation and vascular invasion in patients with esophageal squamous cell carcinoma.”** *Oncol Rep* 13(2): 235 – 239.
- Shimura, T., Takenaka, Y., Fukumori, T., Tsutsumi, S., Okada, K., Hogan, V., Kikuchi, A., Kuwano, H. und Raz, A. (2005) **“Implication of galectin-3 in Wnt signaling.”** *Cancer Res* 65(9): 3535 – 3537.
- Shimura, T., Takenaka, Y., Tsutsumi, S., Hogan, V., Kikuchi, A. und Raz, A. (2004) **“Galectin-3, a novel binding partner of beta-catenin.”** *Cancer Res* 64(18): 6363 – 6367.
- Shtutman, M., Zhurinsky, J., Simcha, I., Albanese, C., D’Amico, M., Pestell, R. und Ben-Ze’ev, A. (1999) **“The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway.”** *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(10): 5522 – 5527.
- Smith, C.W. und Valcárcal, J. (2000) **“Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control.”** *Trends Biochem Sci* 25(8): 381 – 388.
- Smith, P.J., Zhang, C., Wang, J., Chew, S.L., Zhang, M.Q. und Krainer, A.R. (2006) **“An increased specificity score matrix for the prediction of SF2/ASF-specific exonic splicing enhancers.”** *Hum Mol Genet* 15(16): 2490 – 2508.
- Snead, D.R., Perunovic, B., Cullen, N., Needham, M., Dhillon, D.P., Satoh, H. und Kamma, H. (2003) **“hnRNP B1 expression in benign and malignant lung disease.”** *J Pathol* 200(1): 88 – 94.

- So, B.R., Wan, L., Zhang, Z., Li, P., Babiash, E., Duan, J., Younis, I. und Dreyfuss, G. (2016) **“A U1 snRNP-specific assembly pathway reveals the SMN complex as a versatile hub for RNP exchange.”** *Nat Struct Mol Biol* 23(3): 225 – 230.
- Song, L., Tang, J.W., Owusu, L., Sun, M.Z., Wu, J. und Zhang, J. (2014) **“Galectin-3 in cancer.”** *Clin Chim Acta* 431: 185 – 191.
- Spector, D.L. (1993) **“Macromolecular domains within the cell nucleus.”** *Annu Rev Cell Biol* 9: 265 – 315.
- Spritz, R.A., Strunk, K., Surowy, C.S., Hoch, S.O., Barton, D.E. und Francke, U. (1987) **“The human U1-70K snRNP protein: cDNA cloning, chromosomal localization, expression, alternative splicing and RNA-binding.”** *Nucleic Acids Res* 15(24): 10373 – 10391.
- Spritz, R.A., Strunk, K., Surowy, C.S. und Mohrenweiser, H.W. (1990) **“Human U1-70K ribonucleoprotein antigen gene: organization, nucleotide sequence, and mapping to locus 19q13.3.”** *Genomics* 8(2): 371 – 379.
- Staley, J.P. und Guthrie, C. (1998) **“Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things.”** *Cell* 92(3): 315 – 326.
- Stockley, J., Villasevil, M.E., Nixon, C., Ahmad, I., Leung, H.Y. und Rajan, P. (2014) **“The RNA-binding protein hnRNPA2 regulates  $\beta$ -catenin protein expression and is overexpressed in prostate cancer.”** *RNA Biol* 11(6): 755 – 765.
- Straube, T., Elli, A.F., Greb, C., Hegele, A., Elsässer, H.P., Delacour, D. und Jacob, R. (2011) **“Changes in the expression and subcellular distribution of galectin-3 in clear cell renal cell carcinoma.”** *J Exp Clin Cancer Res* 30(1): 89 – 98.
- Su, J., Zhang, T., Wang, P., Liu, F.T., Tai, G. und Zhou, Y. (2015) **“The water network in galectin-3 ligand binding site guides inhibitor design.”** *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 47(3): 192 – 198.
- Sueoka, E., Sueoka, N., Goto, Y., Matsuyama, S., Nishimura, H., Sato, M., Fujimura, S., Chiba, H. und Fujiki, H. (1999) **“Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein B1 as early cancer biomarker for occult cancer of human lungs and bronchial dysplasia.”** *Cancer Res* 61(5): 1896 – 1902.

- Takenaka, Y., Fukumori, T., Yoshii, T., Oka, N., Inohara, H., Kim, H.R., Bresalier, R.S. und Raz, A. (2004) **“Nuclear export of phosphorylated galectin-3 regulates its antiapoptotic activity in response to chemotherapeutic drugs.”** *Mol Cell Biol.* 24(10): 4395 – 4406.
- Takenaka, Y., Inohara, H., Yoshii, T., Oshima, K., Nakahara, S., Akahani, S., Honjo, Y., Yamamoto, Y., Raz, A. und Kubo, T. (2003) **“Malignant transformation of thyroid follicular cells by galectin-3.”** *Cancer Lett* 195(1): 111 – 119.
- Tetsu, O. und McCormick, F. (1999) **“Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells.”** *Nature* 398(6726): 422 – 426.
- Theissen, H., Etzerodt, M., Reuter, R., Schneider, C., Lottspeich, F., Argos, P., Lührmann, R. und Philipson, L. (1986) **“Cloning of the human cDNA for the U1 RNA-associated 70K protein.”** *EMBO J* 5(12): 3209 – 3217.
- Tsay, Y.G., Lin, N.Y., Voss, P.G., Patterson, R.J. und Wang, J.L. (1999) **“Export of galectin-3 from nuclei of digitonin-permeabilized mouse 3T3 fibroblasts.”** *Exp Cell Res* 252(2): 250 – 261.
- Turunen, J.J., Niemelä, E.H., Verma, B. und Frilander, M.J. (2013) **“The significant other: splicing by the minor spliceosome.”** *Wiley Interdiscip Rev RNA* 4(1): 61 – 76.
- Valadkhan, S. (2010) **“Role of the snRNAs in spliceosomal active site.”** *RNA Biol* 7(3): 345 – 353.
- Valcárcel, J., Gaur, R.K., Singh, R. und Green, M.R. (1996) **“Interaction of U2AF65 RS region with pre-mRNA branch point and promotion of base pairing with U2 snRNA.”** *Science* 273(5282): 1706 – 1709.
- Villarroya-Beltri, C., Gutiérrez-Vázquez, C., Sánchez-Cabo, F., Pérez-Hernández, D., Vázquez, J., Martín-Cofreces, N., Martínez-Herrera, D.J., Pascual-Montano, A., Mittelbrunn, M. und Sánchez-Madrid, F. (2013) **“Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs.”** *Nat Commun* 4(2980).
- Vladoiu, M.C., Labrie, M. und St-Pierre, Y. (2014) **“Intracellular galectins in cancer cells: potential new targets for therapie.”** (Review) *Int J Oncol* 44(4): 1001 – 1014.
- Vyakarnam, A., Dagher, S.F., Wang, J.L. und Patterson, R.J. (1997) **“Evidence for a role for galectin-1 in pre-mRNA splicing.”** *Mol Cell Biol* 17(8): 4730 – 4737.

- Wahl, M.C., Will, C.L. und Lührmann, R. (2009) **"The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine."** *Cell* 136(4): 701 – 718.
- Walker, B.W., Lothstein, L., Baker, C.L. und LeStourgeon, W.M. (1980) **"The release of 40S hnRNP particles by brief digestion of HeLa nuclei with micrococcal nuclease."** *Nucleic Acids Res* 8(16): 3639 – 3657.
- Wang, J.L., Gray, R.M., Haudek, K.C. und Patterson, R.J. (2004) **"Nucleocytoplasmic lectins."** *Biochim Biophys Acta* 1673(1-2): 75 – 93.
- Wang, W., Park, J.W., Wang, J.L. und Patterson, R.J. (2006) **"Immunoprecipitation of spliceosomal RNAs by antisera to galectin-1 and galectin-3."** *Nucleic Acids Res* 34(18): 5166 – 5174.
- Wang, Z. und Burge, C.B. (2008) **"Splicing regulation: from a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code."** *RNA* 14(5): 802 – 813.
- Wilk, H.E., Angeli, G. und Schäfer, K.P. (1983) **"In vitro reconstitution of 35S ribonucleoprotein complexes."** *Biochemistry* 22(19): 4592 – 4600.
- Wilk, H.E., Werr, H., Friedrich, D., Kiltz, H.H. und Schäfer, K.P. (1985) **"The core proteins of 35S hnRNP complexes. Characterization of nine different species."** *Eur J Biochem* 146(1): 71 – 81.
- Will, C.L. und Lührmann, R. (1997) **"Protein functions in pre-mRNA splicing."** *Curr Opin Cell Biol* 9(3): 320 – 328.
- Will, C.L. und Lührmann, R. (2001) **"Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function."** *Curr Opin Cell Biol* 13(3): 290 – 301.
- Will, C.L. und Lührmann, R. (2006) **"Spliceosome structure and function."** *The RNA world, 3<sup>rd</sup> ed., Gesteland, R.F., Cech, T.R. und Atkins, A.J.F., Cold Spring Harbor Laboratory Press:* 369 – 400.
- Will, C.L. und Lührmann, R. (2011) **"Spliceosome structure and function."** *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3(7): a003707.
- Wu, J. und Manley, J.L. (1989) **"Mammalian pre-mRNA branch site selection by U2 snRNP involves base pairing."** *Genes Dev* 3(10): 1553 – 1561.

- Wu, J.Y. und Maniatis, T. (1993) **“Specific interactions between proteins implicated in splice site selection and regulated alternative splicing.”** *Cell* 75(6): 1061 – 1070.
- Wu, S., Romfo, C.M., Nilsen, T.W. und Green, M.R. (1999) **“Functional recognition of the 3′ splice site AG by the splicing factor U2AF35.”** *Nature* 402(6763): 832 – 835.
- Yaginuma, Y. und Westphal, H. (1992) **“Abnormal structure and expression of the p53 gene in human ovarian carcinoma cell lines.”** *Cancer Res* 52(15): 4196 – 4199.
- Yan-Sanders, Y., Hammons, G.J. und Lyn-Cook, B.D. (2002) **“Increased expression of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 (hnRNP) in pancreatic tissue from smokers and pancreatic tumor cells.”** *Cancer Lett* 183(2): 215 – 220.
- Yang, L. (2015) **“Splicing noncoding RNAs from the inside out.”** *Wiley Interdiscip Rev RNA* 6(6): 651 – 660.
- Yang, R.Y., Hsu, D.K. und Liu, F.T. (1996) **“Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis.”** *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(13): 6763 – 6742.
- Yang, R.Y., Rabinovich, G.A. und Liu, F.T. (2008) **“Galectins: structure, function and therapeutic potential.”** *Expert Rev Mol Med* 10: e17.
- Yeo, G.W., Van Nostrand, E.L. und Liang, T.Y. (2007) **“Discovery and analysis of evolutionarily conserved intronic splicing regulatory elements.”** *PLoS Genet* 3(5): e85.
- Yoo, B.C., Hong, S.H., Ku, J.L., Kim, Y.H., Shin, Y.K., Jang, S.G., Kim, I.J., Jeong, S.Y. und Park, J.G. (2009) **“Galectin-3 stabilizes heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q to maintain proliferation of human colon cancer cells.”** *Cell Mol Life Sci* 66(2): 350 – 364.
- Yoshii, T., Inohara, H., Takenaka, Y., Honjo, Y., Akahani, S., Nomura, T., Raz, A. und Kubo, T. (2001) **“Galectin-3 maintains the transformed phenotype of thyroid papillary carcinoma cells.”** *Int J Oncol* 18(4): 787 – 792.
- Yu, Y.-T., Scharl, E.C., Smith, C.M. und Steitz, J.A. (1999) **“The RNA world II.”** Gesteland, R.R., Cech, T.R. und Atkins, J.F., Cold Spring Harbor Laboratory Press: 487 – 524.

- Zamore, P.D. und Green, M.R. (1989) **“Identification, purification, and biochemical characterization of U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor.”** *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(23): 9243 – 9247.
- Zamore, P.D., Patton, J.G. und Green, M.R. (1992) **“Cloning and domain structure of the mammalian splicing factor U2AF.”** *Nature* 355(6361): 609 – 614.
- Zhang, L., Li, X. und Zhao, R. (2013) **“Structural analyses of the pre-mRNA splicing machinery.”** *Protein Sci* 22(6): 677 – 692.
- Zhang, M., Zamore, P.D., Carmo-Fonseca, M., Lamond, A.L. und Green, M.R. (1992) **“Cloning and intracellular localization of the U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor small subunit.”** *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(18): 8769 – 8773.
- Zhou, J., Allred, D.C., Avis, I., Martínez, A., Vos, M.D., Smith, L., Treston, A.M. und Mulshine, J.L. (2001) **“Differential expression of the early lung cancer detection marker, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-A2/B1 (hnRNP-A2/B1) in normal breast and neoplastic breast cancer.”** *Breast Cancer Res Treat* 66(3): 217 – 224.
- Zhou, J., Mulshine, J.L., Unsworth, E.J., Scott, F.M., Avis, I.M., Vos, M.D. und Treston, A.M. (1996) **“Purification and characterization of a protein that permits early detection of lung cancer. Identification of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-A2/B1 as the antigen for monoclonal antibody.”** *J Biol Chem* 271(18): 10760 – 10766.
- Zhuang, Y. und Weiner, A.M. (1989) **“A compensatory base change in human U2 snRNA can suppress a branch site mutation.”** *Genes Dev* 3(10): 1545 – 1552.
- Zorio, D.A. und Blumenthal, T. (1999) **“Both subunits of U2AF recognize the 3’ splice site in *Caenorhabditis elegans*.”** *Nature* 402(6763): 835 – 838.
- Zuo, P. und Maniatis, T. (1996) **“The splicing factor U2AF35 mediates critical protein-protein interactions in constitutive and enhancer-dependent splicing.”** *Genes Dev* 10(11): 1356 – 1368.

## 7 Anhang

### 7.1 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

#### Abbildungen

Abb. 2-1	U2-Typ-Introns und U12-Typ-Introns	4
Abb. 2-2	Der 2-Schritte-Mechanismus des pre-mRNA Spleißens	5
Abb. 2-3	Zusammenbau der Sm-Klasse snRNPs	5
Abb. 2-4	Aufbau der U1 snRNP	6
Abb. 2-5	Zusammenbau des Spleißosoms	7
Abb. 2-6	Reguliertes Spleißen	9
Abb. 2-7	Struktur und Isoformen von hnRNPA2B1	11
Abb. 2-8	hnRNP A/B Proteine im alternativen Spleißen	12
Abb. 2-9	Model der humanen U1 snRNP	13
Abb. 2-10	Struktur vom U2AF65/U2AF35-Komplex	15
Abb. 2-11	Molekulare Interaktionen an der Verzweigungsstelle und der 3' Spleißseite im spleißosomalen E- und A-Komplex	16
Abb. 2-12	Einteilung der Galectine	18
Abb. 2-13	Kristallstruktur von Galectin-3 CRD mit Laktose	18
Abb. 2-14	einige extrazelluläre und zytoplasmatischen Funktionen von Galectin-3	21
Abb. 2-15	einige nukleäre Funktionen von Galectin-3	22
Abb. 3-1	Native Gelelektrophorese 1. + 2. Dimension	41
Abb. 3-2	Glycerol Gradient	50
Abb. 3-3	<i>Proximity Ligation Assay</i>	53
Abb. 4-1	hnRNPA2B1 präzipitiert gemeinsam mit Galectin-3 im Zellkern	59
Abb. 4-2	Galectin-3 kolokalisiert mit hnRNPA2B1 <i>in vivo</i>	61
Abb. 4-3	Galectin-3 und hnRNPA2B1 befinden sich im gleichen nukleären Proteinkomplex	63
Abb. 4-4	Galectin-3 kann nicht an Sauerstoff-verlinktes N-Acetylglucosamin binden	64
Abb. 4-5	Galectin-3 interagiert mit verschiedenen hnRNP Proteinen, Spleißosom- Komponenten und weiteren nukleären Proteinen	66
Abb. 4-6	Galectin-3 interagiert mit U2AF65	70
Abb. 4-7	Galectin-3 kolokalisiert mit U2AF65 <i>in vivo</i>	72
Abb. 4-8	Galectin-3 und U2AF35 scheinen sich nicht in einem Maximalabstand von 40 nm zu befinden	74
Abb. 4-9	Galectin-3 und SAP155 scheinen weiter als 40 nm voneinander entfernt zu sein	77

Abb. 4-10	Galectin-3 interagiert mit U1 70k im Zellkern	79
Abb. 4-11	Galectin-3 kolokalisiert mit Speckles	81
Abb. 4-12	FISH-Analyse der hnRNPA2B1-depletierten HeLa-Zellen	83
Abb. 4-13	FISH-Analyse der HeLa-Zellen nach Doppel- <i>knockdown</i> von Galectin-1 und Galectin-3	85
Abb. 4-14	<i>knockdown</i> -Effizienz nach Galectin-3-Depletion	87
Abb. 4-15	nach Funktionen gruppierte Isoformen beeinflusst durch Galectin-3- <i>knockdown</i>	88
Abb. 4-16	hnRNPA2B1 interagiert mit U2AF65 und U1 70k	95
Abb. 4-17	die Spleißkomponenten U2AF65, U1 70k, hnRNPA2B1 und SAP155 befinden sich maximal 40 nm voneinander entfernt	97
Abb. 5-1	spleißosomaler E-Komplex während der Intron-Definition	105
Abb. 5-2	spleißosomaler E-Komplex während der Exon-Definition	105
Abb. 5-3	Entfernung der Proteine untereinander anhand der PLA-Signale	108
 <b>Tabellen</b>		
Tab. 3-1	Geräte	26
Tab. 3-2	Chemikalien und Materialien	27
Tab. 3-3	verwendete Kits	29
Tab. 3-4	Medien	30
Tab. 3-5	verwendete siRNAs	33
Tab. 3-6	Mengenangaben Zellkern-Extraktion	35
Tab. 3-7	verwendete Antikörper Co-Immünpräzipitation	37
Tab. 3-8	verwendete Saccharide	39
Tab. 3-9	Zusammensetzung natives PAA-Gradientgel	42
Tab. 3-10	verwendete Antikörper Western Blot	44
Tab. 3-11	verwendete Antikörper Immunfluoreszenz	51
Tab. 3-12	verwendete Antikörper <i>Proximity Ligation Assay</i>	53
Tab. 3-13	Einstellung KLSM	55
Tab. 4-1	Interaktionspartner von Galectin-3 im Zellkern	67
Tab. 4-2	Isoformen beeinflusst durch <i>knockdown</i> von Galectin-3	89

## 7.2 Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	anti
APC	<i>Adenomatous-polyposis-coli</i> -Protein
APS	Ammoniumpersulfat
AT-AC	Adenin Thymin – Adenin Cytosin
AT-GC	Adenin Thymin – Guanin Cytosin
ATP	Adenosintri-phosphat
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BN-PAGE	<i>blue native-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
bp	Basenpaare
BS	<i>branchpoint sequence</i>
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CBP	<i>carbohydrate-binding protein</i>
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
CER	<i>cytoplasmic extraction reagent</i>
CK1	<i>casein kinase 1</i>
Co-IP	Co-Immunpräzipitation
CRD	<i>carbohydrate recognition domain</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>
DTT	Dithiothreitol
ECL	Elektrochemilumineszenz
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinase</i>
ESE	<i>exon splicing enhancer</i>
ESS	<i>exon splicing silencer</i>
et al.	et alia

---

FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FKS	fetales Kälberserum
FPKM	<i>fragments per kilobase of exon per million fragments mapped</i>
GST	Glutathion- <b>S</b> -Transferase
GT-AG	Guanin Thymin – Adenin Guanin
h	hour
HeLa-Zellen	<b>H</b> enrietta <b>L</b> acks-Zellen
hnRNP	heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein
HP	<i>high pressure</i>
IB	Immunblot
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin <b>G</b>
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
ISE	intron splicing enhancer
ISS	intron splicing silencer
JNK	C-Jun <b>N</b> -terminale Kinase
kDa	kilo Dalton
KH	hnRNPK-homolog
KLSM	konfokales <i>Laser-scanning</i> Mikroskop
LB	lysogeny broth
lncRNA	long non-coding RNA
MALDI-TOF	Matrix-assistierte Laser-Desorption-Ionisierung- <i>time of flight</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCP	<i>modified citrus pectin</i>
ME-PBS	$\beta$ -Mercaptoethanol- <i>phosphate buffered saline</i>
Min	<b>M</b> inute
mk	monoklonal
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	Massenspektrometrie
MW	<i>molecular weight</i>
NE	nukleärer Extrakt
NER	<i>nuclear extraction reagent</i>
NFAT1	<i>nuclear factor of activated T-cells 1</i>
NHS	<b>N</b> -hydroxysuccinimid

---

NP-40	nonoxinol 40
PAA	<i>poly acrylic acid</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PI	<b>Proteinase Inhibitor</b>
Pk	polyklonal
PLA	<i>Proximity Ligation Assay</i>
PMSF	<b>Phenylmethylsulfonylfluorid</b>
PPT	<b>Poly</b> pyrimidintrakt
pre-mRNA	<i>precursor mRNA</i>
PVDF	<b>Poly</b> vinylidenfluorid
RBD	<b>RNA-Bindedomäne</b>
RC-124	<i>renal cells 124</i>
RCC-FG1	<i>renal clear cell carcinoma cells-FG1</i>
RGG	Arginin Glycin Glycin
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rpm	<i>rotations per minute</i>
RRM	<i>RNA recognition motif</i>
RT	<b>Raum</b> temperatur
SAP	<i>spliceosome associated protein</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
sec	<i>second</i>
SF	Spleißfaktor
SF1/BBP	<i>splicing factor 1/branchpoint binding protein</i>
SF2/ASF	<i>splicing factor 2/alternatice splicing factor</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SL	<i>stem loop</i>
SMN	<i>survival motor neuron</i>
snoRNA	<i>small nucleolar RNA</i>
snRNP	<i>small nuclear RNA</i>
ss	Spleißseite
Tcf/Lef	<i>transcription factor/lymphoid enhancer-binding factor</i>
TFA	<i>trifluoroacetic acid</i>
tRNA	<b>Transfer-RNA</b>
TTF-1	<b>Thyroidaler Transkriptionsfaktor 1</b>
U2AF	<b>U2</b> assoziierter Faktor

üN	über Nacht
UTR	<i>untranslated region</i>
UZ	Ultrazentrifuge
v/v	<i>volume/volume</i>
WB	Western Blot
w/v	<i>mass/volume</i>
WWOX	<b>WW</b> domain-containing oxidoreductase

### 7.3 Publikationen

Teile dieser Arbeit werden in folgenden Artikeln publiziert:

Fritsch K., Mernberger M., Nist A., Stiewe T., Brehm A. und Jacob R. „**Galectin-3 interacts with components of the nuclear ribonucleoprotein complex.**“ *BMC Cancer* (in Revision)

### 7.4 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Herren und Damen in Marburg:

Aigner, Adamkiewicz, Bastians, Bauer, Becker, Brehm, Bremer, Bremmer, Burchert, Czubayko, Daut, Decher, del Rey, Eickmann, Eilers, Elsässer, Fritz, Garn, Garten, Glorius, Grzeschik, Haselik, Hassel, Hilt, Jacob, Jungglas, Klenk, Koolmann, Krebber, Löffler, Lill, Lillig, Lohöfer, Lohoff, Lürs, Maisner, Moll, Mühlhoff, Oliver, Petz, Plant, Preisig-Müller, Müller, Müller-Brüsselbach, Röhm, Schäfer, Schrader, Suske, Vollmer, Weihe, Westermann und Wrocklage

## 7.5 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Ralf Jacob und Alexander Brehm für dieses Promotionsthema und vor allem für die Möglichkeit zur Promotion. Außerdem möchte ich mich für die Unterstützung bei praktischen und theoretischen Problemen sowie der Erstellung dieser Arbeit bedanken.

Ich möchte mich auch bei Jürgen Adamkiewicz und Stefan Baumeister für die Unterstützung sowie Bearbeitung meiner Proben und Ausführung der Massenspektrometrie bedanken.

Weiterer Dank gilt Marco Mernberger und Andrea Nist für die Probenbearbeitung und Datenauswertung der RNA-Sequenzierung. Speziell möchte ich mich noch bei Marco bedanken für die schnelle und ausdauernde Beantwortung meiner Fragen.

Der AG Bindereif, vor allem Albrecht Bindereif und Silke Schreiner gilt mein Dank für den Aufenthalt in ihrem Labor, die Materialien und der Hilfe bei der Arbeit mit RNA.

Für die Hilfe bei der Elektroporation möchte ich mich bei Ralf Rößer und Oliver Stehling bedanken.

Ein großes Dankeschön geht an die AG Jacob, die immer unterstützend geholfen hat. Hier möchte ich vor allem Martina Dienst danken. Ein besonders großes Dankeschön geht an Waltraud Ackermann für die praktische Hilfe im Labor und für das offene Ohr bei sämtlichen Fragen und für die kleinen Unterhaltungen zwischendurch. Auch den Ehemaligen der AG Jacob, Tobias von Mach, Dominik Schneider, Florian Hoff, Tamara Straube, Sophie Veitinger und Sabrina Zink gilt mein Dank für viele hilfreiche Tipps und die Unterstützung.

Ich möchte mich bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Graduiertenkolleg 1216 für die Förderung und die finanzielle Unterstützung bedanken.

Besonders möchte ich mich bei Kristin Kunze bedanken. Die mir in jeder Situation zur Seite stand und mich immer unterstützt hat. Ebenfalls möchte ich mich bei Steffi Schwope und Karolin Rempel bedanken, die immer ein offenes Ohr für mich und meine Probleme hatten.

Der größte Dank gilt meiner Familie. Ich bedanke mich bei meiner Oma Rosi, Oma Ilse und Oma Ellen für das Interesse an meiner Arbeit und der großen Unterstützung. Ich bedanke mich für die großartige Unterstützung auch bei meinen Eltern, ohne denen es nicht möglich gewesen wäre für mich zu promovieren. Außerdem bedanke ich mich sehr bei meiner Mama, die mich überredet hat doch noch nach Ilmenau zur Aufnahmeprüfung zu fahren. Außerdem bedanke ich mich bei meinem Bruder Oliver, Nere und Evan für die Unterstützung und lustigen Momente in Marburg. Weiterer Dank gilt meinem Onkel Uwe, Onkel Steffen, Gabi und Anika.

Ein großer Dank geht an die Familie Scheler, Doris und Thomas, und Familie Wicklein, Nancy, Jens, Selma und Arne, für die Unterstützung und das gute Essen.

Ein außerordentlich großes Dankeschön geht an Nico Scheler. Deine Unterstützung, Ablenkung und schönen Momente waren sehr wichtig für mich in der Promotion, um immer wieder aus den Tiefs zu kommen. Außerdem möchte ich mich bei dir für Mika-Karlotta bedanken, die mich mehr oder weniger beim Schreiben dieser Arbeit unterstützt hat.