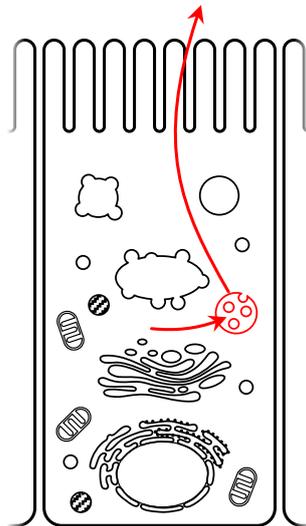


Aus dem Institut für Klinische Zytobiologie und Zytopathologie

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Roland Lill

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Der molekulare Mechanismus der Galektin-3-Rekrutierung in Multivesikuläre Körperchen zur polarisierten exosomalen Sekretion



Inaugural-Dissertation

**zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)**

Dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Sebastian Bänfer

aus Bad Berleburg – Richstein

Marburg, Mai 2018

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
21.08.2018

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Herr Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Herr Prof. Dr. Ralf Jacob

1. Korreferent: Herr Dr. Thomas Strecker

Für Herbert, als er noch ein kleiner Junge war.

Zusammenfassung

Das Deckgewebe aller inneren und äußeren Körperoberflächen wird aus epithelialen Zellen gebildet, denen eine charakteristische Gliederung in einen apikalen und einen basolateralen Zellpol gemein ist. Für den gerichteten Stofftransport und für die Integrität des Epithelgewebes ist der polare Proteintransport essenziell. Ein wesentliches Element stellen dabei Sortierrezeptoren dar, zu denen das β -Galaktosid-bindende Protein Galektin-3 gehört. Dieses Lektin sortiert und verbindet Glykoproteine in einem endosomalen Kompartiment zu hochmolekularen Clustern und dirigiert diese dadurch an den apikalen Zellpol.

Neben der Lokalisation im Endosom verfügt Galektin-3 im extrazellulären Raum über eine Schlüsselrolle in bedeutenden Prozessen wie der Immunmodulation oder der Signaltransduktion. Galektin-3 hat als Modulator folglich entscheidende Einflüsse auf die Tumorprogression, insbesondere die Angiogenese, sowie die Zelladhäsion, -Motilität und -Invasion. Galektin-3 trägt in sich keine Signal-Sequenz, die für eine Einsortierung in den klassischen, sekretorischen Weg für extrazelluläre Proteine sorgen könnte und wird unabhängig von dem Endoplasmatischen Retikulum/Golgi-Apparat exportiert. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von einer unkonventionellen Proteinsekretion. Sowohl der zugrundeliegende, biochemische Sekretionsmechanismus, der für die Sekretion von Galektin-3 verantwortlich ist, als auch die entsprechenden Sortiersignale sind bislang noch gänzlich unbekannt.

In dieser Arbeit konnte Galektin-3 exklusiv im Lumen apikal sekretierter Exosomen nachgewiesen werden. Mithilfe ultrastruktureller Analysen, die einerseits auf der ultrahochauflösenden Lichtmikroskopie und andererseits auf der Elektronenmikroskopie aufbauten, konnte der Prozess der Galektin-3-Sortierung in bisher unerreichter Auflösung visualisiert werden. Dieser Prozess erfolgte an spezialisierten endosomalen Kompartimenten, den Multivesikulären Körperchen, und bestand aus der Rekrutierung, Sortierung und der Verpackung von Galektin-3 in intraluminale Vesikel. Außerdem wurden Computer-gestützte Simulationen der drei distinkten Abknospungsstadien erstellt, um die ultrastrukturellen Daten abzusichern und um die erreichte Lokalisations-Präzision zu bewerten.

Für den Sortier- und Abschnürungsprozess wird ein spezieller Superkomplex benötigt, der passenderweise ESCRT-Komplex heißt (für *Endosomal Sorting Complex required for Transport*). Durch den *Knockdown* der Schlüsselkomponente Tsg101, die Verwendung eines spezifischen Inhibitors, sowie die Expression einer dominant-negativ wirkenden Mutante der AAA-ATPase Vps4a, konnte die exosomale Sekretion von

Galektin-3 unterbunden werden. Dies führte in der Folge zu einer intrazellulären Akkumulation auf der begrenzenden Membran der Multivesikulären Körperchen.

Durch eine *in silico* Gen-Analyse von 34 Wirbeltieren konnte ein hoch konserviertes Tetrapeptidmotiv PSAP im N-Terminus von Galektin-3 identifiziert werden, das zudem speziesübergreifend in bestimmten Abschnitten offensichtlich einer konvergenten Evolution unterlag. Zum ersten Mal konnte gezeigt werden, dass diese PSAP-Domäne Galektin-3 die direkte Bindung an Tsg101 ermöglicht. Durch diese direkte Interaktion werden die nachfolgende Sortierung und schließlich die exosomale Sekretion ausgelöst. Dementsprechend kann die direkte Interaktion durch die Mutation PSAP→ASAA unterbrochen werden, was zu einer erheblichen Verringerung der exosomalen Galektin-3-Sekretion führt. Bemerkenswerterweise konnte das PSAP-Sortiersignal auf das neutrale, exogen eingebrachte grün fluoreszierende Protein (GFP) übertragen werden, sodass GFP-PSAP im Gegensatz zum Wildtyp-GFP nunmehr exosomal sekretiert wurde. Der Prozess der Galektin-3-Sekretion steht damit in direkter Analogie zur viralen Freisetzung bestimmter behüllter Viren, wie z. B. dem Humanen Immundefizienz-, Ebola- und Marburg-Virus, die mithilfe der PSAP-Domäne den ESCRT-Komplex rekrutieren und direkt von der Plasmamembran abknospen können. Zusätzlich ergaben sich Hinweise auf eine mögliche funktionelle Rolle von Galektin-3 in der Sekretion von exosomalen Markerproteinen.

Galektin-3 könnte somit eine neue Gruppe von endogenen Proteinen definieren, die nicht zum ESCRT-Superkomplex gehören und die durch die Markierung mit dem PSAP-Motiv exosomal sekretiert werden. Diese Arbeit konzipiert somit ein einzigartiges Modell, wie endogene Cargoproteine durch die PSAP-vermittelte direkte Interaktion mit Tsg101 für die exosomale Sekretion rekrutiert werden können. Dies eröffnet zudem neue Möglichkeiten für die polarisierte unkonventionelle Sekretion von zytoplasmatischen Proteinen, die in der Zukunft auch in der biomedizinischen Praxis Anwendung finden könnten.

Summary

The encapsulating tissue of all inner and outer body surfaces is formed by epithelial cells, which share a characteristic structure divided in an apical and a basolateral cell pole. Polar protein transport is essential for directional transport and integrity of the epithelial tissue. An essential element here are sorting receptors, to which the β -galactoside binding protein galectin-3 belongs. This lectin, while residing in an endosomal compartment, sorts and crosslinks glycoproteins to high-molecular weight clusters, thereby directing them to the apical cell pole.

In addition to the localization in the endosome, extracellular galectin-3 has a key role in important processes such as immunomodulation or signal transduction. As a modulator, galectin-3 therefore has decisive influences on tumor progression, in particular angiogenesis, as well as cell adhesion, cell motility, and cell invasion. Galectin-3 does not carry a signal sequence that could provide for sorting into the classical, secretory pathway which is typical for extracellular proteins and is exported independently of the endoplasmic reticulum / Golgi apparatus. In this context, this process is called unconventional protein secretion. The underlying biochemical secretion mechanism responsible for the secretion of Galectin-3 and the corresponding sorting signals have not yet been described.

In this work, Galectin-3 could be detected exclusively in the lumen of apically secreted exosomes. Using ultrastructural analysis based on super-resolution light microscopy and electron microscopy, the process of Galectin-3 sorting could be visualized in unprecedented resolution. This sorting process was observed on the surface of specialized endosomal compartments, the multivesicular bodies. The mechanism consisted of the recruitment, sorting, and packaging of galectin-3 into intraluminal vesicles. In addition, computer-aided simulations of the three distinct budding stages were performed to validate the ultrastructural data and evaluate the localization precision achieved.

The sorting and pinching process requires a special super complex, appropriately called the ESCRT complex (for Endosomal Sorting Complex required for Transport). Knockdown of the key component Tsg101, the use of a specific inhibitor and the expression of a dominant-negative mutant of the AAA ATPase Vps4a prevented the exosomal secretion of galectin-3. This resulted in an intracellular accumulation on the limiting membrane of the multivesicular bodies.

An *in silico* gene analysis of 34 vertebrates identified a highly conserved tetrapeptide PSAP in the N-terminus of galectin-3, which was also found to be subject to convergent evolution across species. For the first time, it was shown that this PSAP domain allows galectin-3 to bind directly to Tsg101. This direct interaction triggers

subsequent sorting and finally exosomal secretion. Accordingly, the direct interaction can be interrupted by the mutation PSAP → ASAA, resulting in a significant reduction of exosomal galectin-3 secretion. Remarkably, the PSAP sorting signal can be transferred to the neutral, exogenously introduced green fluorescent protein (GFP), so that GFP-PSAP was exosomally secreted, in contrast to wild-type GFP. The process of galectin-3 secretion is thus in direct analogy to the viral release of certain enveloped viruses, such as HIV, Ebola, and Marburg virus, which recruit the ESCRT complex using the PSAP domain to bud directly from the plasma membrane. In addition, there was evidence for a possible functional role of galectin-3 in the secretion of exosomal marker proteins.

Galectin-3 could thus define a new group of endogenous proteins that do not belong to the ESCRT super complex, but which are exosomally secreted by the labeling with the PSAP motif. This work thus identifies a unique model of how endogenous cargo proteins can be recruited for exosomal secretion by a PSAP-mediated direct interaction with Tsg101. This provides new possibilities for the polarized unconventional secretion of cytoplasmic proteins, which could also be used in biomedical practice in the future.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Epithel	1
1.2	Proteintransport in polaren Epithelzellen	3
1.2.1	Der basolaterale Proteintransport	5
1.2.2	Der apikale Proteintransport	6
1.3	Galektine	10
1.3.1	Galektin-3	12
1.4	Unkonventionelle Proteinsekretion	14
1.4.1	Die unkonventionelle Sekretion von Gal3	19
1.5	Exosomale Sekretionsmaschinerie	20
1.5.1	ESCRT-0	22
1.5.2	ESCRT-I	23
1.5.3	ESCRT-II	23
1.5.4	ESCRT-III	24
1.5.5	Akzessorische Proteine	24
1.6	Fragestellung dieser Arbeit	26
2	Material und Methoden	27
2.1	Chemikalien und Reagenzien	27
2.2	Verbrauchsmaterialien	28
2.3	Geräte und Software	29
2.4	Antikörper	30
2.5	Lösungen, Medien und Puffer	31
2.6	Zellkultur	33
2.6.1	Zelllinie Madin-Darby <i>Canine Kidney</i> (MDCK-Typ-II)-Zellen	33
2.6.2	Kultivierung von MDCK-II-Zellen	36
2.6.3	Medien und Lösungen	36
2.6.4	Passage von MDCK-II-Zellen	36
2.6.5	Kryokonservierung von Kulturzellen	37

2.6.6	Stabile Transfektion von MDCK-II-Zellen (Lipofektion).....	37
2.6.7	Verwendete Zelllinien	39
2.6.8	RNA-Interferenz.....	39
2.7	Mikroskopie	41
2.7.1	Fluoreszenzmikroskopie	41
2.7.2	Lebendzellmikroskopie	42
2.7.3	Immunfluoreszenzfärbung	42
2.7.4	<i>Proximity Ligation Assay</i> (PLA).....	43
2.7.5	BacMam-Färbung.....	45
2.7.6	Konfokale Laser <i>Scanning</i> Mikroskopie (KLSM)	45
2.7.7	Ground State Depletion Microscopy Followed by Individual Molecule Return (GSDIM).....	47
2.7.8	3D-GSDIM-Mikroskopie.....	53
2.7.9	Picasso-Simulation	54
2.7.10	Transmissions-Elektronenmikroskopie.....	55
2.8	Zellbiologische Methoden	56
2.8.1	Exosomenpräparation.....	56
2.8.2	Mikrovesikelpräparation.....	57
2.8.3	Galektin-3-Endozytose	57
2.8.4	Sekretionsassay	58
2.8.5	Proteinase-K-Sensitivitätstest	58
2.9	Allgemeine proteinbiochemische Methoden.....	59
2.9.1	Herstellung von Zelllysaten.....	59
2.9.2	Proteinbestimmung nach Lowry.....	59
2.9.3	Proteinbestimmung nach Bradford.....	59
2.9.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	60
2.9.5	Coomassie-Färbung	61
2.9.6	Western Blot.....	61
2.9.7	Ko-Immunpräzipitation.....	62

2.10	Spezielle proteinbiochemische Methoden.....	63
2.10.1	Herstellung von rekombinalem Galektin-3	63
2.10.2	Größenausschlusschromatographie	65
2.10.3	Farbstoffmarkierung von rekombinalem Galektin-3.....	65
2.10.4	GFP-Pull-down	66
2.10.5	Laktose Pull-down	67
2.10.6	<i>In vitro</i> Pull-down	67
2.10.7	Goldmarkierung von GFP-Nanobody.....	68
2.10.8	Mikrothermophorese.....	68
2.11	Molekularbiologische Methoden.....	70
2.11.1	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	70
2.11.2	Mutagenese-PCR	71
2.11.3	Gelextraktion von DNA-Fragmenten	72
2.11.4	Restriktionsendonukleasebehandlung	72
2.11.5	Ligation.....	72
2.11.6	Transformation chemisch-kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Bakterien	73
2.11.7	Plasmidisolierung	73
2.11.8	Sequenzierung	75
2.12	Spektroskopie.....	75
2.12.1	Proteinkonzentrationsbestimmung mittels UV-Spektroskopie	75
2.12.2	Fluoreszenzpolarisation.....	76
2.12.3	Turbiditätsassay	76
2.12.4	Circulardichroismus (CD).....	77
2.13	Statistik.....	77
3	Ergebnisse	78
3.1	Gal3 befindet sich in apikalen Exosomen	78
3.2	Gal3 kolokalisiert mit MVB-assoziierten Proteinen.....	80
3.3	Die Visualisierung des Gal3-Sortierprozesses mittels ultrahochauflösender Mikroskopie.....	83

3.3.1	GSDIM.....	83
3.3.2	Elektronenmikroskopie	88
3.4	Gal3 interagiert direkt mit Tsg101	91
3.5	Der <i>Knockdown</i> von Tsg101 führt zu einer verringerten Gal3-Sekretion	95
3.6	Die dominant-negative Vps4a ^{E228Q} -Mutation inhibiert die Gal3-Sekretion.....	99
3.7	Ein hoch konserviertes PSAP-Tetrapeptid ist verantwortlich für die Interaktion mit Tsg101 und die exosomale Sekretion von Gal3.....	101
3.8	Gal3 könnte eine funktionelle Rolle in der Exosomen-Biogenese spielen ...	109
4	Diskussion	111
4.1	Die exosomale Sekretion von Gal3.....	112
4.2	Das PSAP-Motiv als Sortiersignal für die exosomale Sekretion von Gal3 ...	117
4.3	Die Freisetzung von exosomalem Gal3	125
4.4	Freies Gal3 im extrazellulären Raum.....	128
4.5	Ausblick	130
5	Literaturverzeichnis.....	134
6	Abkürzungsverzeichnis.....	160
7	Abbildungsverzeichnis.....	163
8	Tabellenverzeichnis.....	165
9	Formelverzeichnis	166
10	APPENDIX	167
10.1	Ergänzende 2D- und 3D-GSDIM-Daten.....	167
10.2	Publikationen.....	172
10.3	Lebenslauf	173
10.4	Verzeichnis der akademischen Lehrer	174
10.5	Ehrenwörtliche Erklärung.....	175
10.6	Danksagung	176

1 Einleitung

1.1 Das Epithel

Das Epithel gehört, neben Nerven-, Binde- und Muskelgewebe, zu den vier tierischen Grundgewebearten. Es handelt sich dabei um eine Zellschicht, die die Körperoberfläche, alle Körperhöhlen, sowie Blutgefäße und Organe bedeckt und abgrenzt. Epithelien weisen abhängig vom jeweiligen Organ eine besonders ausgeprägte, spezifische Differenzierung auf. Diese gewährleistet, neben den Schutz-, Sinnes und Resorptionsfunktionen der Oberflächenepithelien, auch Sekretions- bzw. Exkretionsmechanismen (Drüsenepithelien). Alle Epithelien dienen dementsprechend dem gerichteten, selektiven Stofftransport, der die Interaktion mit der Außenwelt und die Aufrechterhaltung der Körperhomöostase erst ermöglicht.

Für diesen spezifischen Transport und die epitheliale Funktion ist jedoch die Polarität der Epithelzelle essenzielle Voraussetzung. Diese Polarität beschreibt die dichotome Gliederung der Zelle in einen apikalen Zellpol, der dem Lumen zugewandt ist, sowie einem basolateralen Zellpol, der den benachbarten Zellen und der Basallamina mit dem darunter liegenden Bindegewebe angrenzt.

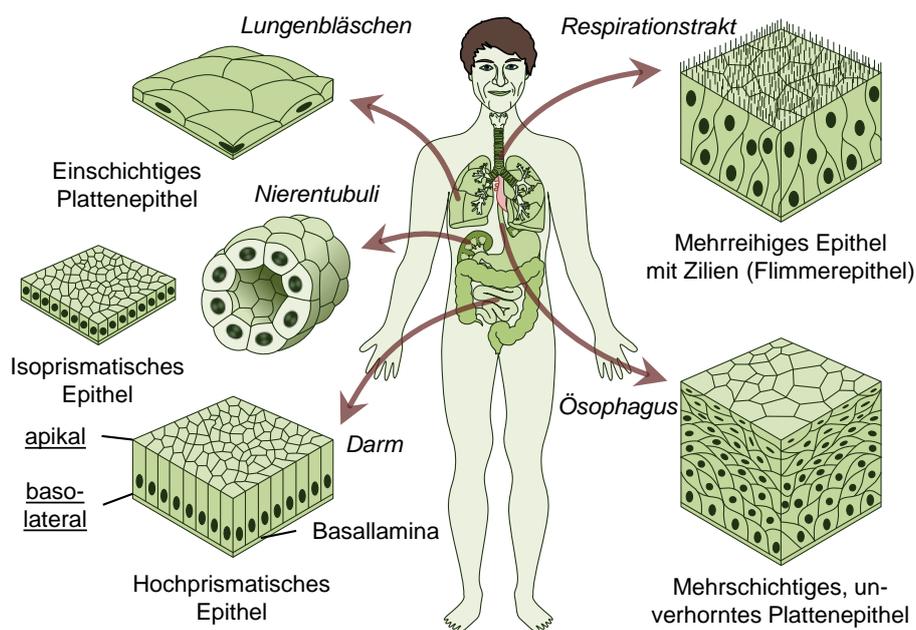


Abb. 1.1 Spezifische Differenzierung der Epithelien. Um den gerichteten Stofftransport zu bewerkstelligen, weisen alle Epithelien eine Polarität auf. Je nach Anpassung an die jeweiligen Aufgaben ist das Epithel spezifisch differenziert, sodass eine Klassifizierung vorgenommen werden kann.

Epithelien zeichnen sich insbesondere durch ihren außergewöhnlich dichten Verbund in einer kontinuierlichen (Grenz-) Schicht, sowie ihrer einzigartigen Verankerung untereinander und mit der Basalmembran aus. Dabei wird zwischen verschließenden Verbindungen (*Zonula occludens*) und verankernden Kontakten (*Zonula adhaerens/Macula adhaerens*) unterschieden. Die Adhäsionskontakte, zu denen Desmosomen sowie der Adhäsionsgürtel zählen, verleihen dem Epithel eine

mechanische Stabilität gegen Scherkräfte. Die Verbindung zwischen den Zellen wird durch verschiedene Ca^{2+} -abhängige Transmembranproteine, sog. Cadherine aufgebaut. Diese sind wiederum über den zytoplasmatischen Teil in einem Plaue verankert, der diese mit den Aktin- (*Zonula adhaerens*) bzw. mit den Intermediärfilamenten (*Macula adhaerens*) verbindet. Zusätzlich gehören Hemidesmosomen und Fokale Adhäsionen zu den verankernden Kontakten, die die Zellen über Integrine mit der extrazellulären Matrix verbinden.

Die gürtelartige Zell-Zell-Verbindung, die für die chemische Barriere des Epithels sorgt, die sog. *Zonula occludens* oder *Tight Junction*, ist gleichartig aufgebaut, wobei die integralen Proteine Occludin und Claudin über eine homophile Interaktion verbunden und über ZO-1, ZO-2 bzw. ZO-3 mit den Aktinfilamenten gekoppelt sind. Neben der Dichtigkeit etablieren *Tight Junctions* ebenfalls die Polarität des Epithels. Durch den festen Einbau an der Oberkante der Zelle verhindern sie die freie, laterale Diffusion von Membrankomponenten (sog. Zaunfunktion). Auf diese Weise definieren die *Tight Junctions* die apikale und basolaterale Domäne, die sich folglich biochemisch, d. h. funktionell und strukturell, unterscheiden (van Meer & Simons, 1986).

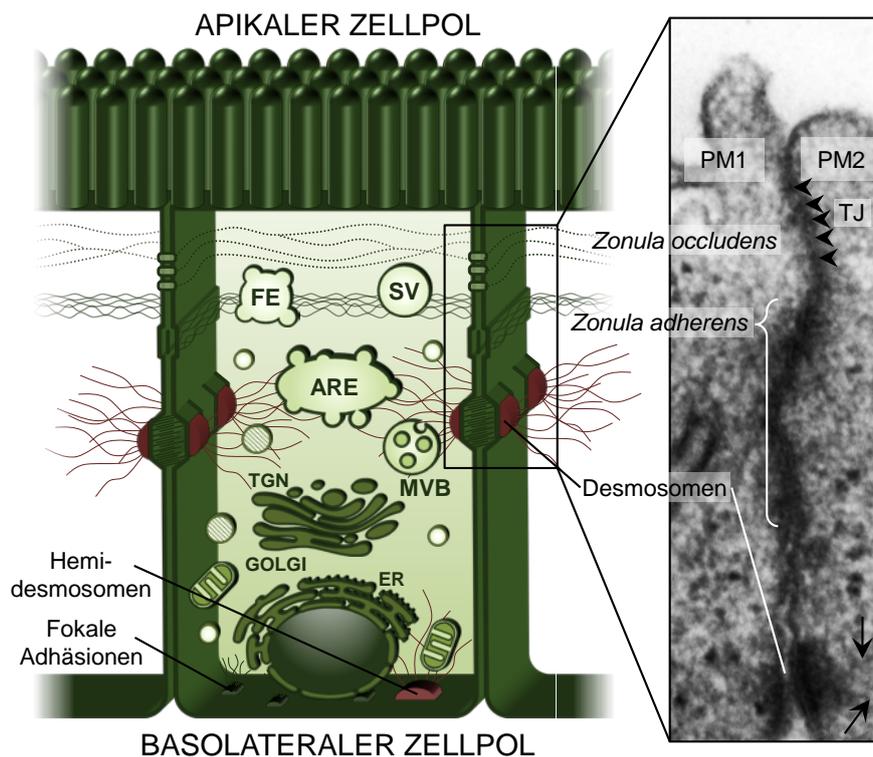


Abb. 1.2 Aufbau einer polaren Epithelzelle. Links: Schematischer Aufbau einer typischen polaren Zelle mit Mikrovilli. Neben den zellulären Kompartimenten, wie dem frühen Endosom (FE), dem apikalen Recycling-Endosom (ARE), dem sekretorischen Vesikel (SV) und dem Multivesikulären Körperchen (MVB), sind die Kontaktverbindungen der Epithelzellen dargestellt. Die für polare Epithelzellen essenziellen Zell-Zell-Verbindungen, die *Zonula occludens* und *Zonula adherens*, sowie die Desmosomen, sind besonders hervorgehoben (Rechteck). Rechts: Mithilfe der Elektronenmikroskopie wurde dieser Bereich zweier benachbarter MDCK-Zellen visualisiert. Besonders gut zu sehen sind die *Tight Junctions* (TJ, Pfeilköpfe) der *Zonula occludens*. Die ausstrahlenden Intermediär-Filamente der Desmosomen konnten ebenfalls abgebildet werden (Pfeile). PM, Plasmamembran; TGN, Trans-Golgi-Netzwerk, ER, Endoplasmatisches Retikulum.

Darüber hinaus weisen Epithelzellen weitere besondere Eigenschaften auf, die zudem den polarisierten Proteintransport betreffen: Mikrotubuli strahlen in Epithelzellen nicht radial mit ihrem Plus-Ende vom Zentrosom aus in den Zellcortex, sondern verlaufen parallel vom basolateralen (Plus-Ende) zum apikalen (Minus-Ende) Zellpol (Bacallao *et al.*, 1989, Bré *et al.*, 1990). Lediglich eine kleinere Fraktion, organisiert in einem irregulären Netzwerk unterhalb des apikalen Apex (Meads & Schroer, 1995), verfügt noch über einen Polymerisationsnukleus im Mikrotubuli-organisierenden Zentrum (MTOC), das in polarisierten Epithelzellen an die apikale Membran verschoben ist (Dylewski & Keenan, 1984). Die eigentliche Bildung des apiko-basal orientierten Mikrotubuli-Netzwerkes ist allerdings noch Zentrosom-abhängig (Feldman & Priess, 2012). Durch die Polarisations-bedingte Reorganisation des Mikrotubuli-Systems ist es demzufolge möglich, den Vesikel- bzw. Proteintransport spezifisch in die Richtung der jeweiligen Membrandomäne zu steuern (Müsch, 2004).

1.2 Proteintransport in polaren Epithelzellen

Wie essenziell ein intakter, feinregulierter Proteintransport in Epithelien ist, verdeutlichen zahlreiche Erbkrankheiten (s. Gissen & Maher, 2007), wie z. B. das Hermansky-Pudlak-Syndrom, das Griscelli-Syndrom, die Charcot-Marie-Tooth-Krankheit Typ 2a und 2b, die Hämophagozytische Lymphohistiozytose und das Usher-Syndrom, bei denen der Ausfall eines Bausteins der Sortier- und Transportmaschinerie sehr schwerwiegende Folgen hat (Neuropathien, Myopathien, Entwicklungsstörungen, Blindheit, Taubheit, Immundefekte etc.).

Beispiele für diese Bausteine sind die Rab-Proteine und Rab-regulierenden Proteine (GAP und GDI), Adapter-Proteine wie AP-3, sowie Motorproteine wie KIF1B, Myosin7 oder aber auch Syntaxin-11, das eine Rolle bei der Vesikelfusion spielt.

Doch die Polarität des Epithels dient nicht nur, angedeutet durch die verschiedenen Erbkrankheiten, der Homöostase des Organismus, sondern ist ebenfalls ein wichtiger Inhibitor der Tumorgenese (Royer & Lu, 2011). Über 80% aller bösartigen Tumore des Menschen sind Karzinome, welche aus dem Epithel heraus entstehen, darunter die aggressivsten Arten, wie dem Bronchial-, Pankreas-, Cervix- und Mammakarzinom, die mit einer hohen Metastasierung einhergehen (s. Bericht des Robert-Koch-Instituts, 2012). Die Tumorgenese und die invasive Infiltrierung anderer Gewebe sind immer verbunden mit dem Verlust der Polarität und damit auch der strengen Regulation des gerichteten Proteintransports (Goldenring, 2013).

Zudem beruhen die großen neurodegenerativen Krankheiten, Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson und Demenz, allesamt auf Störungen des intrazellulären Proteintransportes, die noch nicht ansatzweise ausreichend verstanden werden (George-Hyslop & Mobley, 2010, Hung & Link, 2011, Jiang *et al.*, 2014). Tatsächlich handelt es sich dabei um Proteinaggregationskrankheiten, in denen das

Entsorgungssystem der Zelle Proteinaggregate nicht mehr beseitigen kann. Es ist deshalb in vielerlei Hinsicht von besonderem wissenschaftlichem Interesse, grundlegende Mechanismen des Proteintransportes zu untersuchen und zu verstehen. Dies wird auch erkennbar an dem Nobelpreis für Medizin oder Physiologie 2013.

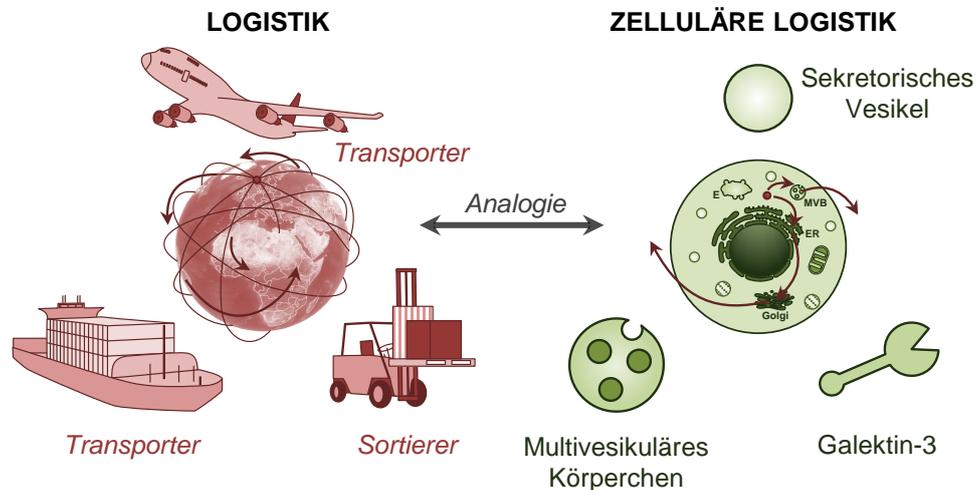


Abb. 1.3 Zelluläre Logistik. Zwischen der modernen Logistik und der zellulären Sekretionsmaschinerie herrscht eine interessante Analogie. In beiden Fällen wird die Fracht in verschiedene Transporter verpackt und auf die Reise an ihren Bestimmungsort geschickt. In der Zelle sind diese Transporter verschiedene Membran-umschlossene Vesikel. Wo jedoch Cargo verpackt wird, muss es auch Sortierer geben, die anhand von spezifischen Signalen für eine Sammlung der Fracht sorgen und diese zur korrekten Destination leiten. Ein solcher zellulärer Sortierrezeptor ist Galektin-3. Die Weltkugel wurde mithilfe des Programms *Google Earth Pro* erstellt.

Für gewöhnlich (Ausnahmen s. 1.4) beginnt der polarisierte Proteintransport mit der Erkennung einer kurzen N-terminalen Signalsequenz in der *messengerRNA* (mRNA) durch ein sog. Signalerkennungspartikel (SRP) auf der Oberfläche des Endoplasmatischen Retikulums (ER). Das SRP sorgt dafür, dass die zu translatierende mRNA mit dem Ribosom zum ER rekrutiert wird (sog. raues ER), was alsdann in der direkten Translation der Polypeptidkette in dem ER-Lumen mündet. Daraufhin erfolgen schließlich Faltung und posttranslationale Modifikationen, wie z. B. Glykosylierungen oder die Addition von Membranankern. Nach einer Qualitätskontrolle werden die Proteine dann in membranumhüllte Vesikel verpackt und spezifisch an die jeweiligen Zielkompartimente versandt. Die zelluläre Maschinerie, die den Vesikeltransport reguliert und leitet muss drei kritische Schritte katalysieren: 1. Die Anreicherung des Zielproteins und das Abknospen des Vesikels. 2. Den gerichteten, zielorientierten Transport des Vesikels. 3. Die Fusion des Vesikels mit der korrekten Zielmembran. Kurzum, die wichtigsten Eckpfeiler einer effizienten zellulären Logistik, die die Polarität der Zelle etablieren, sind die spezifische Verpackung, Transport und zielgenaue Auslieferung der Proteine. Wesentliche Elemente, insbesondere die Sortierung apikaler Proteine und die Mechanismen der Abknospung sind zurzeit noch wenig verstanden.

Um das Zielprotein an der jeweiligen Lokalisation konzentrieren zu können, müssen Proteine intrinsische Sortiersignale aufweisen, wie z. B. Protein-Modifikationen

oder topogene Sequenzen. Diese werden wiederum von bestimmten Sortier-Elementen erkannt und abgelesen, was zu einer Akkumulierung an der Position führt, an dem das Transport-Vesikel abgeschnürt wird. Im sekretorischen System ist der folgende Schritt, die Abknospung des Vesikels, u. a. abhängig von spezifischen Mantelproteinen, wie z. B. COPII (anterograd ER-Golgi), COPI (retrograd Golgi-ER) und Clathrin (Endosomales Kompartiment), sowie Membran-krümmenden Proteinen wie z. B. Proteinen mit BAR-Domäne. Anschließend werden die Vesikel am Zytoskelett entlang mittels Motorproteinen transportiert, wie z. B. Kinesin (in der Regel Plus-Ende der Mikrotubuli) und Dynein (Minus-Ende der Mikrotubuli). Anterograder und retrograder Transport sind essenziell für die Generierung und Aufrechterhaltung der jeweiligen strukturellen und funktionellen Eigenschaften des jeweiligen Kompartiments, was die polarisierte Epithelzelle im Besonderen betrifft. Zu guter Letzt dirigieren spezielle *Tethering Factors* die Transport-Vesikel zum gewünschten Zielort, wo es abschließend zur Fusion des Vesikels mit der Membran kommt. Zu diesen „Dirigenten“ gehören u. a. Rab-GTPasen, durch die die verschiedenen endosomalen Kompartimente charakterisiert sind. Die Rab-Proteine wiederum rekrutieren durch einen regulierten Konformationszyklus das jeweilige Vesikel-SNARE. Dieses induziert mit dem passenden *Target-SNARE*, unter Ausbildung einer sog. *Coiled-coil*-Struktur, letztendlich die Fusion von Vesikel- und Akzeptormembran und veranlasst damit die Ab- bzw. Übergabe der jeweiligen Fracht.

1.2.1 Der basolaterale Proteintransport

Die spezifische Markierung durch verschiedene universelle Sortiersignale stellt die fundamentale Grundlage für einen gerichteten, polaren Proteintransport dar. Dies gilt insbesondere für basolateral dirigierende Signale. Diese basieren auf bestimmten Aminosäuresequenzen, sind also topogene Signale, die meist in der zytoplasmatischen Proteindomäne zu finden sind (Mostov *et al.*, 1986, Casanova *et al.*, 1991) und gegenüber apikalen Sortiersignalen dominant sind (Hunziker *et al.*, 1991, Le Bivic *et al.*, 1991, Brewer & Roth, 1991, Simons & Ikonen, 1997). Jedoch gibt es auch hier Ausnahmen, da z. B. die Laktase-Phlorizin-Hydrolase (LPH) trotz angefügtem, basolateralem Sortiersignal weiterhin apikal transportiert wird (Jacob *et al.*, 1999). Bei den basolateralen Sortiersignalen handelt es sich u. a. um hydrophobe Dileucin- (Miranda *et al.*, 2001) oder Tyrosin-Motive (YXX ϕ sowie NPXY; X=beliebige Aminosäure (AS), ϕ =hydrophobe AS; beide Motive finden sich beispielsweise im LDL-Rezeptor; Matter *et al.*, 1992). Diese Motive werden von verschiedenen Adapterkomplexen, z. B. AP1B (Roush *et al.*, 1998, Folsch *et al.*, 1999) oder AP4 (Simmen *et al.*, 2002) gebunden. Diese Interaktion resultiert indessen in der Rekrutierung von Clathrin, was schließlich die Abknospung und die Formierung von sog. *Clathrin coated Vesicles* bewirkt, die zum basolateralen Zellpol transportiert werden (Deborde *et al.*, 2008). Folglich kongruiert der basolaterale Sortierprozess mit der Endozytose (Rodriguez-Boulán & Müsch, 2005).

1.2.2 Der apikale Proteintransport

In dem apikalen Weg sind solche topogenen Signale nicht bekannt, sondern hier beruht die Proteinsortierung vielmehr auf der posttranslationalen Modifikation der Proteine und vor allem auf intermolekularen Wechselwirkungen in komplexen Protein-Clustern. Das erste bekannte, nach apikal leitende Sortiersignal war die Modifikation der terminalen Carboxygruppe eines Proteins mit einem Glykosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) im ER (Lisanti *et al.*, 1988, Lisanti *et al.*, 1989a). Beginnend im TGN, akkumulieren mit GPI-Anker versehene apikale Proteine in bestimmten Membranmikrodomänen des (späteren) exoplasmatischen Blattes, die als *Detergent resistant Membrane* (DRM) oder *Lipid Rafts* bezeichnet werden (Brown & Rose, 1992). *Lipid Rafts* sind cholesterol- sowie sphingolipidreich und assemblieren zu funktionell eigenständigen, floßartigen Strukturen in der Membran (Simons & Ikonen 1997; vgl. auch *in vitro* Estep *et al.*, 1979). Diese abgeschlossene Kompartimentierung wird besonders verdeutlicht durch die Tatsache, dass diese Strukturen bei 4°C im Detergens Triton X-100 nicht löslich sind (DRM; Hooper 1999). Es ergibt sich somit für die Membran eine Struktur, die als flüssigkristalline ungeordnete Phase L_{α} aufgefasst wird, in der sich die rigiden *Lipid Rafts* als separierte, geordnete Phase L_0 bewegen (Schroeder *et al.*, 1994, Ahmed *et al.*, 1997). Kai Simons und Gerrit van Meer postulierten, dass apikale Proteine mit GPI-Anker allein durch die Wechselwirkung mit den *Lipid Rafts* zum apikalen Zellpol transportiert werden (van Meer & Simons, 1988). Tatsächlich kommen endogene GPI-Proteine in epithelialen Zellen fast ausschließlich auf der apikalen Membran vor (Lisanti *et al.*, 1989b). Neuere Erkenntnisse zeigen jedoch, dass die GPI-vermittelte apikale Proteinsortierung deutlich komplexer ist: Auf der einen Seite reicht ein molekularbiologisch angebrachter GPI-Anker allein dennoch nicht aus, eine apikale Lokalisation zu induzieren (Paladino *et al.*, 2004, Benting *et al.*, 1999) und andererseits wird das exogen in MDCK-Zellen eingebrachte Prionenprotein PrPC nach basolateral sortiert (Sarnataro *et al.*, 2004). Des Weiteren besitzen verschiedene Proteine, wie die Saccharase-Isomaltase (SI), Hämagglutinin oder Neuraminidase keinen GPI-Anker, sind aber trotzdem mit *Lipid Rafts* assoziiert und werden an den apikalen Zellpol geleitet. Demgemäß konnte mittels Deletionsmutanten belegt werden, dass ein bestimmter Teil der Transmembrandomäne der Influenza-Proteine Hämagglutinin bzw. Neuraminidase gleichermaßen zur Akkumulation in *Lipid Rafts* führt, wie auch die apikale Sortierung bedingt (Lin *et al.*, 1998, Kundu *et al.*, 1996). Rhodopsin hingegen scheint das Signal für die apikale Sortierung im zytoplasmatischen Teil der Aminosäuresequenz codiert zu haben (Chuang & Sung, 1998). Interessanterweise konnten Paladino und Kollegen mit ihren Arbeiten nachweisen, dass für eine erfolgreiche apikale Lokalisation von GPI-Proteinen in MDCK-Zellen vielmehr die Verflechtung bzw. Oligomerisierung in hochmolekularen Proteinkomplexen oder sog. Clustern die essenzielle Bedingung ist

(Paladino *et al.*, 2004, Tivodar *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu scheinen basolaterale GPI-Proteine in den DRMs nicht zu oligomerisieren, was verdeutlicht, dass die essenzielle Bildung von Clustern exklusiv apikalen GPI-Proteinen vorbehalten zu sein scheint. Besonders eindrucksvoll ist in diesem Zusammenhang zudem, dass mutierte, nunmehr Oligomerisierungs-unfähige Proteine an den basolateralen Zellpol fehlsortiert werden (Paladino *et al.*, 2004).

Die zweite Gruppe nach apikal dirigierender Sortiersignale umfasst Glykosylierungen, d. h. posttranslational angeheftete Zuckermolekülketten. Dabei kommen sowohl N- als auch O-Glykosylierungen als Sortiersignal vor. Beide Glykosylierungsmuster werden anhand ihrer Verankerung im Peptidrückgrat und dem Ort ihrer Synthese unterschieden: N-Glykosylierungen werden auf Asparagin im ER übertragen, O-Glykosylierungen hingegen im Golgi-Apparat auf Serin, Threonin oder Hydroxylysin. In Hinblick auf O-Glykosylierungen konnte z. B. mittels Deletionsmutanten in polarisierten MDCK-Zellen nachgewiesen werden, dass für den apikalen Transport des Neurotrophinrezeptors p75^{NTR} die O-glykosylierte Stabregion entscheidend ist (Yeaman *et al.*, 1997).

Wie wichtig auf der anderen Seite N-Glykosylierungen sind, konnte durch die Verwendung von Inhibitoren der N-Glykosyltransferasen, wie z. B. Tunicamycin, untersucht werden. So verhindert Tunicamycin die Synthese des Oligosaccharid-*precursors*, der im ER an Dolichol gebunden ist und verschiedenste Modifikationen im Verlauf der N-Glykosylierung erfährt. Einerseits verhindert die Inhibition der N-Glykosylierung mittels Tunicamycin in polaren Epithelzellen die apikale Sekretion von gp80/Clusterin (Urban *et al.*, 1987). Andererseits ist es möglich, durch das Einfügen zweier N-Glykosylierungsstellen, das in MDCK-Zellen zuvor nicht gerichtet sekretierte *rat Growth* Hormon ausschließlich nach apikal transportieren zu lassen (Scheiffele *et al.*, 1995).

Gleichwohl ist die Rolle der N-Glykosylierung komplexer, da es keine einheitlichen Muster oder universelle Codes in Hinblick auf die Struktur der Glykane gibt, die mit einer apikalen Proteinsortierung einhergehen. Aus diesem Grund zieht nicht jede N-Glykosylierung auch einen apikalen Transport nach sich, erkennbar am Beispiel von Endolyn, das dazu nur zwei ganz bestimmte der acht N-Glykanketten benötigt (Potter *et al.*, 2004).

Auch in Hinblick auf die Struktur der Glykane zeichnet sich offenkundig ein nicht einheitliches Bild ab: Auf der einen Seite zeigen Experimente mit einer bestimmten MDCK-II-Mutante, sog. RCA⁻-Zellen (s. dazu Le Bivic *et al.*, 1993; Defekt in der UDP-Galaktose-Importmaschinerie im Golgi-Apparat), dass nur das Kernoligosaccharid, ohne terminale Galaktose- oder Sialinsäure-Verzweigungen, für eine effektive apikale

Translokation von gp80/Clusterin verantwortlich ist (Parczyk & Koch-Brandt, 1991). Auf der anderen Seite stehen die Ergebnisse von Le Bivic und Kollegen, wonach gp114 in RCA^r-Mutanten nicht mehr nach apikal geleitet, sondern basolateral fehlsortiert wird (Le Bivic *et al.*, 1993; vgl. aber Potter *et al.*, 2006). Darüber hinaus verhindern Mannosidase I und II-Inhibitoren die apikale Lokalisation von Endolyn, nicht aber Glucosidase-Inhibitoren (Potter *et al.*, 2004). Hier spielt folglich die Prozessierung eine essenzielle Rolle für die apikale Sortierung. Wie uneinheitlich die Wirkung der Glykanprozessierungen ist, verdeutlicht zusätzlich die Beobachtung, dass in HT-29- und Caco-2-Zellen der korrekte apikale Transport der Dipeptidylpeptidase IV auf die Aktivität der Mannosidase II angewiesen ist. Interessanterweise ist diese Dipeptidylpeptidase aber noch zusätzlich von einer Wechselwirkung mit *Lipid Rafts*, sowie einer O-Glykosylierung abhängig (Alfalah *et al.*, 2002). Des Weiteren konnte auch für die SI gezeigt werden, dass die O-glykosylierte Stabregion für eine Assoziation mit DRMs und, daraus resultierend, für den apikalen Transport sorgt (Jacob *et al.*, 2000). Der *Raft*-unabhängige und *Raft*-abhängige Transport sind folglich nicht strikt voneinander getrennt.

Die erstaunliche Variabilität in den Glykosylierungsmustern apikal transportierter Proteine spricht für einen Sortiermechanismus, der besonders auf intermolekularen Wechselwirkungen beruht. Diese Erkenntnis führt unweigerlich zu der Frage der Identität und Wirkungsweise der Sortier-„Rezeptoren“, sowie deren Lokalisation im sekretorischen Kompartiment. Zunächst wurde das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) als die zentrale Sortierstation des apikalen Proteintransports angenommen (Rodriguez-Boulan *et al.*, 1984, Rindler *et al.*, 1984). Spätere Arbeiten stützten diese Annahme zusätzlich (Paladino *et al.*, 2006, Hua *et al.*, 2006). Schließlich konnte jedoch auch gezeigt werden, dass verschiedene Proteine erst später in einem endosomalen Kompartiment sortiert werden. Die apikalen Membranproteine LPH, SI und Endolyn durchlaufen nämlich zunächst gemeinsam mehrere Endosomen, bevor diese später durch verschiedene Sortiermechanismen erkannt werden (s. unten). Für die LPH und SI konnte sogar in lebenden MDCK-Zellen eine Sortierung in einem Post-Golgi-Kompartiment fluoreszenzmikroskopisch visualisiert werden, die schließlich in zwei unterschiedlichen Vesikelpopulationen mündet und dementsprechend auf unterschiedliche Sortiermechanismen hindeutet (Jacob & Naim, 2001). Später konnte für beide Proteine ein Transport durch Rab4, -8 und -11 positive Kompartimente nachgewiesen werden (Cramm-Behrens *et al.*, 2008). Die genaue Lokalisation dieses Sortierprozesses, z. B. anhand eines Rab-Proteins, ist bis heute allerdings umstritten (Weisz & Rodriguez-Boulan, 2009).

Wie oben bereits angedeutet, scheinen intermolekulare Wechselwirkungen innerhalb verschiedener Protein-Cluster für den apikalen Sortierprozess eine essenzielle

Voraussetzung zu sein (Paladino *et al.*, 2004, Paladino *et al.*, 2007, Hannan *et al.*, 1993). In diesem Zusammenhang konnten die beiden Galaktose-bindenden Lektine Galektin-3 (Gal3) und Galektin-4 (Gal4) als Sortierrezeptoren identifiziert werden (Delacour *et al.*, 2005, Delacour *et al.*, 2006). Beide Proteine schließen die zu sortierenden Proteine in großen, hochmolekularen Clustern zusammen und sorgen durch eine Selbst- und Kreuzvernetzung für deren Rekrutierung und Anreicherung am Ort der Vesikelknospung (s. Abb. 1.4). Beide Lektine haben unterschiedliche Bindepartner, die dem oben beschriebenen *Lipid Raft*-abhängigen bzw. -unabhängigen Weg entsprechen. Gal4 bindet zuckerabhängig u. a. sowohl an *Lipid Raft*-abhängige Glykoproteine, als auch an Sulfatide der *Lipid Rafts* selbst, wodurch die Kreuzvernetzung induziert wird (Delacour *et al.*, 2005, Morelle *et al.*, 2009). Diese Erkenntnisse werden zudem durch Arbeiten von Braccia *et al.* an isolierten *Lipid Rafts* gestützt, die durch die Inkubation mit Laktose eine Freisetzung von Gal4 und *Raft*-abhängigen Proteinen auslösen konnten (Braccia *et al.*, 2003). Des Weiteren führt ein *Knockdown* von Gal4 in HAT-29-Zellen zu einer Akkumulation *Raft*-abhängiger Proteine in Post-Golgi-Endosomen, sodass diese den apikalen Zellpol nicht mehr erreichen konnten (Stechly *et al.*, 2009). Interessanterweise konnte diese Akkumulation durch die Zugabe von rekombinantem Gal4 wieder aufgehoben werden.

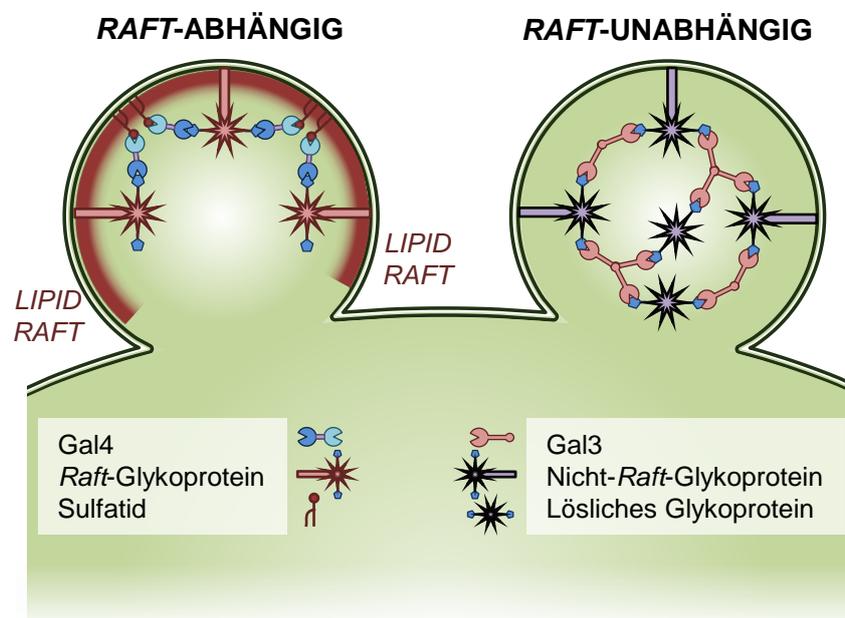


Abb. 1.4 Modell der Galektin-vermittelten Proteinsortierung in einem Post-Golgi-Kompartiment. Galektin-3 und -4 verbinden durch direkte Interaktion verschiedene Glykoproteine zu hochmolekularen Clustern, die direkt oder indirekt zu einer Membrankrümmung und schließlich zur Abschnürung der Transportvesikel führen können. Gal3 oligomerisiert dabei mit *Raft*-unabhängigen Glykoproteinen, wohingegen Gal4 der Sortierrezeptor der *Raft*-abhängigen Proteine ist. Gal4 bindet zusätzlich direkt an spezielle Glykosphingolipide, sog. Sulfatide, die über lange, hydroxylierte Fettsäureketten verfügen.

Der Sortierrezeptor der *Raft*-unabhängigen Proteine, Gal3, wurde durch die Aufreinigung LPH-assoziiierter Vesikel identifiziert (Delacour *et al.*, 2006). Ein *Knockdown* von Gal3, sowohl in MDCK-Zellen als auch in Enterozyten der Maus, resultiert dementsprechend

in einer basolateralen Fehlsortierung der *Raft*-unabhängigen Proteine p75^{NTR}, gp114 und LPH (Delacour *et al.*, 2008). Das hervorstechende Merkmal ist auch hier, ganz ähnlich zum Modell der Gal4-vermittelten, *Raft*-abhängigen Proteinsortierung, die Vernetzung zu oligomeren Clustern als eine Voraussetzung für eine erfolgreiche apikale Beförderung (Delacour *et al.*, 2007).

Kurzum, die Anreicherung der zu transportierenden Proteine in distinkte, oligomere Cluster und die daraus resultierende Vernetzung durch die Sortierrezeptoren, ist der zugrundeliegende Mechanismus der apikalen Proteinsortierung. Gewissermaßen ist dieser Prozess dadurch vergleichbar mit dem basolateralen Transport, dem ER-Golgi-Transit und der Endozytose, jedoch spielen dabei Adapter- und Mantelproteine eine wichtige Rolle. Vor allem in Hinblick auf Membrankrümmung und -Abschnürung sind wichtige Aspekte des apikalen Transportmechanismus unklar. Interessant ist dahingehend die Entdeckung der Dynamin-ähnlichen Proteine FAPP2 für den *Raft*-abhängigen (Vieira *et al.*, 2005, Cao *et al.*, 2012) und Mx1 für den *Raft*-unabhängigen Transport (Hoff *et al.*, 2014). Mx1 ist zudem in der Lage *in vitro* Membranen zu tubulieren (von der Malsburg *et al.*, 2011). Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang auch die Entdeckung, dass Gal3 die alleinige, aktiv-funktionelle Rolle bei der Entstehung von sog. *Clathrin-independent Carriers* (CLICs) spielt und durch die Wechselwirkung mit Glykoproteinen und Glykosphingolipiden eine Membrankrümmung induziert (Lakshminarayan *et al.*, 2014).

1.3 Galektine

Lektine (lat. *legere*; lesen, auslesen, auswählen) sind Proteine die spezifisch an Zucker oder Zuckerreste von Glykoproteinen und -Lipiden binden, selbst aber keine enzymatische Aktivität besitzen. Lektine sind ubiquitär verbreitet und finden sich sowohl in Bakterien und Tieren, als auch in Pflanzen (Gabijs, 1997). Allen Lektinen sind sog. *Carbohydrate Recognition Domains* (CRD) gemein, die sich jedoch in ihrer Zuckerspezifität unterscheiden und anhand derer sich dementsprechend eine Klassifizierung in verschiedene Lektinfamilien ergibt. So zeichnet sich die Proteinfamilie der Galektine dadurch aus, dass deren kanonische CRD eine Bindespezifität für β -Galaktoside aufweist, wie z. B. Laktose oder N-Acetyllaktosamin ([Gal(NAc) β 1-3/4GlcNAc] und speziell für Gal3 die Struktur [-3Gal β 1-4GlcNAc β -]_n), die in N- und O-Glykosylierungen vorkommt. Die Struktur der CRD ist evolutionär sehr stark konserviert, was durch das Vorkommen in Pilzen wie *Coprinopsis cinerea* und dem Schwamm *Geodia cydonium* verdeutlicht wird (Pfeifer *et al.*, 1993, Cooper *et al.*, 1997). Dies zeigt auch auf besonders eindrucksvolle Art und Weise, wie alt und grundlegend die zelluläre Funktion der Galektin-Familie ist.

Das erste bekannte Galektin, Elektrolektin genannt, wurde in den elektrischen Organen des Zitteraals nachgewiesen, wo es sich vergleichbar mit anderen Lektinen

durch seine Hämagglutination ausgezeichnete und mittels β -Galaktosiden aufgereinigt werden konnte (Teichberg *et al.*, 1975). Da die Aktivität des Elektrolektins von hinzugefügtem β -Mercaptoethanol abhing, ging man fälschlicherweise davon aus, dass dieses Lektin Sulfhydryl- bzw. Cystein-abhängig sei. Galektine wurden aus diesem Grund zunächst als S-Typ Lektine bezeichnet (analog zu Calcium-abhängigen C-Typ Lektinen) und um zusätzlich auf deren Löslichkeit (*Solubility*) hinzuweisen. Erst im Jahr 1994 einigte sich die Forschungsgemeinschaft auf eine Systematisierung der Nomenklatur (Barondes *et al.*, 1994): Elektrolektin (bzw. *β -Galactoside-binding Lectin*, Galaptin, L-14 etc.) wurde zu Galektin-1 (Gal1), das nächste Homolog zu Galektin-2 und das Anfang der 80er Jahre durch mehrere Gruppen beschriebene IgE-binding protein (ϵ BP), CBP35, L-29, L-31 bzw. Mac-2 schließlich zu Galektin-3. Alle danach entdeckten Galektine wurden gemäß der Reihenfolge ihrer Isolierung fortlaufend benannt. In Säugetieren sind inzwischen 15 verschiedene Galektine beschrieben. Verschiedene Vertreter kommen gleichzeitig in einer Spezies vor. In der Maus beispielsweise sind bis zu 15 einzelne Galektine beschrieben, im Menschen dagegen 12. In Nagetieren kommen auch die Spezies-spezifischen Galektine, Gal5 und -6, vor. Zusätzlich gibt es noch weitere eng verwandte Proteine, die zwar eine ausgeprägte Homologie, jedoch keine oder nur geringe Bindung an β -Galaktoside vorweisen. Dazu zählen vor allem Angehörige der Galektin-10-Familie, wie z. B. *Galectin-related interfiber protein* (GRIFIN) (Ogden *et al.*, 1998), *Placental protein 13* (PP-13) (Than *et al.*, 1999) und mehrere andere, die keiner Subfamilie zugeordnet werden können, wie z. B. *Galectin-related protein* (GRP oder HSPC159) (Zhang *et al.*, 2000).

Kurze Zeit nach der Entdeckung des Elektrolektins durch Teichberg und Kollegen wurde Gal1 im Muskelgewebe von Hühnern, sowie in Extrakten aus Kälberlungen und -Herzen nachgewiesen (Nowak *et al.*, 1977, de Waard *et al.*, 1976). Zur Isolierung von Säuger-Gal1 wurde Laktose oder Asialofetuin-Sepharose verwendet. Gal3 wurde zunächst als Makrophagen-Oberflächenantigen beschrieben (Ho & Springer, 1982). Kurze Zeit später wurde für Gal3 die Rolle als β -Galaktosid-bindendes Protein in Fibroblasten der Maus und des Menschen belegt (Roff *et al.*, 1983, Roff & Wang, 1983). Weitere Gruppen identifizierten Gal3 als sog. IgE-bindendes Protein in *Rat Basophilic Leukemia* (RBL) Zellen (Liu *et al.*, 1985, Robertson *et al.*, 1990), RL-29 in der Lunge der Ratte (Cerra *et al.*, 1985) bzw. HL-29 in der humanen Lunge (Sparrow *et al.*, 1987), L-34 in Onkogen-transfizierten embryonalen Fibroblasten der Ratte (Raz *et al.*, 1987), sowie als ein *Non-Integrin Laminin binding Protein* (LBP) in Makrophagen (Woo *et al.*, 1990).

Anhand ihrer Struktur und der Organisation der CRD werden Galektine in drei verschiedene Klassen eingeteilt (s. Abb. 1.5). Der sog. Prototyp (Gal1, -2, -5, -7, -10, -

11, -13, -14, und -15), der nur über eine einzelne CRD verfügt, kann bei einigen Vertretern über die CRD untereinander Dimere bilden. Der *Tandem repeat*-Typus (Gal4, -6, -8, -9, -12) besteht wiederum aus zwei CRD-Domänen, die über eine Linkersequenz miteinander verknüpft sind. Gal3 ist der einzige Vertreter des chimären Typs: Neben der CRD (C-Terminus) verfügt Gal3 noch über eine einzigartige, repetitive Prolin-, Tyrosin- und glycinreiche Domäne am N-Terminus (Leffler *et al.*, 2004, Hirabayashi & Kasai, 1993).

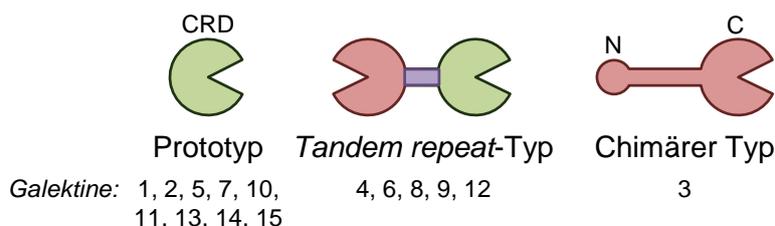


Abb. 1.5 Klassifizierung und Struktur der Galektinfamilie. Die einzelnen Vertreter werden anhand ihrer Struktur in drei verschiedene Klassen eingeteilt. Mitglieder vom Prototyp weisen nur eine einzelne Kohlenhydraterkennungsdomäne (CRD) auf. Der *Tandem repeat*-Typus zeichnet sich durch zwei CRDs aus, die über eine Linkersequenz verbunden sind und eine unterschiedliche Feinspezifität besitzen. Als einziger Vertreter des chimären Typs gilt Gal3, das aus einer C-terminalen CRD und einer einzigartigen N-terminalen Domäne besteht.

1.3.1 Galektin-3

Die kanonische CRD von Gal3 weist eine Sequenzhomologie von 30-40% mit Vertretern

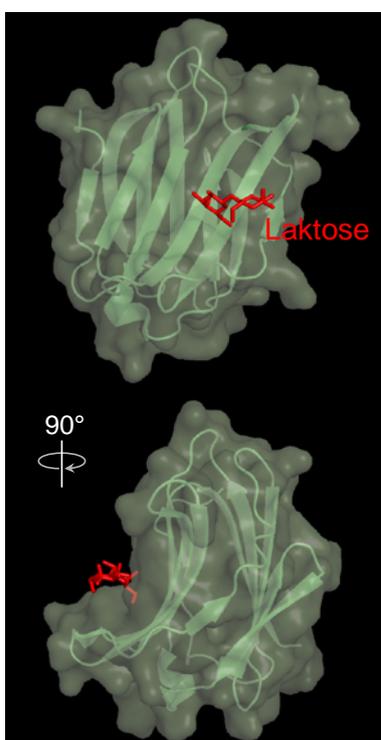


Abb. 1.6 Struktur der Gal3-CRD. Laktose (dargestellt als Stabmodell in rot) nimmt als kleiner Ligand nur einen geringen Teil der Gal3-Bindetasche in Anspruch. Zur Visualisierung wurde die Struktur der humanen Gal3-CRD verwendet (PDB-ID 3zsj). Dargestellt mithilfe des Programms PyMOL 2.1.

der Familien Gal4 bis -10 auf, mit Gal1 und -2 jedoch nur zu 20-25%. Interessanterweise besitzt Gal3 zwar in etwa die gleichen Affinitäten für Laktose ($K_d = 1 \text{ mM}$) und N-Acetyllaktosamin ($K_d = 0,2 \text{ mM}$), bindet im Unterschied aber mit höherer Affinität auch größere Oligosaccharide (Leffler & Barondes, 1986, Knibbs *et al.*, 1993).

Nachdem zunächst die Kristallstrukturen von Gal1 (Liao *et al.*, 1994) und -2 (Lobsanov *et al.*, 1993) veröffentlicht wurden, konnte im Jahr 1998 zum ersten Mal die Kristallstruktur der Gal3-CRD abgebildet werden (Seetharaman *et al.*, 1998). Die für Galektine außergewöhnliche N-terminale Domäne, deren Länge zwischen 120 (human) und 166 (canin) Aminosäuren variiert, lässt sich nicht kristallografisch darstellen. Die Gal3-CRD besitzt die typische, charakteristische Topologie, wie die der anderen Galektine. So besteht die Zuckerbindungstasche aus einer β -Sandwichstruktur, die sich aus zwei Blättern mit je sechs (sog. S1-S6) bzw. fünf β -Strängen (F1-F5) zusammensetzt (Seetharaman *et al.*, 1998). Die Gal3-Bindetasche ist auf beiden Seiten offen,

was auch die Bindung an längere Oligosaccharide erklärt. Dabei sind es die äußeren, weniger stark konservierten Bindestellen, die die Affinität für längere, komplexere Oligosaccharide erhöhen. Dies begründet im Übrigen auch die unterschiedliche Feinspezifität der einzelnen Galektine (Leffler *et al.*, 2004, Carlsson *et al.*, 2007, Horlacher *et al.*, 2010). Dies gilt in besonderem Maße für Gal3 und äußert sich ferner in einer evolutionär angepassten Affinität bzw. Feinspezifität (Salomonsson *et al.*, 2010).

Die CRD initiiert ebenfalls Zucker-abhängige homophile Interaktionen von Gal3 (Kuklinski & Probstmeier, 1998). Erstaunlicherweise konnte die Oligomerisierung der CRD (sog. C-Typ) bis hin zu CRD-Trimeren im Elektronenmikroskop visualisiert werden (Birdsall *et al.*, 2001). Daneben verfügt Gal3 innerhalb der CRD noch über ein NWGR-Motiv, das in Proteinen der Bcl-2-Familie hoch konserviert ist (Yang *et al.*, 1996, Akahani *et al.*, 1997). Mithilfe dieses Tetrapeptids bindet Gal3 Laktose-abhängig an Bcl-2 (vgl. Hanada *et al.*, 1995). Dies erklärt auch die mannigfaltigen Einflüsse dieses Lektins auf den Zellzyklus und die Apoptose (Nangia-Makker *et al.*, 2007). Interessanterweise scheint das NWGR-Motiv, neben der Homodimerisierung über die CRD, auch essenziell für die Bindung an Saccharide zu sein (Yang *et al.*, 1998).

Die bereits angesprochene, besondere N-terminale Domäne in Gal3 besteht aus einer sich wiederholenden Konsensussequenz aus PGAYPG, die hoch konserviert ist (Houzelstein *et al.*, 2004). Diese Domäne ermöglicht es Gal3, ebenso Zucker-unabhängig Oligomere (Hsu *et al.*, 1992, Massa *et al.*, 1993, Mehul *et al.*, 1994), wie auch hochmolekulare Cluster auszubilden, die durch zusätzliche Wechselwirkungen mit Glykoproteinen (und Glykolipiden) stabilisiert werden. Das Schema der Selbst-Assemblierung von Gal3 und der daraus resultierenden Kreuzvernetzung weiterer Liganden wird jedoch noch immer kontrovers diskutiert (Lepur *et al.*, 2012; vgl. auch Selbst-Assemblierung über die C-terminale Domäne oben). Die Präzipitation einiger Liganden durch bi- und multivalente Bindung von Gal3 wurde schon früh beschrieben, obwohl Gal3 nur eine einzige CRD besitzt (Woo *et al.*, 1991, Knibbs *et al.*, 1993). Schließlich konnte *in vitro* eine Liganden-Quervernetzung durch Gal3-Pentamere nachgewiesen werden (sog. N-Typ; s. Abb. 1.7), deren Bildung über die N-terminale Domäne erfolgte (Ahmad *et al.*, 2004).

Darüber hinaus besitzt Gal3 in seiner N-terminalen Domäne eine Phosphorylierungsstelle an Serin⁶, die einerseits die Zuckerbindung (Mazurek *et al.*, 2000) und andererseits die antiapoptotische Wirkung stark beeinflusst (Yoshii *et al.*, 2002). Außerdem wurde von einer Phosphorylierung an Serin¹² berichtet (Cowles *et al.*, 1990, Huflejt *et al.*, 1993). Des Weiteren konnte eine α -Collagen-like Sequenz im N-Terminus identifiziert werden (Raz *et al.*, 1989), an der Kollagenasen bzw. Matrix-Metalloproteasen angreifen können (Herrmann *et al.*, 1993, Ochieng *et al.*, 1994). Neben all diesen Aufgaben ist die N-

terminale Domäne zusätzlich essenziell für die volle biologische Wirksamkeit von Gal3 und dessen Zuckerbindung (Seetharaman *et al.*, 1998, Barboni *et al.*, 2000).

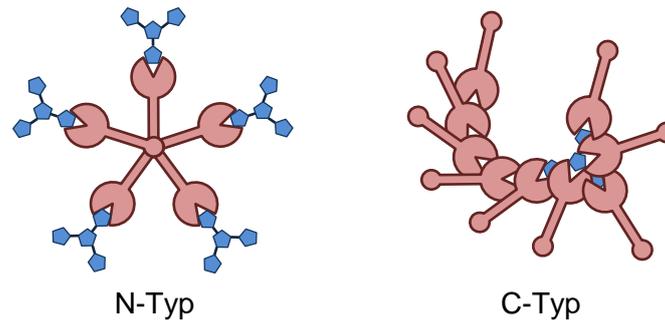


Abb. 1.7 Formen der Gal3-Oligomerisierung. Es existieren zwei verschiedene Modelle zur Gal3-Oligomerisierung. Bei der N-Typ Selbst-Assemblierung bilden sich über die N-terminale Domäne Dimere und höherwertige Oligomere aus, bis hin zu Pentameren. Bei der C-Typ-Oligomerisierung erfolgt die homophile Interaktion über die CRDs.

Zu guter Letzt scheint es auch die N-terminale Domäne zu sein, die für die unkonventionelle Sekretion von Gal3 sorgt (s. 1.4.1). Gal3 verfügt nämlich, wie auch alle anderen Mitglieder der Galektin-Familie, über keine klassische Signalsequenz oder Membrananker und wird durch freie Polysomen des Zytoplasmas synthetisiert.

1.4 Unkonventionelle Proteinsekretion

Die Synthese von sekretierten Proteinen, lysosomalen Proteinen und einigen Membranproteinen beginnt zunächst mit der Translation an zytoplasmatischen Polyribosomen, die jedoch durch eine N-terminale oder integrale Signalsequenz unterbrochen wird und den Transport des translatorischen Komplexes zum ER induziert (raues ER bzw. rER). Am rER kommt es schließlich zur kotranslationalen Translokation über die rER-Membran, die durch den hohen Anteil hydrophober Aminosäuren in der Signalsequenz initiiert wird. Das SRP erkennt die Signalsequenz, pausiert die Translation und leitet mRNA und Ribosom durch die Bindung an den SRP-Rezeptor zur ER-Membran. Durch die Interaktion des SRP mit dem Rezeptor kommt es zum Kontakt zwischen Ribosom und einer Translokase (Sec61-Komplex), die den Transit der naszierenden Polypeptidkette erlaubt (s. Abb. 1.8).

Es sind jedoch einige extrazelluläre Proteine bekannt, die über keine (klassische) Signalsequenz verfügen oder aber auch Proteine, die eine Signalsequenz besitzen aber trotzdem unabhängig vom konventionellen Weg über die ER/Golgi-Route sekretiert werden. Aus diesem Grund spricht man von einer „unkonventionellen Proteinsekretion“ (UPS) (Nickel, 2010). Die unkonventionelle Sekretion läuft allerdings nicht nach einem allgemeinen Mechanismus ab, sondern dient lediglich als Oberbegriff für eine ganze Reihe an unterschiedlichen Sekretionsprozessen, die es Proteinen erlauben die Zelloberfläche oder den extrazellulären Raum zu erreichen.

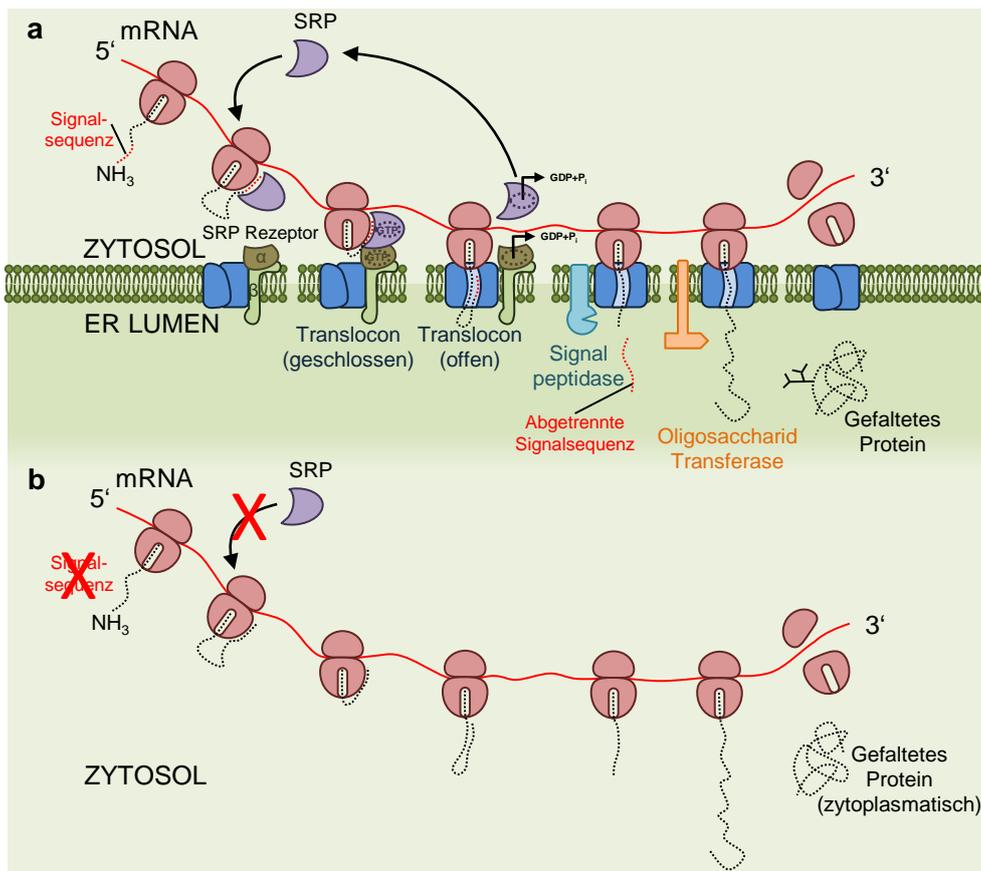


Abb. 1.8 Die Translation klassisch sekretierter Proteine und unkonventionell sekretierter Proteine. (a) Proteine mit einer klassischen Signalsequenz werden durch den SRP und den SRP-Rezeptor an die ER-Membran rekrutiert. Mit der Translation in das Innere des ERs beginnt der klassische Sekretionsweg als ER-Golgi-Transit zur Plasmamembran. (b) Unkonventionell sekretierte Proteine, wie z. B. Gal3, besitzen keine Signalsequenz und werden folglich im Zytosol synthetisiert.

Eine grundsätzliche Kategorisierung dieser Vielzahl an möglichen Wegen ermöglicht die Einteilung in Proteinklassen, die allgemein eine bestimmte Transportroute nach sich ziehen. Dementsprechend werden vier verschiedene Mechanismen (Typ I-IV) unterschieden (Rabouille *et al.*, 2012).

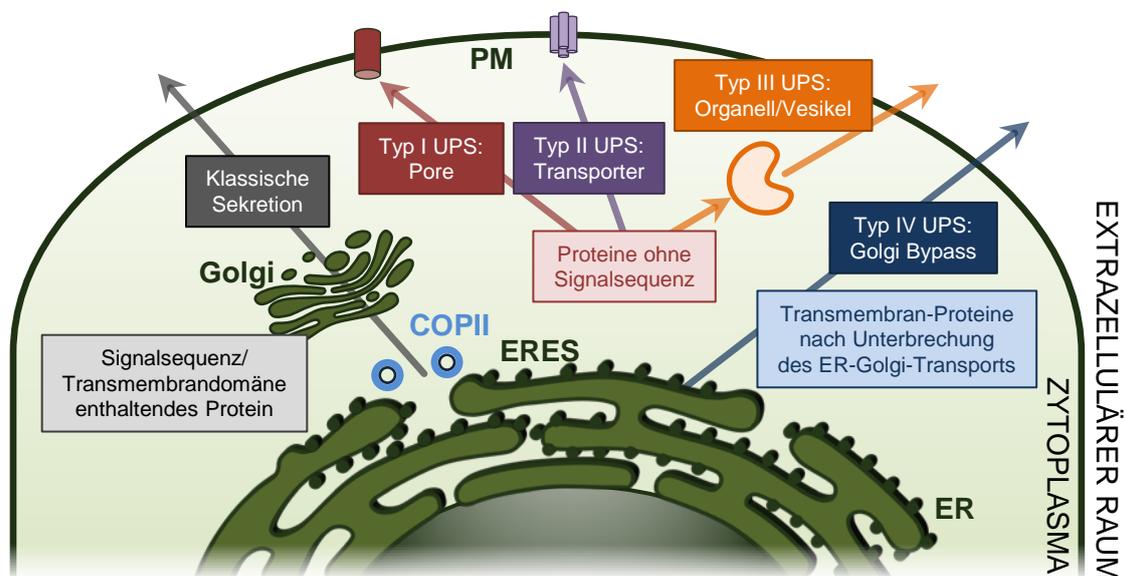


Abb. 1.9 Übersicht der verschiedenen Wege der unkonventionellen Proteinsekretion.

Zusätzlich werden zwei Proteinkategorien, wie oben bereits erwähnt, unterschieden: Zur ersten Kategorie zählen zytoplasmatisch synthetisierte Proteine ohne Signalsequenz, die die Plasmamembran überwinden müssen, um im extrazellulären Raum wirken zu können. Die Proteine dieser Kategorie gelangen über die Transportrouten Typ-I (Porenvermittelt), -II (Transporter-vermittelt) und -III (Organell-vermittelt) über die Plasmamembran. Die zweite Kategorie umfasst Proteine, die zwar eine Signalsequenz oder eine Transmembrandomäne aufweisen und deshalb ins ER gelangen, jedoch auf dem Weg zur Plasmamembran den Golgi-Apparat umgehen und deshalb zum Typ-IV (sog. Golgi-Bypass) gezählt werden. Die Transportrouten I und II sind dementsprechend Vesikel-unabhängig, wohingegen Typ-III und -IV auf die Auslieferung in membranumschlossenen Vesikeln bzw. Organellen angewiesen sind.

Die beiden Proteine *Fibroblast Growth Factor 2* (FGF2) und HIV *Transactivator of Transcription* (TAT) sind Beispiele für konstitutiv sekretierte Proteine nach Typ-I (Steringer *et al.*, 2015, La Venuta *et al.*, 2015, Zeitler *et al.*, 2015). Beide Proteine sind dazu in der Lage, mit sich selbst zu oligomerisieren und schließlich eine lipophile Pore in der Membran zu bilden, die ihnen letztendlich die direkte Translokation über die Plasmamembran erlaubt. Darüber hinaus können weitere Proteine Entzündungsabhängig die Plasmamembran überwinden. Dazu gehört auch das Zytokin Interleukin-1 β (IL-1 β), wobei die UPS von IL-1 β zurzeit sehr kontrovers diskutiert wird (Monteleone *et al.*, 2015; vgl. weitere vorgeschlagene Routen unten). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass IL-1 β die Plasmamembran von Makrophagen durch eine sog. Hyperpermeabilisierung überwinden kann (Conos *et al.*, 2016) und, dass dies ein gesteuerter Prozess zu sein scheint (Martín-Sánchez *et al.*, 2016).

Der zweite Vesikel-unabhängige Transportweg (Typ-II) basiert auf einer direkten Translokation über die Plasmamembran mithilfe von speziellen Transportern. Diesen Weg nehmen acylierte Peptide bzw. Proteine, wie z. B. das farnesylierte Peptid *Yeast Mating Factor α* , das mithilfe des ABC-Transporters Step6 über die Membran transportiert wird (McGrath & Varshavsky, 1989, Michaelis, 1993). Darüber hinaus sind in verschiedenen Organismen weitere Beispiele für diesen Mechanismus beschrieben worden (Christensen *et al.*, 1997, Ricardo & Lehmann, 2009).

Die Vesikel-abhängige Transportroute (UPS Typ-III) basiert entweder auf zellulären Organellen, wie Multivesikuläre Körperchen (MVB), Lysosomen und Autophagosomen, die mit der Plasmamembran fusionieren oder aber auch auf sog. Mikrovesikeln, die sich direkt von der Plasmamembran abschnüren. Spezielle Lysosomen, die Cargoproteine in den extrazellulären Raum entlassen, sog. sekretorische Lysosomen, wurden zunächst in Melanozyten oder zytotoxischen T-Lymphozyten beschrieben (Blott & Griffiths, 2002, Stinchcombe *et al.*, 2004). Darüber

hinaus dienen diese Lysosomen generell der Membran-Reparatur (McNeil & Kirchhausen, 2005), als Antwort auf Calcium-Ionophore, Poren-bildender Toxine oder Parasiten (Rodríguez *et al.*, 1997, Divangahi *et al.*, 2009, Jaiswal *et al.*, 2002). Als ein Beispiel für die UPS über sekretorische Lysosomen gilt IL-1 β (Andrei *et al.*, 1999).

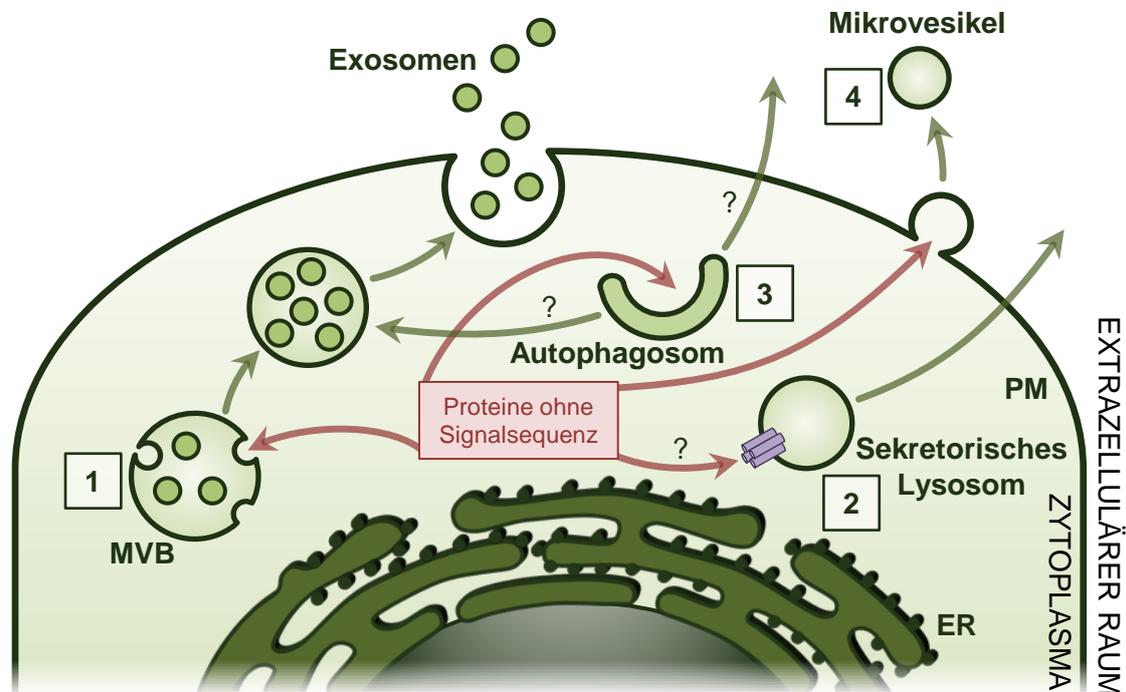


Abb. 1.10 Übersicht der unkonventionellen Proteinsekretion Typ-III. (1) Im Zytoplasma translatierte Proteine ohne Signalsequenz können in ILVs (intraluminale Vesikel) verpackt und nach der MVB-Fusion mit der Plasmamembran (PM) mittels Exosomen sekretiert werden. (2) Ein solches Protein könnte aber auch über die Membran eines sekretorischen Lysosoms transportiert und mit diesem exportiert werden. Ein Transporter für diesen Weg ist allerdings nicht bekannt. (3) Als einen weiteren Mechanismus wird der Export über Autophagosomen diskutiert. (4) Auch die Sekretion im Inneren von Mikrovesikeln, die sich an der PM abschnüren, wurde beschrieben.

Zudem werden sekretorische Autophagosomen als ein weiterer Mechanismus der IL-1 β -UPS diskutiert (Harris *et al.*, 2011, Dupont *et al.*, 2011, Zhang *et al.*, 2015). Interessanterweise zeigt sich hierbei auch, wie ein bestimmter Stimuli die Sekretionsroute der UPS steuern kann: Beim Aushungern der Zellen wird die UPS Typ-I induziert, sodass es zur sehr schnellen Freisetzung von IL-1 β und dementsprechend zum Zelltod kommt. Liegt jedoch eine Entzündung vor, kommt es zur langsameren Typ-III Sekretion, die außerdem keinen Zelltod zur Folge hat (Rabouille, 2017). Im Export von IL-1 β , sowie einem weiteren Vertreter dieser Gruppe, AcbA/1 bzw. AcbA/B via sekretorische Autophagosomen sind außerdem Atg- und GRASP-Proteine beteiligt (Dupont *et al.*, 2011, Zhang *et al.*, 2015, Kinseth *et al.*, 2007, Duran *et al.*, 2010, Manjithaya *et al.*, 2010, Loomis *et al.*, 2010).

Eine weitere Möglichkeit der UPS Typ-III, und für diese Arbeit von herausragender Bedeutung, stellen MVBs dar, die durch reverse Membraneinstülpung intraluminale Vesikel (ILV) bilden und diese nach Fusion mit der Plasmamembran als sog. Exosomen freisetzen (They *et al.*, 2002, Raposo & Stoorvogel, 2013). Durch einen

analogen Prozess an der Plasmamembran, d. h. der Induktion einer negativen Membrankrümmung in Richtung Extrazellulärraum (*Membrane Blebbing*), entstehen sog. Mikrovesikel. Es gibt mittlerweile unzählige Proteine, deren exosomale Sekretion beschrieben worden ist (Raposo & Stoorvogel, 2013). Dazu zählen Gal1, Gal3 und Gal4 (sowie weitere z. B. Gal7 und Gal10), für die die exosomale Sekretion durch proteomische Analysen nachgewiesen und gesichert werden konnte (Thery *et al.*, 2001, Fei *et al.*, 2015, Skogberg *et al.*, 2013, Lazar *et al.*, 2015, Choi *et al.*, 2007, Xu *et al.*, 2015). Das bereits besprochene IL-1 β taucht dagegen in Mikrovesikeln auf (MacKenzie *et al.*, 2001). Exosomen und Mikrovesikel unterscheiden sich in ihrer Morphologie, ihrer Größe und dementsprechend in ihrem Sedimentationsverhalten während der Aufreinigung. Mikrovesikel sind sehr heterogen in Gestalt und Größe (100-1000 nm Durchmesser) und pelletieren bereits bei 10.000 g (Muralidharan-Chari *et al.*, 2010). Die Form der Exosomen ist hingegen uniform, mit einem Durchmesser von 40-100 nm. Darüber hinaus pelletieren Exosomen erst bei 100.000 g (Raposo & Stoorvogel, 2013, Kalra *et al.*, 2013).

Eine weitere Vesikel-abhängige Transportroute (Typ-IV) gilt als Golgi-Bypass und umfasst dementsprechend ausschließlich Proteine mit Signalsequenz, die im ER synthetisiert werden. Typ-IV Proteine gelangen trotz Unterbrechung des ER-Golgi-Transports durch Brefeldin A oder Syntaxin-5-Depletion an die Plasmamembran (Grieve & Rabouille, 2011). Der Bypass wird hauptsächlich infolge von ER-Stress induziert. ER-Stress kann z. B. durch eine Punktmutation ausgelöst werden, die die endgültige Faltung eines Proteins unterbindet. Dies führt zu einer Akkumulation, die schlussendlich in der Aktivierung von ER-Stress Kaskaden gipfelt. Beispielproteine, in denen solche Punktmutationen vorliegen können, die eine UPS nach sich ziehen, sind Pendrin (Jung *et al.*, 2016) oder *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR), der mit der zystischen Fibrose assoziiert ist (Yoo *et al.*, 2002, Gee *et al.*, 2011). Als zugehörige Sortiermaschinerie konnten Mitglieder der GRASP-Familie ausgemacht werden (Gee *et al.*, 2011). Diese werden durch ER-Stress phosphoryliert und binden über eine PDZ-Domäne an CFTR (Rabouille & Linstedt, 2016, Gee *et al.*, 2011). Darüber hinaus wurde z. B. in *Drosophila* eine essenzielle, funktionelle Rolle von dGRASP in der Integrin-Sekretion beschrieben (Schotman *et al.*, 2008). Ein weiteres, alternatives Sortierprotein in der Typ-IV UPS ist Hsp70, das (zusammen mit dem Ko-Chaperon DNAJC14) Pendrin durch direkte Bindung zur Plasmamembran transportiert (Jung *et al.*, 2016).

Der Grund, weshalb insbesondere zytoplasmatische Proteine mittels UPS exozytiert werden und nicht einfach den klassischen Sekretionsweg über ER und Golgi-Apparat nehmen, ist bislang nicht klar. Eine Fehlfaltung oder fehlerhafte

posttranslationale Modifikationen könnten eine Erklärung dafür sein. Das verdeutlichen z. B. Arbeiten am FGF2. Durch die Anheftung einer N-terminalen ER-Signalsequenz und dem resultierenden ER-Golgi-Transit wird biologische Aktivität von FGF2 im extrazellulären Raum aufgehoben (Wegehingel *et al.*, 2008). Die Inaktivierung ist auf eine „artifizielle“ O-Glykosylierung zurückzuführen. Eine zweite Erklärung könnte eine zu frühe Interaktion mit entsprechenden Liganden sein, die letztendlich zur Aggregation oder Missfaltung führen könnte. Dies gilt im Besonderen für die Familie der Zuckerbindenden Galektine (Nickel & Rabouille, 2009).

1.4.1 Die unkonventionelle Sekretion von Gal3

Wie kann Gal3 die Sortier-Aufgaben im Endosom bzw. die mannigfaltigen Wirkungen im extrazellulären Raum wahrnehmen, ohne eine ER-Signalsequenz vorzuweisen? Diese Frage stellte sich bereits sehr früh. So konnten verschiedene Gruppen aufzeigen, dass Gal3 unabhängig vom klassischen Sekretionsweg die Zellen verlassen muss (Lindstedt *et al.*, 1993, Sato *et al.*, 1993, Cleves *et al.*, 1996, Hughes, 1999). Verschiedene Inhibitoren der klassischen Sekretion, wie z. B. Monensin oder Brefeldin A hatten nämlich keinen Einfluss auf die Gal3-Sekretion. Im Gegensatz dazu konnte jedoch durch die Zerstörung des Mikrotubuliskeletts mittels Nocodazol oder einer Inkubation bei 20°C die Sekretion verhindert werden. Interessanterweise konnten Lindstedt und Kollegen herausfinden, dass Gal3 fast ausschließlich apikal sekretiert wird.

Bis heute konnte jedoch noch kein eindeutiger Sortiermechanismus für die UPS von Gal3 beschrieben werden. Darüber hinaus ist immer noch unklar, welche Transportroute Gal3 auf seinem Weg in den Extrazellulärraum verwendet. Entgegen den obigen Analysen zu exosomalem Gal3, deuten einige Arbeiten auch auf einen Export via Mikrovesikel hin (Mehul & Hughes, 1997; vgl. auch für Gal1 Cooper & Barondes, 1990), d. h. durch *Membrane Blebbing* der Plasmamembran (McCullough *et al.*, 2013). In diesem Zusammenhang konnte eine verstärkte Sekretion einer chimären, Membranverankerten Form von Gal3 nachgewiesen werden (Mehul & Hughes, 1997). Interessanterweise fanden kurze Zeit später dieselben Wissenschaftler ein essenzielles, aber allein nicht ausreichendes Sekretions-Motiv (YPSAPGAY) im Gal3 N-Terminus (Menon & Hughes, 1999). Diese Entdeckung könnte jedoch auch im Zusammenhang mit einer möglichen exosomalen Sekretion von Gal3 stehen (s. 4.1). Tatsächlich konnte Gal3 sowohl in den Exosomen verschiedenster Zellen (s. oben), als auch in Körperflüssigkeiten bzw. -sekreten nachgewiesen werden. So wurde exosomales Gal3 sowohl im Plasma (Madrigal-Matute *et al.*, 2014), als auch im Urin (Gonzales *et al.*, 2009, Raj *et al.*, 2012) und Speichel (Ogawa *et al.*, 2008, Gonzalez-Begne *et al.*, 2009) beschrieben. Auch sezernierte Exosomen aus verschiedenen Tumorzelllinien (z. B. Blasen-, Kolorektal- und Eierstock-Krebs) enthalten Gal3 (Welton *et al.*, 2010, Mathivanan *et al.*, 2010, Liang *et al.*, 2013).

Des Weiteren wurde *in vitro* dokumentiert, dass Gal3 möglicherweise zu einem direkten Übertritt durch die Membran von Liposomen befähigt ist (Lukyanov *et al.*, 2005). Dieser Prozess scheint unabhängig von weiteren Faktoren zu sein und spontan aufzutreten. Inwieweit das jedoch für die Plasmamembran bzw. *in vivo* zutrifft, ist unklar. Ein möglicher direkter Übergang über die Plasmamembran wurde auch schon früher diskutiert (Mehul & Hughes, 1997).

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass die Datenlage vor allem in Bezug auf die Identität des möglichen Gal3-Transporters in der UPS unklar bzw. widersprüchlich ist. Angesichts der mannigfaltigen extrazellulären Funktionen von Gal3 ist es deshalb dringend notwendig, den Sekretionsmechanismus und -prozess endlich aufzuklären.

1.5 Exosomale Sekretionsmaschinerie

Aufgrund der offenkundig zentralen Bedeutung der Exosomen für die Sekretion von Gal3, soll in diesem Abschnitt detailliert auf den biochemischen Prozess der Exosomen-Biogenese eingegangen werden.

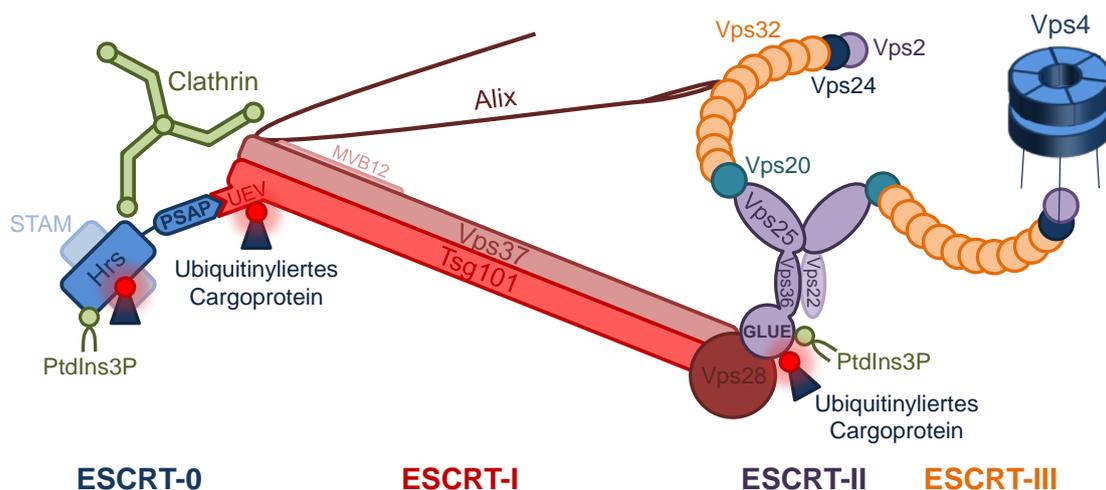


Abb. 1.11 Der ESCRT-Superkomplex.

Exosomen entstehen zunächst als ILVs an speziellen Endosomen, den MVBs (Palade, 1955, Sotelo & Porter, 1959). Nach der Fusion des MVBs mit der Plasmamembran und der resultierenden Freisetzung in den extrazellulären Raum werden aus den ILVs schließlich Exosomen (Bobrie *et al.*, 2011). Die Abknospung in das Lumen der MVBs ist mechanistisch ein grundlegend anderer Vorgang, als Abknospungen im sekretorischen Transport oder der Endozytose, die in Richtung des Zytoplasmas erfolgen. Dadurch kann die Abtrennung der entstehenden Vesikel durch direkte Bindung von zytoplasmatischen Faktoren am Vesikelhals induziert werden. Topologisch gesehen kann man dementsprechend bei der ILV-Bildung von einem gegensätzlichen Prozess, d. h. einer inversen bzw. negativen Membrankrümmung ausgehen. Tatsächlich muss hier die Abschnürung durch Faktoren auf der Innenseite des knospenden Vesikels

bewerkstelligt werden. Bei dem gesamten Prozess spielen vier sequenziell agierende Proteinkomplexe eine zentrale Rolle (s. Abb. 1.11), die unter dem Oberbegriff ESCRT (*Endosomal Sorting Complex required for Transport*) zusammengefasst werden und evolutionär hoch konserviert sind (Katzmann *et al.*, 2002).

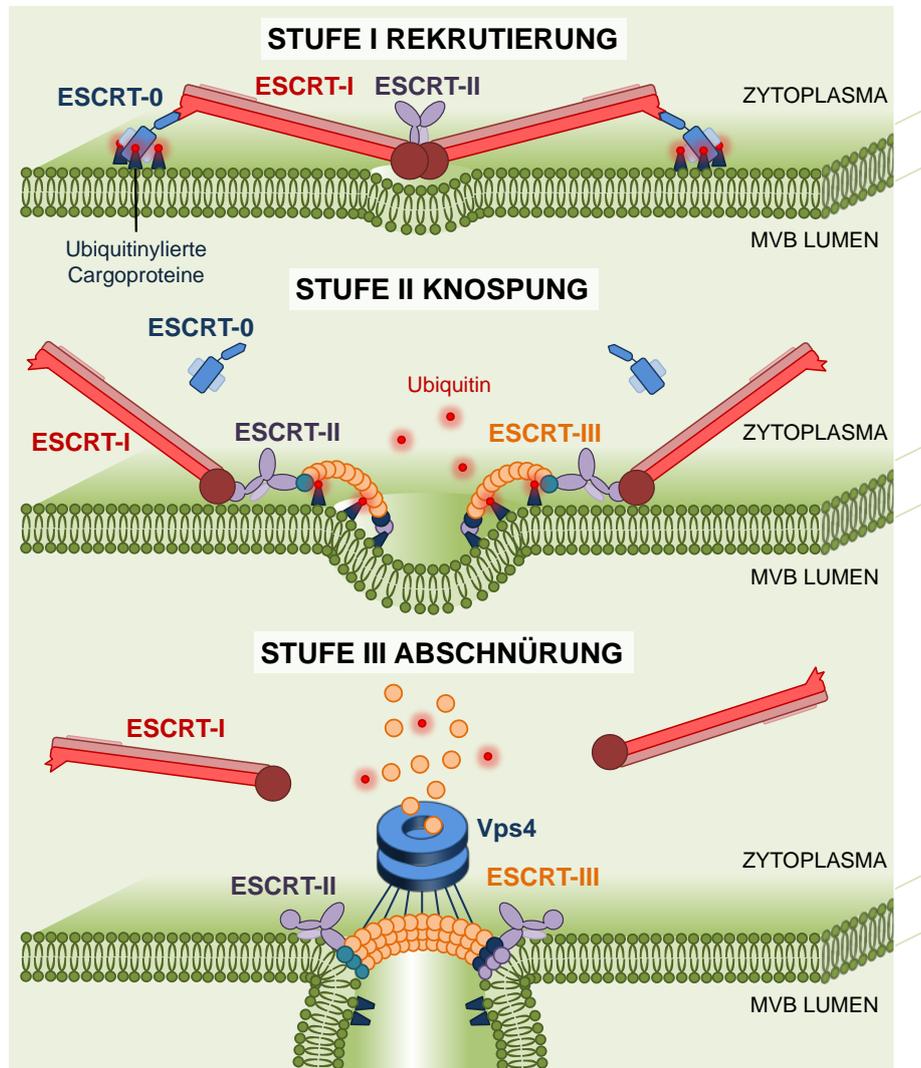


Abb. 1.12 Die ESCRT-abhängige Membranabschnürung. Die ILV-Biogenese besteht aus drei distinkten Phasen. In der ersten Phase werden die beteiligten ESCRT-Komplexe und die Cargoproteine an die MVB-Membran rekrutiert. In der zweiten Stufe bildet sich eine Einstülpung in das Lumen des MBVs. In der dritten und letzten Phase kommt es unter der konzertierten Wirkung der AAA-ATPase und den ESCRT-III-Filamenten zur Abschnürung des ILVs (Konstriktionsring).

Der Prozess der Membranabschnürung kann in drei unterschiedliche Phasen eingeteilt werden (s. Abb. 1.12). In der ersten Phase werden die beteiligten ESCRT-Komplexe und die Cargoproteine an die MVB-Membran rekrutiert. Nachdem ESCRT-III mobilisiert wurde, kommt es in der zweiten Stufe zur Ausbildung einer Einstülpung in das Lumen des MBVs. In der dritten und letzten Phase wird, unter der konzertierten Wirkung der AAA-ATPase und den ESCRT-III-Filamenten, das ILV in das Lumen des MBVs abgeschnürt (Konstriktionsring).

Die ESCRT-Maschinerie ist darüber hinaus an weiteren, fundamentalen Prozessen beteiligt, in denen es zu einem Membranumbau bzw. einer

Membranknospung oder -Abschnürung kommt (s. Abb. 1.13). Beispielsweise ist der ESCRT-Komplex beteiligt an der viralen Freisetzung (Morita & Sundquist, 2004), der Zytokinese (Carlton & Martin-Serrano, 2007, Morita *et al.*, 2007), der Plasmamembran-Reparatur (Jimenez *et al.*, 2014) und der Freisetzung von sog. Ektosomen an der Plasmamembran (Nabhan *et al.*, 2012). Außerdem sind weitere Funktionen in Neuronen (Loncle *et al.*, 2015), bei der Qualitätskontrolle des Kernporenkomplexes (Webster *et al.*, 2014) und beim Aufbau und der Reparatur der Kernhülle bekannt (Olmos *et al.*, 2015, Vietri *et al.*, 2015, Raab *et al.*, 2016, Denais *et al.*, 2016).

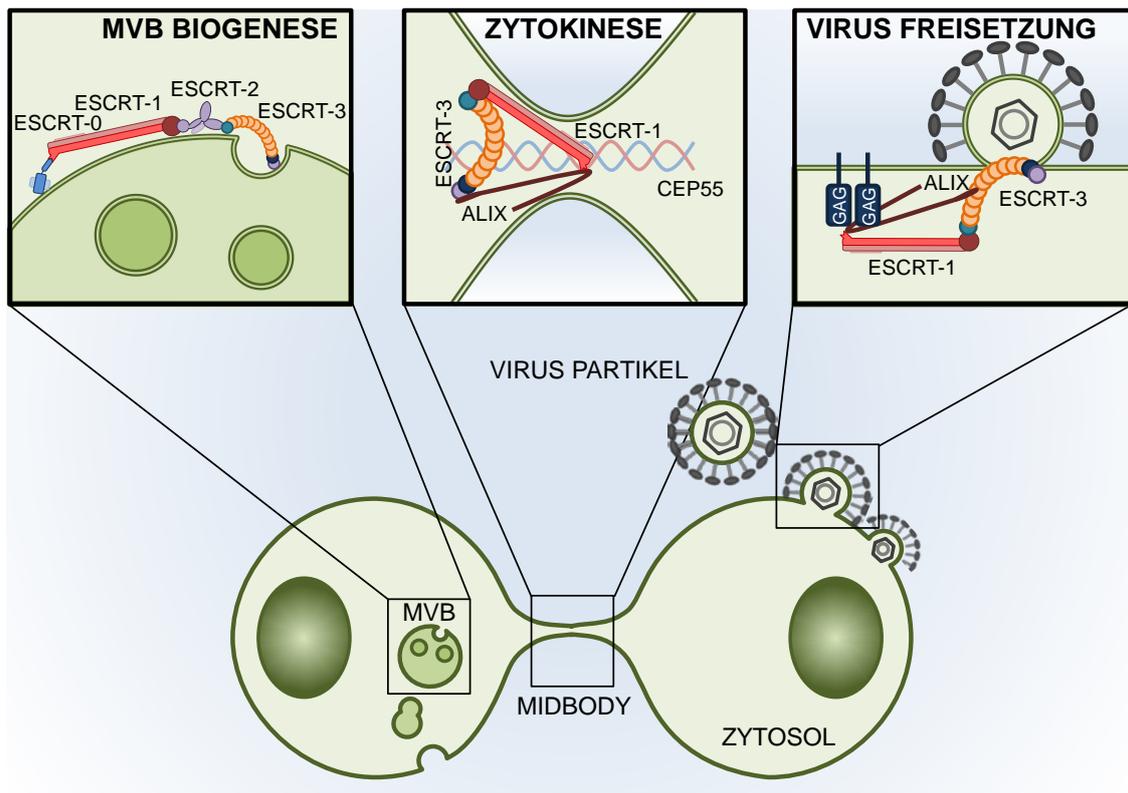


Abb. 1.13 Die Wirkungsstätten des ESCRT-Komplexes. Die drei am besten studierten, durch den ESCRT-Superkomplex induzierten Membranabschnürungen sind die Biogenese von ILVs am MVB, die Zytokinese während der Zellteilung und die Freisetzung von viralen Partikeln an der Plasmamembran. Darüber hinaus sind jedoch noch weitere, hier nicht aufgeführte Wirkungsorte des ESCRT-Komplexes bekannt, wie z. B. der Nukleus.

1.5.1 ESCRT-0

Der Prozess der Exosomen-Biogenese beginnt zunächst mit dem Anreichern bzw. Clustern der zu sortierenden Cargoproteine an der MVB-Membran. Dieser erste Schritt der Protein-Rekrutierung wird von ESCRT-0 bewerkstelligt, einem Homodimer aus den beiden Proteinen *Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate* (Hrs) und *Signal transducing adapter molecule 1* (STAM1/2). Hrs verfügt über eine FYVE-Zinkfinger-Domäne (F_{ab}-1, Y_{GL}023, V_{ps}27, E_{EA}1), die die Bindung an Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PtdIns3P) ermöglicht (Burd & Emr, 1998). Dadurch wird zum einen der ESCRT-0-Komplex an die Membran rekrutiert und zum anderen die Organell-Spezifität bzw. das Endosomen-Targeting sichergestellt (Raiborg *et al.*, 2006).

Hrs und STAM1/2 können über sog. VHS- (Vps27, Hrs, STAM)- und UIM- (Ubiquitin-*interacting motif*) Domänen insgesamt fünf ubiquitylierte Proteine binden (Shih *et al.*, 2002, Bilodeau *et al.*, 2002, Hicke *et al.*, 2005), wodurch es zur Ausbildung hochmolekularer Cluster der zu sortierenden Cargoproteine kommt (Wollert & Hurley, 2010). Darüber hinaus verfügt Hrs noch über weitere Interaktionsdomänen, wie eine C-terminale Clathrin-Bindesequenz (Raiborg *et al.*, 2001), mit der Hrs an Endosomen dirigiert werden kann (Sachse *et al.*, 2002) und das für diese Arbeit zentrale Tetrapeptid P(S/T)AP-Motiv, mit der der ESCRT-1-Komplex gebunden wird (Bilodeau *et al.*, 2003, Katzmann *et al.*, 2003, Lu *et al.*, 2003). Dieses kanonische P(S/T)AP-Motiv nutzen jedoch auch verschiedene ummantelte Viren (sog. *Late Domain*), wie z. B. das HI-, Ebola und Marburg-Virus, um den ESCRT-Komplex zu usurpieren und auf diese Weise von der Plasmamembran abknospen zu können (Pornillos *et al.*, 2002, Pornillos *et al.*, 2003, Chen & Lamb, 2008, Martin-Serrano *et al.*, 2003b).

1.5.2 ESCRT-I

Der Interaktionspartner des P(S/T)AP-Motivs ist die N-terminale UEV-(Ubiquitin E2 Variant) Domäne von Tsg101 (Katzmann *et al.*, 2001), das zusammen mit den Proteinen Vps28, Vps37 und hMvb12 den ESCRT-I-Komplex bildet (Katzmann *et al.*, 2001, Bishop & Woodman, 2001, Bache *et al.*, 2004, Chu *et al.*, 2006). Die Membran-Rekrutierung des ESCRT-I-Komplexes wird folglich durch die Interaktion zwischen Hrs und Tsg101 induziert. Weitere humane Proteine, deren P(S/T)AP vermittelte Bindung an Tsg101 beschrieben worden ist, sind die Ubiquitin-Ligase Tal (Amit *et al.*, 2004), die GGA- und Tom-like Protein Trafficking Adaptors (Puertollano, 2005, Puertollano & Bonifacino, 2004), sowie Alix (Fisher *et al.*, 2007). Über die Vps28-Untereinheit interagiert der ESCRT-I der Bäckerhefe in einem 1:1 Verhältnis mit dem ESCRT-II und rekrutiert selbigen an die endosomale Membran um die Knospung in das Lumen zu induzieren (Teo *et al.*, 2006, Kostelansky *et al.*, 2007).

1.5.3 ESCRT-II

ESCRT-II ist demzufolge ein essenzieller Partner des ESCRT-I-Komplexes, die zusammen einen Superkomplex bilden (Gill *et al.*, 2007) und gleichermaßen an der MVB-Biogenese und der Induktion der Membranknospung mitwirken (Babst *et al.*, 2002a, Wollert & Hurley, 2010). Der Komplex selbst besteht aus einem Y-förmigen Heterotetramer der Untereinheiten Vps22, Vps25 und Vps36 im Verhältnis 1:2:1 (Hierro *et al.*, 2004, Babst *et al.*, 2002b, Teo *et al.*, 2004). Interessanterweise kann die Überexpression von ESCRT-II eine ESCRT-I-Depletion ausgleichen, was allerdings in umgekehrter Konstellation nicht möglich ist (Babst *et al.*, 2002b). Im Gegensatz dazu scheinen die HIV-Knospung (Langelier *et al.*, 2006) und die Zytokinese (Morita *et al.*, 2007) unabhängig von ESCRT-II zu sein. Neuere Daten zeigen jedoch, dass der Komplex sehr wohl am Aufbau der HIV-Partikel beteiligt ist (Carlson & Hurley, 2012,

Meng *et al.*, 2015). ESCRT-II koppelt zudem die MVBs über RILP, Rab7 und Dynein an das Mikrotubuli-Zytoskelett (Progida *et al.*, 2007, Wang & Hong, 2006). Vps36 trägt ein zusätzliches Modul zur Sicherstellung der Endosomen-Spezifität: Eine Pleckstrin Homology (PH) Domäne, die auch GLUE-Domäne genannt wird (GRAM-like Ubiquitin-binding in EAP45) und hauptsächlich an PtdIns3P bindet (Slagsvold *et al.*, 2005, Teo *et al.*, 2006). Neben der Induktion der Membranknospung in der MVB-Biogenese spielt ESCRT-II eine entscheidende Rolle in der Rekrutierung von ESCRT-III. Dadurch fungiert ESCRT-II praktisch als Brücke zwischen den vorgelagerten Komplexen, die vornehmlich für die Anreicherung und Sortierung der Cargoproteine sorgen und dem nachgelagerten Komplex, der die Membranabschnürung bewältigt.

1.5.4 ESCRT-III

Der ESCRT-III nimmt als Herzstück des gesamten ESCRT-Komplexes eine zentrale Funktion in der Erzeugung von ILVs ein und ist verantwortlich für die abschließende Membranabschnürung (Wollert *et al.*, 2009). Der Komplex besteht aus den vier Untereinheiten Vps20, Vps34 bzw. Snf7, Vps24 und Vps2 (in Säugetieren spricht man von Charged Multivesicular Body Proteins CHMP6, CHMP4, CHMP3 und CHMP2; Babst *et al.*, 2002a). Im Gegensatz zu den anderen ESCRTs bildet ESCRT-III keinen stabilen zytoplasmatischen Komplex aus, sondern polymerisiert erst auf der Membran zum aktiven, funktionellen Multimer (Babst *et al.*, 2002a). Die ESCRT-III Oligomerisation wird durch die Bindung von Vps20 an die Vps25-Untereinheit des ESCRT-II initiiert (Teo *et al.*, 2004). Da ESCRT-II über zwei Vps25-Untereinheiten verfügt, ergeben sich demzufolge zwei Nukleationskeime für die ESCRT-III-„Filamente“. Vps20 wiederum bindet und induziert die Homo-Oligomerisierung von mehreren Vps32-Untereinheiten (Henne *et al.*, 2011). Vps32 bindet zudem das Adapter-Protein Alix (Apoptosis linked gene-2 interacting protein X, s. unten) (McCullough *et al.*, 2008). Abschließend werden dann die beiden Capping-Proteine Vps24 und Vps2 rekrutiert (Teis *et al.*, 2008). Die Membranabschnürung durch das dynamische ESCRT-III-Polymer ist in der Elektronenmikroskopie als Konstriktionsring sichtbar (von Schwedler *et al.*, 2003, Morita *et al.*, 2011). Aufgereinigte ESCRT-III-Untereinheiten bilden spiralförmige Filamente auf flachen Membranen bzw. Helices, die Membrantubulierungen induzieren können (Lata *et al.*, 2008, Ghazi-Tabatabai *et al.*, 2008, Henne *et al.*, 2012, Chiaruttini *et al.*, 2015, McCullough *et al.*, 2015, Hanson *et al.*, 2008).

1.5.5 Akzessorische Proteine

Um den Prozess der ILV-Bildung bzw. die Membranabschnürung abzuschließen, wird die Aktivität der AAA-Typ (ATPase associated with various cellular Activities; Striebel *et al.*, 2009, White & Lauring, 2007) ATPase Vps4 benötigt (Babst *et al.*, 1998, Henne *et al.*, 2011). Durch die ATP-Hydrolyse von Vps4, die die zentrale thermodynamische Triebfeder der ESCRT-vermittelten MVB-Biogenese darstellt, werden die ESCRT-III-

Polymere wieder abgebaut und recycelt (Babst *et al.*, 2002a, Teis *et al.*, 2008). Die Rekrutierung erfolgt über Vps24 und noch mehrere andere akzessorische Proteine (Teis *et al.*, 2008, Henne *et al.*, 2011). Zunächst ging man davon aus, dass Vps4 vorwiegend für den Abbau der Filamente zuständig ist (Lata *et al.*, 2008). Neuere Arbeiten zeigen jedoch, dass Vps4 nicht nur ESCRT-III-Polymere abbaut, sondern vielmehr für die dynamische und effiziente Assemblierung des ESCRT-III-Komplexes sorgt (Mierzwa *et al.*, 2017). Diese Wirkungsweise könnte einerseits auf dem vermittelten *Turnover* der *Capping*-Proteine Vps2 und Vps24 beruhen oder analog zur Arbeitsweise der homologen AAA-ATPase Spastin am Mikrotubuli-Netzwerk erfolgen (Zhang *et al.*, 2007). Vps4 besteht in seinem aktiven Zustand aus einem Dodecamer, d. h. aus zwei hexameren Ringen, die anderen AAA-Typ ATPasen ähneln (Babst *et al.*, 1997, Scott *et al.*, 2005, Landsberg *et al.*, 2009).

Wie oben bereits angedeutet, verbindet das Adapterprotein Alix über eine P(S/T)AP-Sequenz ESCRT-I und die ESCRT-III-Untereinheit Vps32. Die genaue Rolle von Alix ist schwer zu fassen, da es einerseits nicht strikt für die ILV-Biogenese (untersucht anhand des kanonischen Cargoproteins *Epidermal Growth Factor*-Rezeptor, EGFR) benötigt wird (Doyotte *et al.*, 2008, Bowers *et al.*, 2006), andererseits aber essenziell für die Rekrutierung der ESCRT-Maschinerie während der Zytokinese, sowie für die Freisetzung von einigen Viren ist (Morita *et al.*, 2007, von Schwedler *et al.*, 2003, Fisher *et al.*, 2007). Tatsächlich ist Alix, analog zu Tsg101, ein weiterer Angriffspunkt, um durch die ESCRT-Maschinerie die Abknospung viraler Partikel von der Plasmamembran zu induzieren (Martin-Serrano *et al.*, 2003a, Strack *et al.*, 2003, von Schwedler *et al.*, 2003). Das Interaktionsmotiv bzw. die *Late Domain* wird dabei aus den Aminosäuren YPX_nL gebildet (X=beliebige Aminosäure) und kommt z. B. mit $n=3$ in HIV oder $n=1$ im *Equine infectious Anemia Virus* (EIAV) vor (Zhai *et al.*, 2007). Daneben ist nur noch eine weitere Klasse an Peptid-Domänen bekannt, die in einer viralen Abschnürung resultiert: Das Tetrapeptid PPXY, das jedoch an sog. HECT-*domain* Ubiquitin-Ligasen (z. B. NEDD4) bindet (Martin-Serrano *et al.*, 2005, Kikonyogo *et al.*, 2001).

1.6 Fragestellung dieser Arbeit

Wie gelangt der Sortierrezeptor Gal3 in den extrazellulären Raum bzw. in das endosomale Kompartiment, um dort seine vielfältigen Aufgaben ausführen zu können? Dies ist die zentrale Frage, die mit dieser Arbeit beantwortet werden soll.

Damit einhergehend ergeben sich weitere Fragestellungen, die mit der derzeitigen Datenlage nicht zu beantworten sind: Gibt es allgemeine Sortiersignale für die unkonventionelle Sekretion? Welche Sortier-Maschinerie erkennt diese Signale? Wie verläuft der biochemische Prozess des Sortierens bzw. der Sekretion? Kann man diesen molekularen Mechanismus mikroskopisch abbilden? Ist dieser Prozess spezifisch inhibierbar? Vielleicht verläuft die Sekretion von Gal3 nach einem übergeordneten Mechanismus, dem evtl. noch andere unkonventionell sekretierte Proteine folgen?

Bislang liegen widersprüchliche Daten zur unkonventionellen Sekretion von Gal3 vor. Das Lektin wurde einerseits in Mikrovesikeln gefunden, andererseits wurde Gal3 in zahlreichen Arbeiten in Exosomen nachgewiesen. Durch die Charakterisierung der Gal3-Vesikelpopulation, sowie durch die Verwendung spezifischer Inhibitoren bzw. durch den *Knockdown* von Schlüsselproteinen soll insbesondere der verwendete „Transporter“ (Exosom oder Mikrovesikel) und der Transportweg in renalen Zellen aufgedeckt und beschrieben werden. Daneben sollen Interaktionspartner im Sekretionsprozess identifiziert werden, die Rückschlüsse auf den vorliegenden Sekretionsmechanismus erlauben. Diese biochemischen Arbeiten sollen durch die ultrahochauflösende Licht-Mikroskopie und Elektronenmikroskopie gestützt werden, die es überdies ermöglichen, den molekularen Sortierprozess in bisher ungekannter Auflösung zu visualisieren. Zusätzlich soll mithilfe von Gal3-Mutanten das Sortiersignal identifiziert und durch die Übertragung dieses Signals auf ein neutrales Protein der Mechanismus abschließend verifiziert und belegt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2-1 Chemikalien und Reagenzien.

Chemikalien	Bezugsquelle
1,4-Dithiothreitol	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Acrylamid (Rotiphorese Gel30)	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Alexa-NHS-Ester	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Ammoniumpersulfat	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Antibody Diluent	Dako, Hamburg
Antipain	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Aprotinin	Roth, Karlsruhe
Asialofetuin	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Bacto-Agar	Roth, Karlsruhe
Bakto Trypton	Roth, Karlsruhe
Bakto-Hefe-Extrakt	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Chloroquin	Serva, Heidelberg
Cysteamin (MEA)	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
ECL-Reagenz SuperSignal West Dura E. D. Substrate	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
EDTA	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Fötales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories, Pasching (Österreich)
Geneticin (G418)	PAA Laboratories, Pasching (Österreich)
Glycerol	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
HEPES	Serva, Heidelberg
Hoechst 33342	Merck, Darmstadt
InstantBlue Protein Stain	Expedon, Cambridge (UK)
IPTG	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Laktose	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Leupeptin	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
L-Glutamin (100x)	PAA Laboratories, Pasching (Österreich)
Lipofectamin2000	Invitrogen, Carlsbad (USA)
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Molekulargewichtsstandard für Agarosegele	New England Biolabs, Ipswich (USA)
Molekulargewichtsstandard für SDS-PA-Gele	Fermentas, St. Leon-Rot
Mowiol 4-88	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Nitrocellulose-Membran Protran	Schleicher und Schüll, Dassel
Nitrocellulose-Membran Spingo Strips	Echelon Biosciences, Salt Lake City (USA)
NP40	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt

Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA-Laboratories, Pasching (Österreich)
Pepstatin	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roth, Karlsruhe
Polyvinylalkohol (PVA)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Ponceau S	Roth, Karlsruhe
ProLong Diamond Antifade	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Quick-Load 100 bp und 1 kb DNA-ladder	New England Biolabs, Ipswich (USA)
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Streptavidin-Peroxidase	KPL, Gaithersburg (USA)
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
Trypsin (0,05%)/EDTA (0,02%) in PBS	PAA-Laboratories, Pasching (Österreich)
Trypsin/Chymotrypsin-Inhibitor	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Vectashield	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
Zellkulturmedien	PAA Laboratories, Pasching (Österreich)
Ziegen Serum	Dako Denmark, Glostrup (Dänemark)
Weitere, hier nicht aufgeführte, allgemein gebräuchliche, Chemikalien sind mindestens von p.a.-Qualität und wurden von Fluka, ICN, Merck, New England Biolabs, Roth, Riedel-de Häen, Serva oder Sigma bezogen.	

2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2-2 Verbrauchsmaterialien.

Materialien	Bezugsquelle
Allgemein	
Deckgläser 18 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig
Filterpapier Whatmann 3MM	Whatmann, Maidstone (UK)
Laktosyl-beads	EY Laboratories Inc., San Mateo (USA)
Nitrocellulose-Membran Protran	Schleicher und Schüll, Dassel
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
PD-10 Gelfiltrationssäule	GE Healthcare, Chalfont St Giles (UK)
Pipettenspitzen (10 µL, 200 µL, 1000 µL)	Greiner, Kremsmünster (Österreich)
Reaktionsgefäße (0,5 mL, 1,5 mL, 2 mL, 15 mL, 50 mL)	Sarstedt, Nürnberg
Skalpell	B. Braun, Melsungen
Willco-dishes	WillCo Wells, Amsterdam (Niederlande)
Zellschaber	Sarstedt, Nürnberg
Zellkultur	
Cryoröhrchen	Greiner, Kremsmünster
Eagle's ME-Medium (<i>minimum essential medium</i>)	PAA-Laboratories, Pasching (Österreich)
Filter (Porengröße 0,45 µm)	Sarstedt, Nürnberg
Kulturschalen	Sarstedt, Nürnberg
Spritzen, Kanülen	Sarstedt, Nürnberg

2.3 Geräte und Software

Tabelle 2-3 Geräte und Software.

Geräte und Software	Bezugsquelle
Mikroskope	
Ground-State-Depletion (GSDIM) Leica SR GSD Modul montiert auf DMI 6000B	Leica Microsystems, Wetzlar
Inverses Lichtmikroskop Axiovert 10	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Konfokales-Laser-Scanning-Mikroskop (KLSM) TCS SP2 montiert auf DM IRE2	Leica Microsystems, Wetzlar
Transmissions-Elektronen-Mikroskop Zeiss 109	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Weitere optische Geräte	
CD-Spektrometer J-815	Jasco, Easton (USA)
Chemostar Professional System	Intas, Göttingen
Monolith NT.115 (MST)	Nanotemper, München
Multiplattenlesegerät infinite M200, 200 Pro	Tecan, Männedorf (Schweiz)
Nanodrop 2000c	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Zellkultur	
Inkubator für Bakterienkulturen	Memmert, Schwabach
Schüttel-Inkubator für Bakterienkultur Infors	Infors AG, Bottmingen (Schweiz)
Schüttel-Inkubator für Bakterienkultur innova 4300	New Brunswick Scientific, Edison (USA)
Sterilbank für die Bakterienkultur FASTER BHA- 48	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Sterilbank HeraSafe	Kendro, Langenselbold
Zellkultur-Inkubator HeraCell 150i (CO ₂ - begast)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Zentrifugen	
Allegra X-22R	Beckman-Coulter, Fullerton (USA)
Combi Plus	Sorvall-Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Kühlzentrifuge Avanti J-20 XP	Beckman-Coulter, Fullerton (USA)
Kühlzentrifuge BioFuge fresco	Heraeus; Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Optima LE-80K	Beckman-Coulter, Fullerton (USA)
Optima TL	Beckman-Coulter, Fullerton (USA)
RotoFix 32 A	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Tischzentrifuge BioFuge pico	Heraeus; Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Heizgeräte	
Heizblock MB-102	Bioer, Hangzhou (China)
Heizblock UBD	Grant, Wiltshire (UK)
Heizgerät Tempcontrol 37-2 digital für Leica DMI6000B	Leica Microsystems, Wetzlar
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Schüttler	
Schüttler KS10	Edmund Bühler, Tübingen
Überkopfschüttler REAX2	Heidolph, Kelheim
PCR-Geräte	
Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg

SDS-Gelelektrophorese	
Elektrophoresekammer Mighty Small II	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)
Netzgerät PowerPac Basic	Biorad, Hercules (USA)
Platten, Spacer, Kämme	Hoefer, San Francisco (USA)
Agarose-Gelelektrophorese	
Gießvorrichtung, Kammer	Peqlab, Erlangen
Netzgerät PowerPac Basic	Biorad, Hercules (USA)
Waagen	
Analysewaage SBC 22	ScalTec Instrumgen, Göttingen
Präzisionswaage SI-114PX	Denver Instruments, Göttingen
Sonstige Geräte	
Absaugsystem Vacusafe	Integra Bioscience, Biebertal
CyberScan pH 510	Eutech Instruments, Nijkerk (Niederlande)
Magnetrührer Yellow Line MSH basic	Ika Werke, Staufen
Reinstwassersystem Elix UV	Millipore, Billerica (USA)
Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York (USA)
Software	
Adobe Illustrator	Adobe, San Jose (USA)
Adobe Photoshop CS5	Adobe, San Jose (USA)
Clone Manager 7	Scientific & Educational Software, Cary (USA)
Image J (Fiji)	Wayne Rasband, NIH (USA)
LabImage	Intas, Göttingen
Leica LAS X	Leica Microsystems, Wetzlar
Leica LCS	Leica Microsystems, Mannheim
Office 2013	Microsoft, Redmond (USA)
Prism5	GraphPad, La Jolla (USA)
Volocity	PerkinElmer, Waltham (USA)

2.4 Antikörper

Tabelle 2-4 Verwendete Primärantikörper (mk, monoklonal; pk, polyklonal; Nano, Nanobody).

Antigene	Klon	Spezies	mk/pk/ Nano	Hersteller	Verdünnung
Alix	H-270	Kaninchen	pk	Santa Cruz	1:200
Galektin-3	-	Kaninchen	pk	H.-P. Elsässer	1:400
Galektin-3	H160	Kaninchen	pk	Santa Cruz	1:200
GAPDH	6C5	Maus	mk	Abcam	1:400
GFP	JL8	Kaninchen	pk	Clontech	1:100
GFP	-	Alpaca	Nano	Chromotek	1:500
GM130	35	Maus	mk	BD	1:100
Gp80	C-18	Ziege	pk	Santa Cruz	1:1000

Hrs	A-5	Maus	mk	Enzo	1:200
Hrs	GTX89364	Ziege	pk	Genetex	1:100
Mac2bp	E5	Maus	mk	Santa Cruz	1:200
PDI	34	Maus	mk	BD	1:200
Tsg101	M-19	Ziege	pk	Santa Cruz	1:200
Tsg101	4A10	Maus	mk	Abcam	1:200
Tsg101	EPR7130B	Kaninchen	mk	Abcam	1:200
V5	R960-25	Maus	mk	Invitrogen	1:200
V5	ab9116	Kaninchen	pk	Abcam	1:200
α -Tubulin	DM1A	Maus	mk	Sigma-Aldrich	1:200

Tabelle 2-5 Verwendete Sekundärantikörper (HRP, *Horseradish Peroxidase*).

Antigene	Spezies	Markierung	Hersteller	Verdünnung
α Maus	Ziege	HRP	Biorad	1:2000
α Kaninchen	Ziege	HRP	Biorad	1:2000
α Ziege	Esel	HRP	Santa Cruz	1:2000
α Maus	Ziege	Alexa647	Invitrogen	1:200
α Maus	Ziege	Alexa488	Invitrogen	1:200
α Kaninchen	Ziege	Alexa555	Invitrogen	1:200
α Ziege	Huhn	Alexa647	Invitrogen	1:200
α Maus	Esel	PLA-MINUS	Olink Biosc.	1:5
α Kaninchen	Esel	PLA-PLUS	Olink Biosc.	1:5

2.5 Lösungen, Medien und Puffer

Nachfolgend werden alle verwendeten Puffer/Lösungen aufgeführt. Es wurde stets steriles, doppelt-destilliertes Wasser zum Ansetzen der Lösungen verwendet.

Tabelle 2-6 Lösungen, Medien und Puffer.

Puffer/Lösung	Konzentration	Inhaltsstoff
PBS	140 mM	NaCl
<i>Phosphate buffered</i>	2,5 mM	KCl
<i>Saline</i>	6,5 mM	Na ₂ PO ₄
	1,5 mM	KH ₂ PO ₄
	pH 7,35 mit	HCl
ME-PBS	PBS mit zusätzlich	
<i>Mercaptoethanol-PBS</i>	2 mM	EDTA
	4 mM	Mercaptoethanol
PBS++	PBS mit zusätzlich	
	1 mM	CaCl ₂
	1 mM	MgCl ₂

GSDIM-Medium	Vectashield mit		
<i>Vectashield</i>	10%	(v/v)	Glycerol/Tris-Puffer
Glycerol/Tris-Puffer	Glycerol mit zusätzlich		
	50	mM	Tris pH 8
Agarose-	40	mM	Tris
Gelelektrophorese-	20	mM	Essigsäure
Laufpuffer TAE	1	mM	EDTA
<i>Tris-Acetat-EDTA</i>	pH 8 mit		NaOH
Natriumhydrogen-	1	M	Natriumhydrogen-
carbonat Puffer	pH 8,4		carbonat
Ito-Puffer	0,1% Cacodylat-		
	Puffer mit zusätzlich		
	2,5%	(w/v)	Glutaraldehyd
	2%	(w/v)	Paraformaldehyd
	0,05%	(w/v)	Pikrinsäure
Cacodylat-Puffer	100	mM	Na-Dimethylarsinat/ Na-Cacodylat
	pH 7,4 mit		NaOH
SOC-Medium	2%	(w/v)	Bakto-Trypton
<i>Super Optimal Broth</i>	0,5%	(w/v)	Bakto-Hefe-Extrakt
	10	mM	NaCl
	20	mM	MgSO ₄
	20	mM	Glukose
LB-Medium	1%	(w/v)	Bakto-Trypton
<i>Lysogeny Broth</i>	0,5%	(w/v)	Bakto-Hefe-Extrakt
	1%	(w/v)	NaCl
	100	µg/mL	Ampicillin
Lysepuffer	25	mM	HEPES
	150	mM	NaCl
	5	mM	EDTA
	1%		NP-40
	0,1%		SDS
	pH 7,4 mit		NaOH
Ko-	25	mM	HEPES
Immunpräzipitation	150	mM	NaCl
Waschpuffer	5	mM	EDTA
	pH 7,4 mit		NaOH

3x Laemmli-Puffer	6%	(w/v)	SDS
	30%	(v/v)	Glycerol
	0,02%	(w/v)	Bromphenolblau
	150	mM	Tris-HCl pH 6,8
	150	mM	DTT
Elektrophorese-puffer	25	mM	Tris
	190	mM	Glycin
	0,1%	(w/v)	SDS
Transferpuffer	48	mM	Tris
	39	mM	Glycin
	0,04%	(w/v)	SDS
	20%	(v/v)	Methanol
Proteinase-Inhibitoren-Mix (PI)	<u>Lösung 1</u>		
	3,4	mg/mL	PMSF in DMSO
	<u>Lösung 2</u>		
	20 μ L	1 mg/mL	Pepstatin in DMSO
	20 μ L	5 mg/mL	Antipain in DMSO
	20 μ L	5 mg/mL	Leupeptin in PBS
	20 μ L	1 mg/mL	Aprotinin in PBS
	20 μ L	50 mg/mL	Trypsin/Chymotrypsin in PBS
	ad 20 mL PBS		
	25 μ L Lösung 1 und 500 μ L Lösung 2 wurden vermischt.		
Ponceau-Rot	0,1%	(w/v)	Ponceau S
	1%	(v/v)	Essigsäure

2.6 Zellkultur

2.6.1 Zelllinie Madin-Darby *Canine Kidney* (MDCK-Typ-II)-Zellen

Die in dieser Arbeit genutzte Madin-Darby *Canine Kidney* (MDCK-) Zelllinie wurde im September 1958 von S.H. Madin und N.B. Darby etabliert (Gaush *et al.*, 1966). Die beiden Wissenschaftler gewannen die Zellen aus der Niere eines gesunden, adulten, weiblichen Cockerspaniels (*Canis lupus familiaris*), ohne die Intention diese mit onkogenen Stoffen zu immortalisieren (spontane Immortalisierung), sondern mit dem Willen die Zellen für die Virusproduktion zu nutzen (Sato, 1981). Erst einige Zeit später wurden die Eigenschaften dieser Zellen beschrieben: eine ausgeprägte, differenzierte epitheloide Morphologie, ein pseudodiploider Karyotyp und die funktionellen Eigenschaften einer renalen Zelle des proximalen Tubulus. Diese epithelialen Eigenschaften äußern sich z. B. in der Ausbildung einer konfluenten Monoschicht an

Zellen. Daraus resultierend entwickelt sich nach einiger Zeit eine ausgeprägte Polarität, die schließlich durch den elektronenmikroskopischen Nachweis von durchgehenden *Tight Junctions* gesichert werden konnte (Leighton *et al.*, 1969). Darüber hinaus wurden indirekte Hinweise auf die Entfaltung eines apikalen und eines basolateralen Zellpols gewonnen: Nach einiger Zeit in Kultur bilden sich aus der geschlossenen Monoschicht sog. Hemizysten oder Zelldome, flüssigkeitsgefüllte Blasen unterhalb der Zellschicht, die dafür sorgen, dass sich ein Teil der Zellschicht von der Kulturschale löst (Leighton *et al.*, 1970, Lever, 1985, Slaughter *et al.*, 1982).

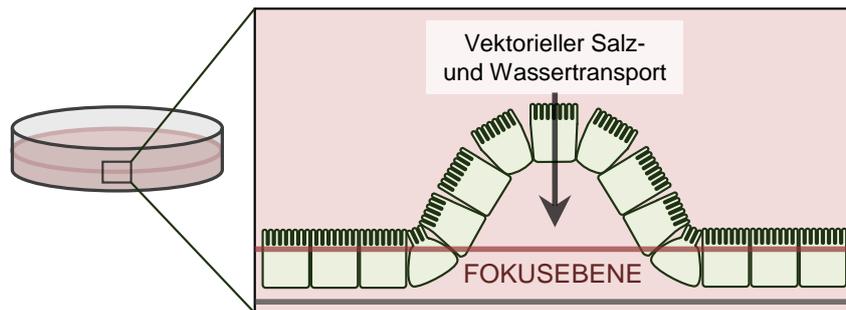


Abb. 2.1 Ausbildung von Hemizysten im polaren MDCK-Zellverbund (Schema).

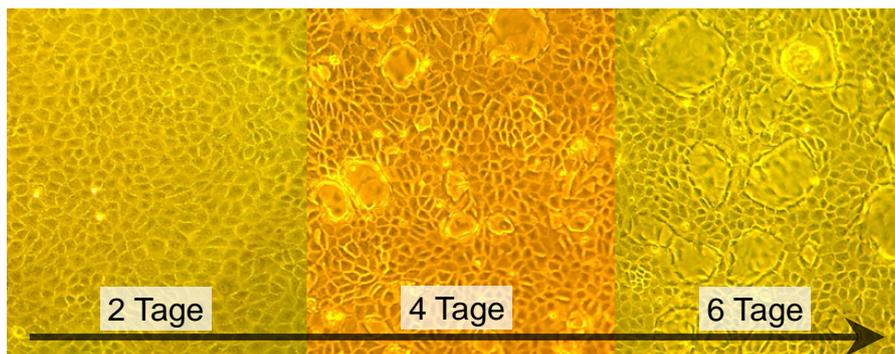


Abb. 2.2 Ausbildung von Hemizysten im polaren MDCK-Zellverbund (Lichtmikroskopie). MDCK-II-Zellen wurden auf einer 10 cm-Zellkulturschale ausgesät und für die angegebene Zeitdauer kultiviert (aus Bänfer 2012, modifiziert). Nach Ausbildung der Polarität bildet sich ein derart dichter Zellverbund, dass der vektorielle Wassertransport zu einem Ablösen der Zellen vom Untergrund und zur Ausbildung von Hemizysten führt.

Diese Beobachtungen eines aktiven, parazellulären Transports (Saier & Deutscher, 1988) wurden durch biochemische Untersuchungen gestützt, die zudem die große Ähnlichkeit der MDCK-II-Zellen mit Zellen des proximalen Tubulus bestätigten (Richardson *et al.*, 1981). So ist die Bildung von Hemizysten zum einen Energieabhängig und wird durch Ouabain (Na^+ , K^+ -ATPase-Inhibitor) inhibiert (Abaza *et al.*, 1974), und zum anderen konnte z. B. alkalische Phosphatase- und γ -Glutamyltransferase-Aktivität detektiert werden. Für Zellen des MDCK-I-Stamms konnte dagegen ein Amilorid-sensitiver Na^+ -Kanal und eine durch Prostaglandin E_1 , Vasopressin, sowie Glucagon regulierte Adenylatcyclase nachgewiesen werden (Rindler *et al.*, 1979a, Rindler *et al.*, 1979b), was eher für einen Ursprung aus Zellen des distalen Tubulus (Gstraunthaler *et al.*, 1985) oder Sammelrohrs spricht (Valentich, 1981, Horster & Stopp, 1986). Die Tatsache, dass die beiden Stämme aus unterschiedlichen Passagen

stammen, MDCK-I aus Passage 61-66 und MDCK-II aus Passage 110-116 (Barker & Simmons, 1981), verdeutlicht eindrucksvoll, dass eine endgültige Bestimmung des Zellursprungs nicht mehr möglich ist.

Das Bemerkenswerte an dieser permanenten Zelllinie ist zudem, dass MDCK-Zellen im Gegensatz zu vielen anderen immortalisierten Zellen ihren differenzierten Phänotyp beibehalten und noch immer sensitiv gegenüber Wachstumsfaktoren sind, sowie das Potenzial besitzen, sich zu funktionellen Nierentubuli zu entwickeln (Stiles *et al.*, 1976). So konnten Stiles und Kollegen zeigen, dass injizierte MDCK-Zellen in adulten, immundefizienten Nacktmäusen keine Tumoren bilden, und zwar auch nicht unter Applikation von Strahlung oder Antilymphozytenserum. Selbst nach zwei Monaten war es noch möglich, MDCK-Zellen aus den Nacktmäusen zu isolieren. Interessanterweise führen analoge Experimente in neugeborenen Nacktmäusen jedoch zur Ausbildung von flüssigkeitsgefüllten, epithelialen Tubuli, die nicht mehr von endogenen, caninen Nierentubuli unterschieden werden konnten (Rindler *et al.*, 1979a).

Zusammengefasst sind MDCK-Zellen aus den oben genannten Gründen die ideale Zelllinie um Epithelien und insbesondere den polaren Proteintransport zu untersuchen. Deshalb sind MDCK-Zellen auch die am besten beschriebene und am häufigsten untersuchte epitheliale Zelllinie (Rodriguez-Boulan *et al.*, 2005). Um jedoch eine vollständige Polarisation der Zellen zu ermöglichen, müssen diese auf einen porösen, permeablen Filter ausgesät werden. Dadurch wird sichergestellt, dass der basolaterale Zellpol Kontakt zum Kulturmedium behält, schließlich wird das Epithel *in situ* durch Diffusion über die basolaterale Seite ernährt. Die durch die Ausbildung von *Tight Junctions* dichte Zellschicht würde ansonsten zu einer apikalen Sortierung essenzieller, normalerweise basolateral lokalisierter Proteine führen (Simons & Virta, 2006).

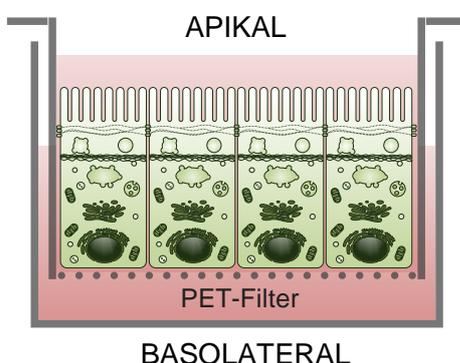


Abb. 2.3 Kultivierung von MDCK-Zellen auf porösen PET-Filtereinsätzen. Durch den PET-Filter bleibt der Kontakt des basolateralen Zellpols mit dem Medium erhalten. Dabei entwickelt sich, im Gegensatz zu einer Kultivierung auf normalen Zellkulturschalen, eine ausgeprägte Polarität der Zellschicht. Dies erlaubt schließlich die genaue Analyse des apikalen und basolateralen Transports. Zusätzlich können dadurch beide Zelloberflächen gesondert bzw. selektiv untersucht werden.

Ein Maß für die entwickelte Dichtigkeit, und dementsprechend auch ein Gradmesser für die Polarität, ist der elektrische Widerstand TEER (*Trans Epithelial Electric Resistance*) zwischen dem apikalen und basolateralen Raum. Damit konnten auch die beiden unterschiedlichen MDCK-Stämme näher charakterisiert und unterschieden werden (Balcarova-Ständer *et al.*, 1984).

2.6.2 Kultivierung von MDCK-II-Zellen

Die Kultivierung aller verwendeten MDCK-II-Zelllinien fand auf 10 cm bzw. 6 cm Plastikpetrischalen bei 37°C, 5% CO₂ und kontrollierten 95% relativer Luftfeuchtigkeit statt. Durch die Hinzugabe von Kohlenstoffdioxid wurde ein konstanter pH-Bereich mittels Bicarbonat-Puffer garantiert, der wiederum mit im Medium enthaltenem Phenolrot ständig überprüft werden konnte. Um die benötigte Polarisierung der Zellen zu erreichen, wurden die Zellen auf PET-Filtern in verschiedenen Multiwellplatten ausgesät.

Das Kulturmedium wurde alle zwei bis drei Tage ausgetauscht. Dabei wurde der Zellrasen auch stets mit dem Lichtmikroskop auf Wachstum und Morphologie kontrolliert.

2.6.3 Medien und Lösungen

Für die folgenden Zelllinien wurden folgende Kulturmedien und Lösungen verwendet, die von GE Healthcare (USA) bezogen wurden. Ausnahme war Zeocin, das von Invitrogen (USA) hergestellt wurde.

MDCK II

MEM mit		Für die Medien stabiler Zelllinien wurden folgende Zusätze verwendet:
10% (v/v)	FKS	0,2 mg/mL Zeocin
1% (v/v)	100x Penicillin/Streptomycin	0,5 mg/mL G418
1% (v/v)	100x L-Glutamin	0,2 mg/mL Hygromycin

2.6.4 Passage von MDCK-II-Zellen

Um eine Kontaktinhibition zu vermeiden, wurden die Zellen nach zwei bis drei Tagen in Kultur auf neue Kulturplatten passagiert. Konfluenz und Vitalität wurden zunächst mittels Lichtmikroskopie verifiziert. Danach wurden die Zellen zweifach mit 10 mL vorgewärmtem PBS behandelt und dadurch von Resten des Zellkulturmediums und insbesondere von FKS befreit. Daraufhin wurden die Zellen mit 2,5 mL Trypsin/EDTA bei 37°C für ca. 10-15 min inkubiert und infolgedessen von der Kulturschale abgelöst.

Die Serinprotease Trypsin spaltet in diesem Vorgang essenzielle Adhäsionsproteine der Zell-Zell- und Zell-Polymer-Verbindungen, wie z. B. verschiedene α - und β -Integrine, sowie der extrazellulären Matrix, wie z. B. Laminin. EDTA unterstützt als Chelator zweiwertiger Kationen diesen Prozess, indem es durch den Entzug von Ca²⁺ und Mg²⁺ die Integrine zusätzlich destabilisiert.

Nach dem Abrunden und Ablösen der Zellen wurde die Reaktion schließlich durch Zugabe von 7,5 mL Medium gestoppt. Anschließend konnten die Zellen in ein 15 mL-Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 115 g pelletiert werden. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen dann in frischem Medium resuspendiert und in 1:4 bis 1:10 Verdünnungen erneut ausgesät.

2.6.5 Kryokonservierung von Kulturzellen

Um die verschiedenen Zelllinien über einen langen Zeitraum lagern zu können, wurden jeweils vier bis acht Ansätze bis zur Konfluenz in Kultur gehalten und schließlich wie in 2.6.4 beschrieben bis zur Pelletierung abgelöst. Das Pellet wurde anschließend jedoch nur in 1 mL Einfriermedium aufgenommen, resuspendiert und in ein sog. Kryoröhrchen überführt. Daraufhin wurden die Zellen für 24 h bei -80°C in einem speziellen Einfrierbehälter gelagert, der mit Isopropanol gefüllt wurde. Dadurch wird eine kontinuierliche, gleichmäßige Einfriergeschwindigkeit von $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ garantiert, was letztendlich zu einer höheren Überlebensrate der Zellen führt. Zu guter Letzt wurden die Zellen dann in einem Flüssigstickstofftank bei -196°C aufbewahrt.

Um die Zellen erneut in Kultur zu nehmen, wurden die Zellen langsam in der Hand erwärmt und in 8 mL frischem Medium aufgenommen. Nach einer Zentrifugation von 5 min bei 115 g konnte das DMSO-haltige Medium abgenommen und durch 10 mL frischen Mediums ersetzt werden. Nach dem Resuspendieren der Zellen wurde der komplette Ansatz auf eine 10 cm Kulturschale überführt.

Einfriermedium

MEM mit 10% FKS und 10% DMSO.

2.6.6 Stabile Transfektion von MDCK-II-Zellen (Lipofektion)

Mit dem Begriff Transfektion wird die Einschleusung exogener DNA bzw. RNA in eine eukaryotische Zelle beschrieben. Dabei gelangt das fremde genetische Material auf noch unbekannte Weise in den Zellkern und wird dort entweder relativ schnell abgebaut (transiente Transfektion) oder in relativ seltenen Fällen stabil in das Genom der Zelle integriert (stabile Transfektion).

Die in dieser Arbeit genutzte Methode zur Transfektion von MDCK-Zellen war die Lipofektion, bei der Phospholipide mit kationischen Lipiden durch Ultraschallbehandlung verbunden und zu Liposomen geformt werden. Reagenzien dieser Art, z. B. Lipofectamine® 2000, sind kommerziell erhältlich und zeichnen sich durch eine hohe Transfektionseffizienz aus. Bei einer Lipofektion interagieren die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA bzw. RNA mit den kationischen Lipiden des Transfektionsmittels, sodass es zu einem Einbau in oder Anheftung an die Liposomen kommt. Die nicht besetzten, positiven Ladungen der Liposomen binden dann z. B. an Sialinsäurereste auf der Zelloberfläche und sorgen schließlich für die Endozytose der Liposomen. Alternativ wird auch das Verschmelzen der Liposomen mit der Plasmamembran diskutiert (Lottspeich *et al.*, 2012).

Eine stabile Transfektion hat den Vorteil, dass der Anteil positiver, d. h. transfizierter Zellen deutlich höher ist, das Konstrukt nicht mehr ausgedünnt wird und ständig auf Zellklone gleicher Qualität zurückgegriffen werden kann. Im Durchschnitt

wird jedoch nur in einer von 10^4 Zellen die Fremd-DNA in das Genom der Zelle eingebaut (Lottspeich *et al.*, 2012). Es müssen deshalb positive Klone mittels dominantem Resistenzgen (mit eukaryotischem Promotor) oder durch Komplementation selektiert werden.

In der Praxis wurden MDCK-Zellen am Tag vor der Transfektion im Verhältnis von 1:5 ausplattiert. Am nächsten Tag wurden dann zunächst die Transfektionsansätze vorbereitet. Dazu wurden sowohl 5 μg DNA mit 1,5 mL Opti-MEM, als auch 10 μL Lipofectamine 2000® mit 1,5 mL Opti-MEM vermischt und für 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Beide Ansätze wurden danach vereint und weitere 30 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen zweifach mit PBS gewaschen. Nach der Inkubation wurde der Transfektionsansatz langsam auf die Zellen getropft. Anschließend wurden die Zellen für 6-8 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Der Transfektionsansatz wurde nun durch frisches Zellkulturmedium ausgetauscht. Am nächsten Tag konnte die Transfektion analog noch einmal wiederholt werden. Für die transiente Transfektion der MDCK-Zellen mit GFP-PSAP wurde diese zweimalige Transfektion durchgeführt, jedoch auf die Vorbereitungen für die stabile Transfektion verzichtet (s. unten) und die Zellen am dritten Tag nach der ersten Transfektion für weiterführende Studien verwendet.

Zwei Tage nach der letzten Transfektion wurden die Zellen jeweils in 1:100, 1:200 und 1:500 Verdünnungen in Selektionsmedium ausgesät. An jedem zweiten Tag musste nun das Medium ausgetauscht werden, um die Konzentration an Selektionsmarker ausreichend hoch zu halten. Nach sieben bis neun Tagen tauchten runde, klonale Zellhaufen auf. Diese Kolonien wurden, nach zweifachem Waschen mit PBS, separat in 24-Multiwellplatten überführt, die vorher mit dem entsprechendem Zellkulturmedium vorbereitetet worden waren. Zur Überführung wurden in Trypsin/EDTA getränkte Whatman-Papiere genutzt, die auf die entsprechende Größe der Kolonien geschnitten waren. Die Papiere wurden auf die einzelnen Kolonien gelegt und für ca. 20 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Papiere in den Multiwellplatten platziert. Nach wiederum zwei Tagen wurden die Whatman-Papiere entfernt, da sich in dieser Zeit genug klonale Zellen auf dem Schalenboden ausbreiten konnten. Nach einiger Zeit und mit dem Erreichen von Konfluenz konnten die Zellklone schließlich auf nächstgrößere Kulturplatten ausgesät werden. Einzelne Klone wurden abschließend mittels Fluoreszenzmikroskop und Western Blot auf den Anteil positiver Zellen und die Expressionsstärke des Konstrukts hin untersucht. Dabei wurden Klone gewählt, deren Rate positiver, transfizierter Zellen bei mindestens 90% lag.

2.6.7 Verwendete Zelllinien

Die folgenden Zelllinien wurden in dieser Arbeit verwendet oder generiert (*).

Tabelle 2-7 Auflistung stabiler Zelllinien

Zelllinie	Exprimiertes Protein	Besonderheiten
MDCK-Gal3-PSAT-V5	Humanes Gal3-PSAT mit V5-Tag	Zeocin
MDCK-Gal3-ASAA-V5	Humanes Gal3-ASAA mit V5-Tag	Zeocin
MDCK-Gal3-PSAP-V5	Humanes Gal3-PSAP mit V5-Tag	Zeocin
MDCK-eGFP	eGFP ohne Fusionsprotein	G418
MDCK-Tsg101-eGFP	Humanes Tsg101 fusioniert mit eGFP	G418
*MDCK-mTsg101-eGFP	Humanes Tsg101 fusioniert mit eGFP; zusätzlich mit mutierter siRNA-Bindestelle	G418
MDCK-Sw-Vps4a^{E228Q}-eGFP	Dominant-negative Mutante von humanem Vps4a, fusioniert mit eGFP; induzierbar durch Mifepriston-Behandlung (basierend auf <i>GeneSwitch</i> -Regulatorprotein)	Zeocin Hygromycin
*MDCK-Sw- Vps4a^{E228Q}-eGFP-Gal3-mCherry	Dominant-negative Mutante von humanem Vps4a, fusioniert mit eGFP; induzierbar durch Mifepriston-Behandlung; zusätzlich mit humanem Gal3, fusioniert mit mCherry	Zeocin Hygromycin G418

2.6.8 RNA-Interferenz

Die RNA-Interferenz ist eine Methode, neben *antisense*-Oligonukleotiden und Ribozymen, die dazu genutzt wird um Zielproteine gezielt „stillzulegen“, d.h. einen sog. „*Knockdown*“ (=Stilllegung auf Translationsebene vs. „*Knockout*“ auf DNA-Ebene) zu erreichen. Fire und Kollegen konnten zeigen, dass RNA-Doppelstränge verschiedene Gene posttranskriptionell ausschalten (Fire *et al.*, 1998). Der zugrundeliegende Mechanismus ist eine Kaskade an der mehrere Proteine bzw. Proteinkomplexe beteiligt sind. Endogen beruht der Vorgang auf *micro*-RNAs (miRNAs), die auf polycistronischen Abschnitten im Genom von Eukaryoten codiert sind (Mir-Gene) und letztendlich als pri-miRNAs transkribiert werden. Diese wiederum werden von der Endonuklease Drosha zerschnitten und bilden dann einzelne *Stem-Loop*-Strukturen, sog. pre-miRNAs, die ins Zytoplasma exportiert werden. Dort angelangt, wird die pre-miRNA von der zweiten Endonuklease Dicer zur fertigen miRNA geschnitten. Ab diesem Punkt kann man die Reaktionskaskade biotechnologisch ausnutzen. Dabei wird exogene, artifizielle *small interfering* RNA (siRNA) in die Zellen transfiziert. siRNA-Moleküle sind zwischen 21-13 bp lang und doppelsträngig, mit jeweils 3'-Überhängen von zwei Nukleotiden. Die siRNA sollte homolog zu der mRNA-Sequenz des Zielproteins sein, dessen Expression inhibiert werden soll. Die siRNA bzw. die endogene miRNA wird anschließend in den RISC-

Komplex (für RNA-induced Silencing Complex) aufgenommen, der aus *Double-Strand* RNA binding-Protein (TRBP), Argonaute2 (Ago2) und Dicer besteht. Letztendlich wird dort der RNA-Doppelstrang gelöst und nur ein Strang führt den RISC-Komplex zur gewünschten, komplementären Ziel-mRNA. Kommt es zu einer perfekten Paarung zwischen siRNA-Strang und mRNA, schneidet Ago2 schließlich die mRNA zwischen Nukleotid 10 und 11 des siRNA/mRNA-Duplexes (Meister *et al.*, 2004), woraufhin die mRNA aufgrund der ungeschützten Enden durch Exonukleasen abgebaut und damit die Expression des Proteins unterdrückt wird.

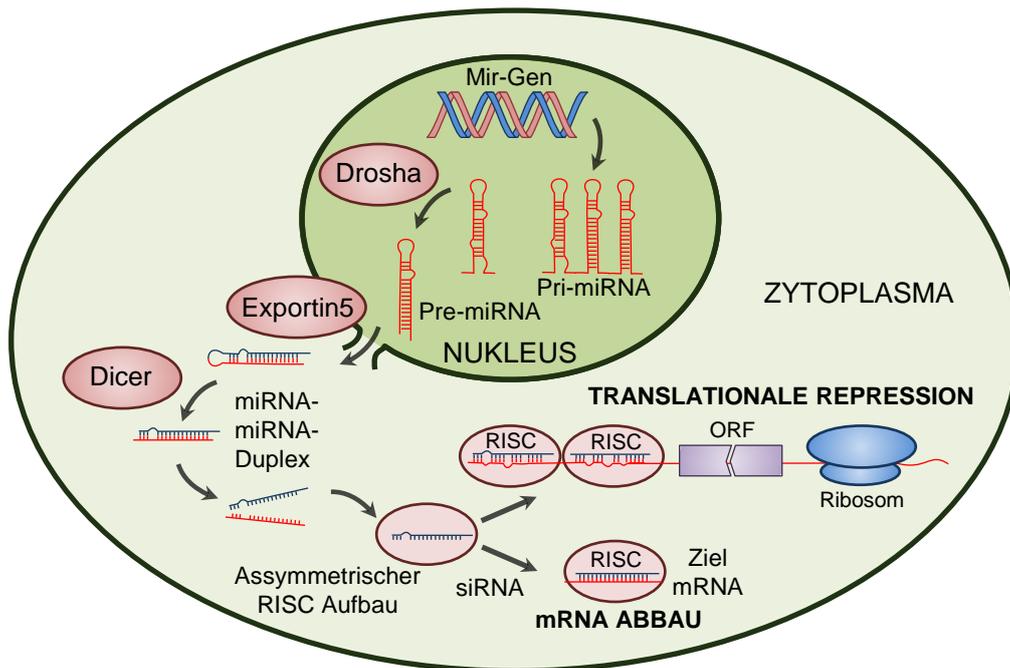


Abb. 2.4 RNAi-Mechanismus. Um den gezielten *Knockdown* eines Zielproteins zu erreichen, macht man sich den endogenen Prozess der RNA-Interferenz zunutze, bei der miRNAs die Translation eines Proteins inhibieren können. Die translationale Repression wird durch eine imperfekte Hybridisierung der miRNA-Matrize des RISC-Komplexes induziert. Im Gegensatz dazu führt eine perfekte Hybridisierung der siRNA-Matrize mit der komplementären mRNA zu einem Abbau und damit zur Unterdrückung (*Knockdown*) des entsprechenden Gens.

In der Praxis wurde die siRNA analog zu 2.6.6, jedoch hier mittels RNAiMAX, eine für RNAs optimierte Version von Lipofectamine 2000, in die Zellen eingebracht. Am Vortag der Transfektion wurden die Zellen 1:5 auf eine Multiwellplatte mit sechs Vertiefungen ausgesät. Die Transfektionsansätze pro *Well*, d. h. 1 μ L siRNA (100 μ M) bzw. 7,5 μ L RNAiMAX mit jeweils 100 μ L Opti-MEM, wurden auch hier für 5 min bei RT getrennt inkubiert, vermischt und schließlich noch einmal für 30 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden in der Zwischenzeit zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurde der Transfektionsansatz auf die Zellen getropft und die Zellen in den Brutschrank zurück gestellt. Nach 10 min wurde schließlich noch 1 mL Medium ohne Zusätze jeder Vertiefung der Multiwellplatte hinzugefügt. Am Folgetag der Transfektion wurde der Transfektionsansatz morgens gegen normales Zellkulturmedium getauscht. Am dritten Tag nach der Transfektion war der *Knockdown* dann schließlich voll ausgeprägt.

Tabelle 2-8 Verwendete siRNA-Duplexe.

Bezeichnung	siRNA-Sequenz	Zielsequenz
Tsg101	5'-GGU UAC CCG UUU AGA UCA A[dT][dT]-3'	NM_006292.3;
	5'-UUG AUC UAA ACG GGU AAC C[dT][dT]-3'	ab Pos. 967
Hrs 1	5'-GGA ACU ACU GGG AGA AGA A[dT][dT]-3'	D84064.1; ab
	5'-UUC UUC UCC CAG UAG UUC C[dT][dT]-3'	Pos. 1094
Hrs 2	5'-GGA ACG AGC CCA AGU ACA A[dT][dT]-3'	D84064.1; ab
	5'-UUG UAC UUG GGC UCG UUC C[dT][dT]-3'	Pos. 418

2.7 Mikroskopie

2.7.1 Fluoreszenzmikroskopie

Der Gebrauch fluoreszierender Chromophore, wie z. B. an Antikörper geknüpfte synthetische Rhodamin-Derivate oder fluoreszierende Proteine, stellte für die moderne Lichtmikroskopie einen Quantensprung dar. Mithilfe der Fluoreszenz konnten nun einzelne Proteine spezifisch markiert und sogar gleichzeitig auf ihre Lokalisation etc. in der Zelle untersucht werden.

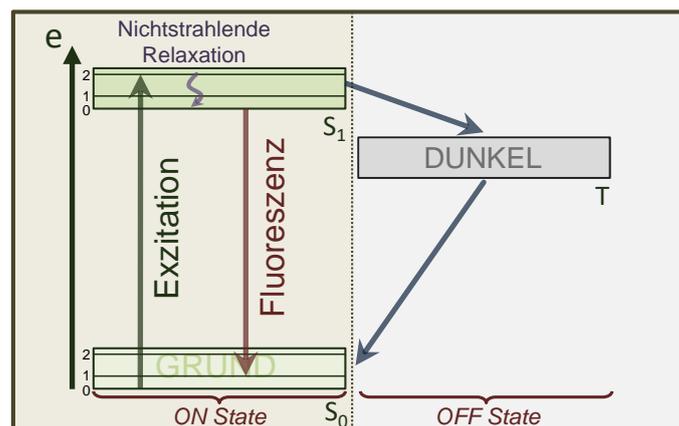


Abb. 2.5 Jablonski-Diagramm zu den verschiedenen Energiezuständen eines Valenzelektrons. Durch die Absorption von Photonen können Valenzelektronen eines Moleküls auf ein höheres, d. h. angeregtes, Energieniveau (S_1) übergehen (Exzitation). Nach der nichtstrahlenden Relaxation auf das niedrigste angeregte Energieniveau, kommt es zum strahlenden Übergang in den Grundzustand durch die Emission von Fluoreszenz-Photonen. Der Grundzustand (S_0) und auch die angeregten Singulettzustände (S_1 und S_2 etc.) besitzen noch mehrere Unterzustände mit unterschiedlichem Energieniveau (angedeutet durch die Zahlen 0-2). Daraus folgt auch, dass anregende Photonen mit unterschiedlichen Energiegehalten für die Exzitation eines Moleküls ausreichen können. Es ergibt sich dementsprechend ein Exzitationsspektrum. Die Emission von Fluoreszenz geschieht ausschließlich von dem niedrigsten angeregten Zustand (Kasha-Regel), wobei die Elektronen auf unterschiedliche Unterzustände des Grundzustands zurückfallen können. Es ergibt sich deshalb auch hier ein Emissionsspektrum. Neben den fluoreszierenden Zuständen gibt es noch den Triplettzustand (T), bei dem keine Photonen ausgesendet werden (sog. *OFF State*). Energie, e.

Die Fluoreszenz fußt auf der Transition von Valenzelektronen ausgedehnter, delokalierter π -Bindungen eines organischen Moleküls in verschiedene Anregungszustände. Dieser Vorgang wird durch spezifisches Exzitationslicht ausgelöst. Anschließend kommt es zunächst zur nichtstrahlenden Relaxation in den vibronischen Grundzustand des angeregten Zustands (Kasha-Regel), gefolgt von der Relaxation in den Grundzustand, die mit der Emission von Lichtquanten einhergeht (=Fluoreszenz).

Die emittierte Wellenlänge ist jedoch aufgrund der nichtstrahlenden Transition in den Schwingungsgrundzustand höher, als die des Exzitationslichts (*Stokes-Shift*).

Fluoreszenz-Mikroskope sind zumeist nach einem gleichen Prinzip aufgebaut, bei dem das Objektiv zugleich als Kondensorlinse dient (s. Abb. 2.6). Das Herzstück ist ein Filter-Würfel, der neben Exzitations- und Emissionsfilter auch einen dichroischen Spiegel enthält. Dieser lenkt das Exzitationslicht auf die Probe, lässt aber, durch eine spezielle Metallbedampfung, nur das Emissionslicht der Fluorophore aufgrund seiner unterschiedlichen Wellenlänge passieren. Abschließend gelangt das emittierte Licht nach Passage eines weiteren Filters zum Detektor.

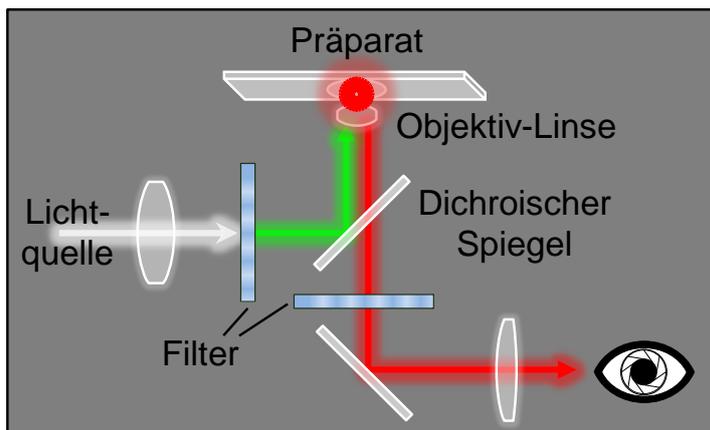


Abb. 2.6 Aufbau eines inversen Fluoreszenzmikroskops.

Das Anregungslicht trifft nach Passage eines Filters auf den dichroischen Spiegel (Strahlteiler), an dem es auf das Präparat gelenkt wird. Dort wird das Anregungslicht von einem fluoreszierenden Stoff absorbiert, woraufhin Licht längerer Wellenlänge (*Stokes-Shift*) als Fluoreszenz emittiert wird. Dieses emittierte Licht kann den dichroischen Spiegel passieren und trifft schließlich nach einem weiteren Filter auf den entsprechenden Detektor.

2.7.2 Lebendzellmikroskopie

Wie der Name schon verrät, wurden bei der Lebendzellmikroskopie lebendige, d. h. nicht-fixierte Zellen analysiert. Eine solche Analyse erlaubt es, die dynamischen Vorgänge in den Zellen zu visualisieren und gibt Einblicke in die zeitliche Abfolge physiologischer Prozesse. Um Proteine für die Lebendzellmikroskopie spezifisch zu markieren, mussten die Zellen entweder transient oder stabil mit fluoreszierenden Fusionsproteinen transfiziert werden (s 2.6.6). Zur Bildaufnahme wurden die vorher auf Deckgläschen ausgesäten Zellen in eine Bachoferkammer überführt und diese mit PBS oder 25 mM HEPES-gepuffertem Medium ohne Phenolrot befüllt. Die sequenzielle Bildaufnahme wurde über einen definierten Zeitraum bei einer Temperatur von 37°C durchgeführt. Für die Lebendzellmikroskopie stand das Mikroskop Leica DMI6000 B zur Verfügung.

2.7.3 Immunfluoreszenzfärbung

Endogene Proteine können durch die spezifische Bindung eines Antikörpers an dessen jeweiliges Antigen markiert und dadurch auf ihre subzelluläre Lokalisation untersucht werden. Bei der indirekten Immunfluoreszenzfärbung wird abschließend dieser Antigen/Antikörper-Komplex durch Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Sekundäntikörper sichtbar gemacht.

Für eine Immunfluoreszenzfärbung wurden die zu präparierenden Zellen zunächst dreimal mit PBS++ gewaschen und fixiert. Die Fixierung wurde entweder für 20 min bei

RT mit 4% Paraformaldehyd (PFA) oder für 5 min mit eiskaltem Methanol bei -20°C durchgeführt. Danach wurden die Zellen erneut dreimal mit PBS++ gewaschen. Wurde PFA benutzt, musste zusätzlich noch eine Permeabilisierung mit 0,1% Triton X-100/PBS und drei zusätzliche Waschschrte mit PBS++ angeschlossen werden. Anschließend konnten unspezifische Protein-Bindungsstellen durch eine Inkubation mit 5% Ziegen Serum/PBS für 45 min bei RT abgesättigt werden. Ab diesem Inkubationsschritt wurden die Zellen in eine sog. „feuchte Kammer“ überführt. Nun wurde der Primärantikörper mit 5% Ziegen Serum/PBS verdünnt und für 2 h bei RT auf die Zellen gegeben. Um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers zu vermeiden, wurde viermal mit PBS++ gewaschen, wobei beim letzten Schritt das PBS++ erst nach 3 min abgenommen wurde. Dies sollte sicherstellen, dass der Antikörper gut ausdiffundieren konnte. Danach erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden AlexaFluor gekoppelten Sekundärantikörper für 1 h bei RT, in der Regel in 1:100 Verdünnung in PBS++. Auch hier wurde das gesonderte Waschschemata gewählt, analog zum Primärantikörper, um überschüssigen Antikörper zu entfernen.

Für die konfokale Mikroskopie (s. 2.7.6) wurden die Zellen zusätzlich mit dem Kernfarbstoff Hoechst 33558 versehen. Dabei wurde Hoechst 33558 1:2000 in PBS verdünnt und für 10 min bei RT inkubiert. Nach dreifachem Waschen mit PBS konnten die Deckgläschen schließlich nach unten mit einem Tropfen *Pro-Long Diamond* (Invitrogen) eingedeckelt werden. Für die ultrahochauflösende Lichtmikroskopie wurden die Zellen entweder direkt in das jeweilige Medium eingedeckelt (s. 2.7.7) oder in PBS gelagert.

2.7.4 Proximity Ligation Assay (PLA)

Der *Proximity Ligation Assay* (PLA) basiert auf einer Kombination aus Immunfluoreszenzfärbung (s. 2.7.3) und einer *Rolling Circle* DNA-Replikation (s. Abb. 2.7). Die Methode erlaubt es, die räumliche Nähe zweier Proteine zu visualisieren und eignet sich damit hervorragend dazu, Erkenntnisse sowohl aus biochemischen Interaktionsstudien, wie der Ko-Immunpräzipitation (s. 2.9.7) oder dem GFP-*Pull-down* (s. 2.10.4), als auch aus Mikroskopie-gestützten Kollokalisationsstudien zu verifizieren.

Die Durchführung eines PLAs beginnt zunächst mit einer klassischen Immunfluoreszenzfärbung fixierter Zellen. Nach der Inkubation der jeweiligen Primär-Antikörper, die gegen das gewünschte Protein-Pärchen gerichtet sind, deren etwaige Interaktion (oder besser räumliche Nähe) untersucht werden soll, werden PLA-spezifische Sekundär-Antikörper verwendet. Diese tragen zwar keinen Farbstoff, sind dafür aber mit kurzen Oligonukleotiden gekoppelt. Liegen die beiden zu untersuchenden Proteine näher aneinander als 40 nm, bildet sich, zusammen mit zugegebenen Konnektor-Nukleotiden und einer Ligase, ein zirkulärer DNA-Strang aus. Danach, in einer weiteren Reaktion, dient dieser zirkuläre Strang einer DNA-Polymerase als

Matrize, die in einer *Rolling Circle Amplification* (RCA) hundertfach vervielfältigt wird. Zusätzlich kommt es zum Einbau von Fluoreszenz-markierten Hybridisierungs sonden, die es letztlich erlauben, die Orte der Protein-Interaktion bzw. räumlichen Nähe im Mikroskop auszuwerten. Durch die Vervielfältigung und der daraus resultierenden Signalverstärkung ist diese Methode sehr sensitiv, was allerdings auch die Absicherung durch eine Reihe von Kontrollen nötig macht.

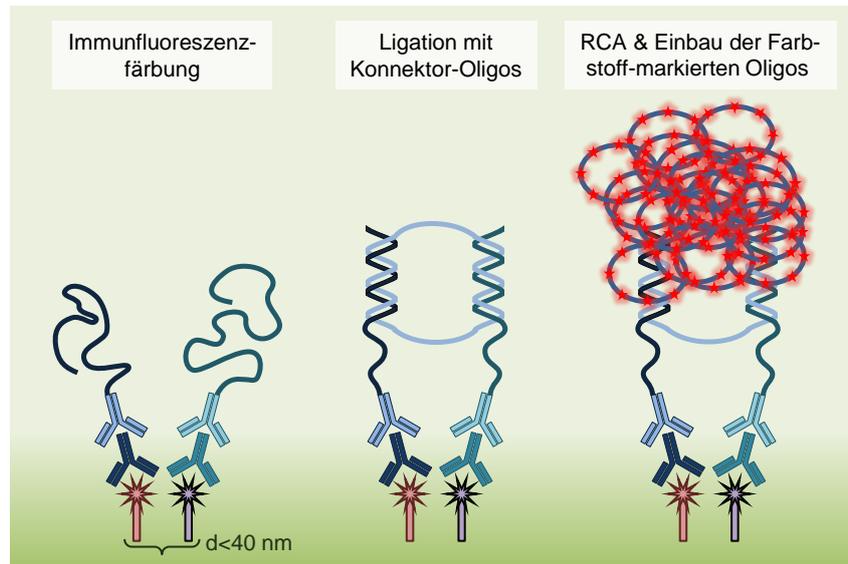


Abb. 2.7 In situ Proximity Ligation Assay. Der PLA beginnt zunächst mit der spezifischen Markierung der beiden möglichen Interaktionspartner mithilfe von Erstantikörpern. Der Zweitantikörper ist jeweils mit einem Oligonukleotid versehen, das zusammen mit Konnektor-Oligonukleotiden zu einem zirkulären DNA-Strang ligiert werden kann, wenn sich beide Proteine in einer Entfernung $<40 \text{ nm}$ befinden. Abschließend kommt es zur Amplifikation des Stranges durch eine DNA-Polymerase, die zudem den Einbau von Fluoreszenz-markierten Oligonukleotiden erlaubt.

Der PLA wurde mithilfe des Kits *Duolink In Situ PLA* (Olink Bioscience) durchgeführt. Die Behandlung, einschließlich Kultivierung, Fixierung und Permeabilisierung der Zellen erfolgte dazu wie in der Immunfluoreszenzfärbung. Das Ziegen serum für das Blocken unspezifischer Bindestellen und für die Erstantikörper-Inkubation wurde jedoch durch die Blockierlösung des Kits ersetzt. Daraufhin wurden die Oligonukleotid-konjugierten Sekundär-Antikörper für 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal 5 min mit Waschpuffer A gewaschen. Nun konnte die Ligation durchgeführt werden, indem der Stocklösung 1:5 mit *Aqua bidestillata* (ddH_2O) verdünnt und die Ligase 1:40 ebendieser verdünnten Lösung hinzugefügt wurde. Die Ligation erfolgte für 1 h bei 37°C . Vor der Polymerasereaktion wurden die Zellen zweimal je 5 min in Waschpuffer A inkubiert. Der Amplifikationspuffer wurde, wie zuvor der Ligationspuffer, 1:5 mit ddH_2O verdünnt, die Polymerase wurde jedoch im Verhältnis 1:80 dieser verdünnten Lösung hinzugefügt. Die Reaktion fand bei 37°C statt, wobei die Inkubationsdauer 100 min betrug. Abschließend wurden die Zellen zweimal für je 10 min mit 1x Waschpuffer B gewaschen, worauf nochmals ein Waschgang mit 0,01x Waschpuffer B folgte. Für die Mikroskopie wurden

die Zellen in PLA-Einbettmedium eingedeckelt, das zusätzlich den Kernfarbstoff DAPI enthielt.

2.7.5 BacMam-Färbung

Um zu verifizieren, ob die positiven PLA-Signale der Kontrolle zwischen Kif5A und α Tubulin wirklich an Mikrotubuli lokalisiert waren, wurde neben dem PLA mithilfe von Baculoviren eine Transduktion von MAP4-EmGFP vorgenommen (BacMam). Da es sich bei Baculoviren um Insektenviren (Lepidoptera-Raupen) handelt, die sich nicht in Säugerzellen replizieren können und keinerlei zellschädigende Wirkung haben, konnten diese Versuche bei Sicherheitsstufe 1 durchgeführt werden (BSL1). Um die Viren für die transgene Expression in Säugerzellen vorzubereiten, wurden diese vom Hersteller mit einer entsprechenden Expressionskassette ausgestattet (verbesserter CMV-Promotor, sowie *Woodchuck Hepatitis Virus post-transcriptional Regulatory Element* (WPRE), das die transgene Expression erhöht (Zufferey *et al.*, 1999, Ramezani *et al.*, 2000)). Für einen effizienten Zelleintritt wurde außerdem das Kapsid modifiziert.

Für die Gen-Transduktion von MAP4-EmGFP wurde das *CellLight BacMam*-Kit von Life Technologies entsprechend der Herstellerangaben verwendet.

2.7.6 Konfokale Laser *Scanning* Mikroskopie (KLSM)

Der Nachteil konventioneller (Epi-) Fluoreszenz-Mikroskopie ist das Ausleuchten aller Zellebenen, was Streulicht von außerhalb der Fokusebene induziert und dementsprechend in einem geringen Kontrast resultiert.

Aus diesem Grund werden in der KLSM konfokale Lochblenden genutzt, um ausschließlich Fluorophore innerhalb der Fokusebene anzuregen und zu detektieren. Daraus ergibt sich, dass das Laserlicht auf einen einzigen Punkt in der Probe fokussiert werden muss (Fokalpunkt). Der Fokus des entstehenden Emissionslichts wird wiederum auf einen zweiten Punkt gelegt (Konfokalpunkt). Eine Lochblende vor dem Detektor verhindert das Aufzeichnen von Streulicht, das nicht aus der Fokusebene stammt. Das Präparat wird dementsprechend Punkt für Punkt abgerastert, wobei der Lichtpunkt mittels Galvanometer-betriebener Spiegel über die Probe geführt wird. Erst im Computer wird das Bild abschließend zusammengesetzt.

In dieser Arbeit wurde ein Leica KLSM-Modul TCS SP2 verwendet. Dieses war auf einem DM IRE2 Stativ montiert. Das Mikroskop verfügte über einen Argon-Ionen-Laser mit verschiedenen, einstellbaren Wellenlängen (458 nm, 476 nm, 488 nm, 496 nm, 514 nm), sowie einen Dioden-Laser (405 nm) und zwei Helium-Neon-Laser (543 nm, 633 nm). In der Regel wurde ein HC PL APO 63x/1,40 Öl-Objektiv genutzt. Das Herzstück des Mikroskops ist ein *Acousto-Optical-Beam-Splitter* (AOBS), der zusammen mit *Acousto-Optical-Tunable-Filtern* (AOTF), sowie einem speziellen Detektionsmodul zum einen für eine besonders hohe Flexibilität bei der Wahl der Chromophore sorgt und zum anderen die gleichzeitige Auswertung mehrerer Fluoreszenz-Kanäle möglich

macht. Das Prinzip des AOTFs und des AOBS basiert auf einem Kristall, in dem Schallwellen durch ein Piezo-Element generiert werden. Dadurch kann der Laserstrahl, ähnlich wie in einem dichroischen Spiegel, aufgespalten werden oder in seiner Intensität reguliert werden (Beugung am Gitter).

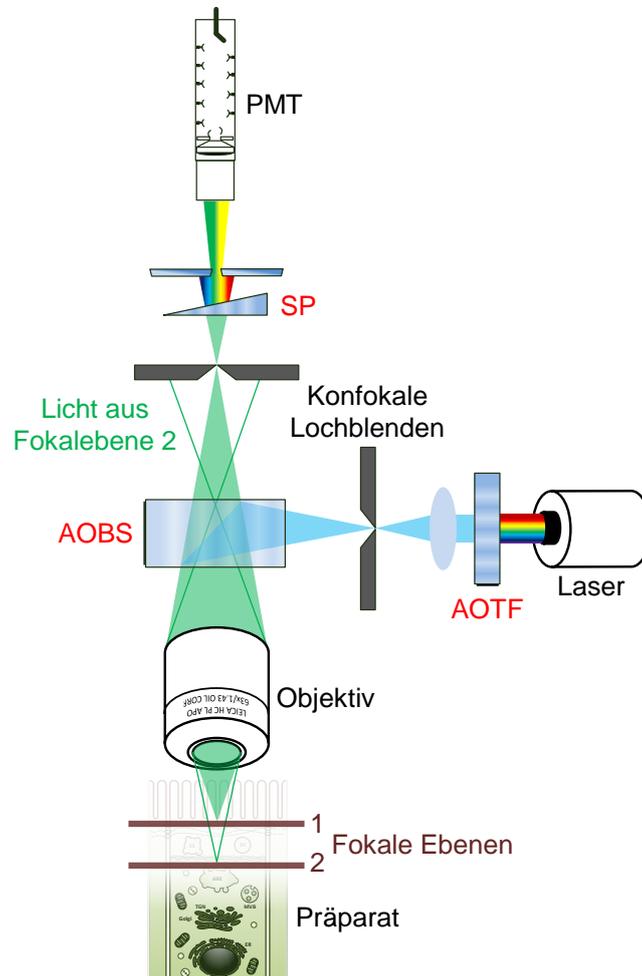


Abb. 2.8 Schematischer Aufbau eines Konfokalen-Laser-Scanning-Mikroskops. Durch den Einsatz zweier konfokaler Lochblenden wird das Licht aus umliegenden Fokalebenen ausgeblendet (Fokalebene 2). Aufgrund des speziellen Aufbaus des verwendeten Mikroskops, bestehend aus *Acousto-Optical-Tunable-Filter*, *Acousto-Optical-Beam-Splitter* und dem SP-Detektionsmodul (s. Abb. 2.9) war es möglich, die Exzitations- und Emissionsspektren frei und flexibel auf die verwendeten Fluorophore abzustimmen.

Das Detektionsmodul besteht aus einem Prisma (SP), das den Emissionsfilter ersetzt und das emittierte Licht in ein Spektrum aufteilt (s. Abb. 2.9). Die verschiedenen Spektralbänder können dann mithilfe von beweglichen Spiegeln ausgewählt werden, die vor dem jeweiligen *Photomultiplier* (PMT) installiert sind. Die restlichen Farbbänder des Spektrums werden wiederum von den Spiegeln reflektiert und können von weiteren PMTs ausgewertet werden.

Kurzum, man ist aufgrund dieses speziellen Aufbaus mit AOTF/AOBS und Prisma nicht auf festgelegte Filterblöcke angewiesen und kann mehrere Fluorophore gleichzeitig analysieren. Um jedoch einen *Crosstalk*, d. h. die Detektion eines falsch-positiven Signals von Fluorophor I in dem Kanal von Fluorophor II zu verhindern, wurde bei Fluorochromen mit breitem Emissionsspektrum ein sog. sequenzieller *Scan*

angewandt. Alle Bildaufnahmen erfolgten mit einer Auflösung von 512x512 Bildpunkten, wobei jeder Bildpunkt 16 Mal abgerastert und schließlich gemittelt wurde. Die Auswertung der Aufnahmen erfolgte mithilfe von Leica LCS, Leica LAS X, ImageJ und Volocity.

Zur Auswertung der Kollokalisationsstudien wurde der Manders-Koeffizient verwendet. Zunächst wurden mithilfe der Software alle vesikulären Strukturen des jeweiligen Protein-Pärchens identifiziert und anschließend der Manders-Koeffizient für die überlappenden Vesikel berechnet. Der Manders-Koeffizient besteht aus zwei Komponenten M_x und M_y , je nach dem welches Protein des Pärchens analysiert werden soll. In der vorliegenden Arbeit wurde stets der Manders-Koeffizient der Gal3-Vesikel verwendet, d. h. kollokalisieren mehr als 50% des korrespondierenden Proteins mit dem Gal3-Vesikel (= Manders-Koeffizient > 0,5), so wurde dies als Kollokalisierung aufgefasst. Diese Methode ist sehr konservativ, da folglich mehr als 50% des Gal3-Vesikels ebenfalls Signal des anderen Protein-Kanals aufweisen muss, ansonsten wird dieses Vesikel als nicht-kollokalisiert aufgefasst. Allerdings ist der Manders-Koeffizient anfällig bei starkem Hintergrund.

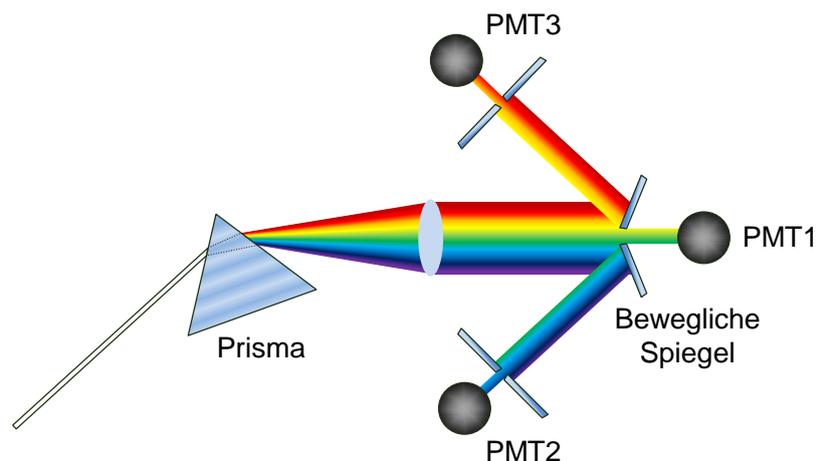


Abb. 2.9 Spektrales Detektionsmodul (SP) mit drei PMTs. Die Aufspaltung des Emissionslichtes erlaubt zum einen die flexible Wahl von Fluorophoren, zum anderen aber auch die simultane Aufnahme mehrerer Farbkanäle. Die PMTs sind mit beweglichen Spiegeln versehen, die die Wahl eines spezifischen Spektralbandes ermöglichen.

2.7.7 Ground State Depletion Microscopy Followed by Individual Molecule Return (GSDIM)

Die maximal mögliche Auflösung eines Lichtmikroskops ist beugungsbegrenzt und liegt bei ca. 200 nm, d. h. Objekte, die näher als 200 nm beieinander liegen, sind optisch nicht mehr als getrennt wahrzunehmen. Diese physikalische Auflösungsgrenze d wurde erstmals von Ernst Abbe im Jahr 1873 formuliert (Abbe, 1873):

$$d = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha} \quad 2.1$$

Demzufolge kann bei Gebrauch eines idealen Öl-Immersionsobjektivs ($n=1,52$; $\alpha=45^\circ$) und dem energiereichsten Licht des sichtbaren Bereichs mit einer Wellenlänge $\lambda=400$ nm keine höhere laterale Auflösung als ca. 200 nm erzielt werden. Die numerische Apertur des Objektivs wird dabei mit $nsin(\alpha)$, der Brechungsindex des Immersionsmediums mit n und der halbe Öffnungswinkel des Objektivs mit α beschrieben. Daraus folgt unmittelbar, dass sich eine höhere Auflösung nur durch eine Verkleinerung der verwendeten Wellenlänge erreichen lässt. Auf dieser Überlegung basiert das Prinzip der Elektronenmikroskopie (s. 2.7.10).

Die von Abbe beschriebene fundamentale Auflösungsgrenze kann nicht durchbrochen, wohl aber umgangen werden: Ließe sich gesichert ein einzelnes Fluorochrom isoliert detektieren, würde es zwar beugungslimitiert erfasst, aber man könnte durch die Kenntnis der Punktspreizfunktion (PSF) die Koordinaten seines Ursprungs mittels Algorithmen bestimmen. Nach der sequenziellen Detektion, d. h. zeitlichen Trennung aller Fluoreszenz-Ereignisse erhielte man dann durch Überlagerung aller ermittelten Lokalisationen eine ultrahochoflösende Übersicht der einzelnen Ausgangspunkte. Die Grundlage aller Nanoskopie-Methoden jenseits des absoluten Abbe-Kriteriums ist dementsprechend das sequenzielle An- und Abschalten der Fluoreszenz einzelner Moleküle (s. Abb. 2.10).

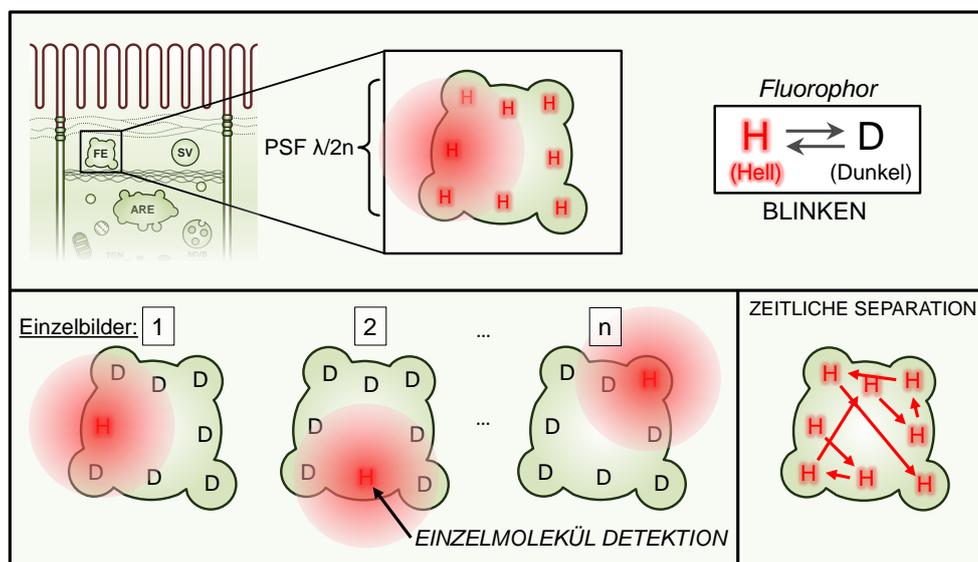


Abb. 2.10 Detektionsmechanismus der GSDIM. Der Schlüssel zur Nanoskopie ist das zyklische Wechseln zwischen Hell- und Dunkelzuständen der Fluorophore. Durch die zeitliche Separation der Fluoreszenzsignale ist es möglich, die Ursprungskoordinaten des Beugungs-limitierten Blink-Ereignisses zu berechnen und durch Überlagerung von n Einzelbildern ein ultrahochoflösendes Bild der einzelnen Fluorophor-Moleküle zu gewinnen.

Um dieses hin und her Pendeln zwischen Fluoreszenz- und Dunkelzuständen in der *Ground State Depletion Microscopy Followed By Individual Molecule Return* (GSDIM) zu erreichen, werden alle Fluorochrom-Moleküle zunächst in den Tripletzustand (=Dunkelzustand) gebracht (s. Abb. 2.11 und Abb. 2.13). Aus dem relativ langlebigen Dunkelzustand (mit $\tau=10^{-3}$ bis 100 ms) fallen dann nach und nach zufällig Fluorophore

für einige Zyklen in den fluoreszierenden Zustand zurück, was schließlich als sog. „Blinken“ detektiert werden kann.

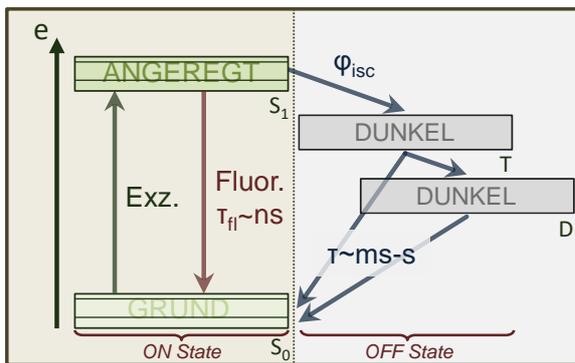


Abb. 2.11 Jablonski-Diagramm der relevanten Energiezustände und deren Lebensdauer. Durch das Anlegen bestimmter Exzitationswellenlängen (Exz.) werden Valenzelektronen auf höhere Energieniveaus gehoben (Singulettzustand S_1). Nach der Zeit τ_{fl} fallen die Elektronen von diesem Energieniveau unter der Emission von Fluoreszenz-Photonen in den Grundzustand zurück. Die Wahrscheinlichkeit für eine Spinumkehr φ_{isc} ist sehr gering, sodass ein hoher Energieeinsatz nötig ist, um die Elektronen in den langlebigen Dunkelzustand (Triplett- T und weitere Radikalzustände D) zu überführen.

Für Elektronen ist die Wahrscheinlichkeit, durch die Absorption von Anregungsphotonen in den Triplettzustand zu wechseln, mit $\varphi_{isc} \leq 0,1\%$ relativ gering, da es hierbei zu einer Spinumkehr und damit zu einem quantenmechanisch verbotenen Vorgang kommt (*Intersystem Crossing*, ISC). Über den Triplettzustand werden sogar noch langlebigere Radikalzustände D (mit $\tau=1$ bis 10^4 ms) erreicht. Die Sättigungsintensität I_s , auf die die Fluorophore angewiesen sind, um in den Triplettzustand überzutreten ist gegeben durch:

$$I_s = \frac{h\nu}{\varphi_{isc}\sigma\tau} \approx 1 \frac{kW}{cm^2} \quad 2.2$$

mit der Energie des Exzitations-Photons $h\nu$ und dem Absorptionsquerschnitt σ des Fluorophors im Grundzustand (Fölling *et al.*, 2008). Um jedoch überhaupt durch das Blinken der Fluorophore einzelne Moleküle differenzieren zu können, muss sich der Großteil aller Chromophore im Dunkelzustand befinden. Durch das Anlegen der Intensität $I > I_s$ und unter Berücksichtigung der Zeitdauer des Triplett- ($\tau=10^{-3}$ bis 100 ms) bzw. des Singulett-Zustands S_1 (Fluoreszenzlebensdauer $\tau_{fl} \approx 3$ ns), ergibt sich dementsprechend der Anteil ε im Grundzustand (Fölling *et al.*, 2008):

$$\varepsilon \approx \frac{\tau_{fl}}{\varphi_{isc}\tau} \ll 10\% \quad 2.3$$

Nach der Zeit τ gelangen einige Valenzelektronen spontan zurück in den Grundzustand S_0 , aus dem es wiederum durch die konstante Beleuchtung des Präparats zu einer Reexzitation kommt. Dabei können, aufgrund der höheren Wahrscheinlichkeit (vgl. φ_{isc}), zunächst mehrere Fluoreszenz-Zyklen durchlaufen werden (S_0 - S_1 , S_1 - S_0 ; Blinken), bevor das Fluorophor wieder in den Dunkelzustand wechselt. Diese stochastisch auftretende Lichtemission aus schnellen, sich wiederholenden Blinkereignissen wird durch eine sehr sensitive EMCCD-Kamera über die Zeit erfasst und in zehntausenden Bildern in möglichst schneller Abfolge aufgenommen (s. Abb. 2.10).

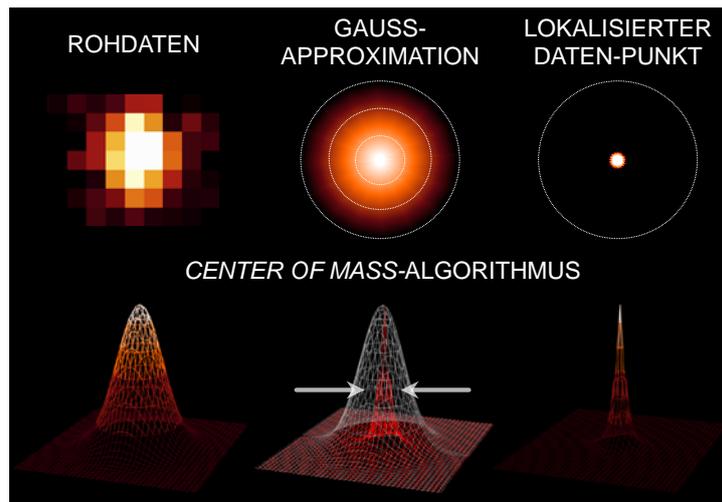


Abb. 2.12 Prinzip des GSDIM-Algorithmus. Die Beugungsgrenze des Lichts kann durchbrochen werden, indem die Fluoreszenz-Signale zeitlich voneinander getrennt aufgenommen werden. Der Ursprung bzw. Schwerpunkt eines einzelnen Blink-Ereignisses kann dann mithilfe eines *Fitting*-Algorithmus bestimmt werden. Dazu wird die PSF eines Blink-Ereignisses einer Gauß-Funktion angenähert. Die errechneten Koordinaten werden dann nach der Aufnahme von n Blink-Ereignissen in die GSDIM-Projektion eingetragen und ein Bild in Hochauflösung rekonstruiert.

Um die Beugungsgrenze des Lichts zu durchbrechen, muss letztendlich der Ursprung bzw. Schwerpunkt eines einzelnen Blinkereignisses mithilfe eines *Fitting*-Algorithmus bestimmt werden (s. Abb. 2.12). Dazu wird ein Blinkereignis bzw. die PSF einer zweidimensionalen Gauß-Funktion angenähert, wodurch sich die Koordinaten des Blinkzentrums relativ einfach berechnen lassen (*Center of Mass*). Demzufolge ergibt sich eine Auflösung d , bei der Emission von m Photonen pro Blinkereignis, von:

$$d = \frac{\lambda}{2n \sin(\alpha) \sqrt{m}} \quad 2.4$$

Das heißt, je heller das distinkte Blinkereignis, desto besser kann der oben genannte statistische Algorithmus die Ursprungskoordinaten des Lichtpunktes bestimmen und desto kleiner wird der Fehler in der Positionsbestimmung. Daraus folgt jedoch auch, dass sich für die Auflösung eine statistische Verteilung ergibt, da m zwischen den Ereignissen variiert. Deshalb wird ein Schwellenwert $M < m$ gesetzt, sodass alle Moleküle verworfen werden, die diesen Wert nicht erreichen. Zusammengefasst ergibt sich daraus die finale Auflösung d der GSDIM von:

$$d = \frac{\lambda}{2n \sin(\alpha) M} \quad 2.5$$

Nachdem n Blink-Ereignisse von einem einzelnen Molekül detektiert wurden, kann die Software die Gesamtheit aller berechneten Ursprungskoordinaten in die GSDIM-Projektion auftragen und so ein hochauflösendes Bild rekonstruieren. Je mehr die einzelnen Lokalisations-Koordinaten überlappen, desto heller erscheint diese Stelle in der GSDIM-Projektion und desto besser kann die reale Position eines einzelnen Moleküls bestimmt werden.

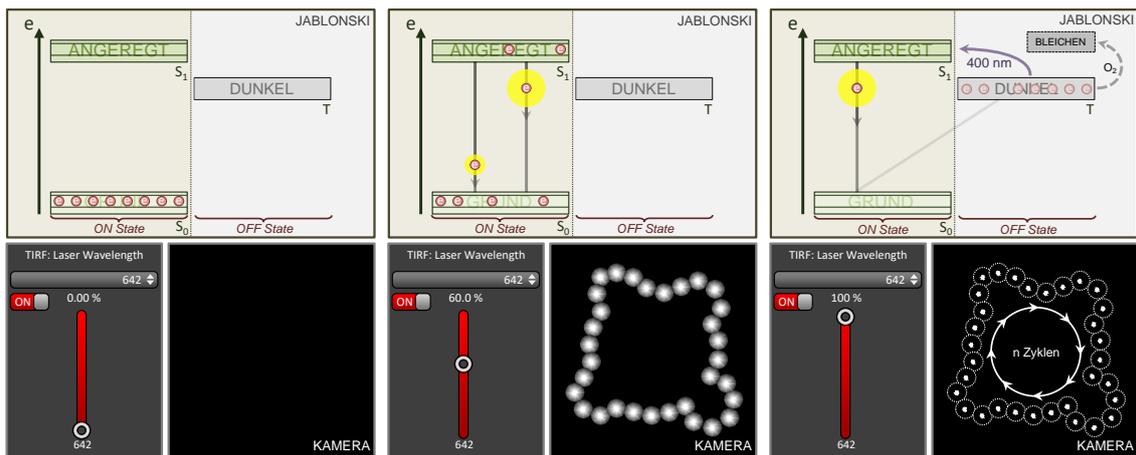


Abb. 2.13 Jablonski-Diagramm der relevanten Energiezustände in der GSDIM. Die Valenzelektronen der Fluorophore können die Energie einstrahlender Photonen absorbieren und werden dadurch ausgehend vom Grundzustand (S_0) in höhere Energiezustände, wie z. B. den S_1 -Zustand, angeregt. Von dort können die Elektronen einerseits in den Grundzustand relaxieren, wobei Fluoreszenz emittiert wird, andererseits ist bei sehr hoher Energiezufuhr auch eine Spinumkehr möglich, d. h. vom Singulett- in den Triplett-Zustand (T) oder andere noch langlebigere Radikal-Zustände. Da dies einen strahlungslosen Übergang darstellt, wird die Fluoreszenz der Fluorophore praktisch ausgeschaltet. Die Elektronen fallen schließlich spontan aus dem Triplett-Zustand in S_0 , sodass es zu einer Reexzitation kommen kann. Die Elektronen durchlaufen mehrere Fluoreszenz-Zyklen, bis es schließlich wieder zum ISC in den Triplett-Zustand kommt und das Fluorophor ausgeschaltet wird (Blinken). Durch einen kurzwelligen Laser (400 nm) lässt sich dieser Prozess beschleunigen, sodass die Blinkrate der Fluorophore steigt. Durch das stochastische An- und Ausschalten und der daraus resultierenden Vereinzelung der PSF, kann die genaue Lokalisation der Fluorophore nach und nach bestimmt werden (gestrichelte Linie). Aus dem Triplett-Zustand heraus können Fluorophore relativ schnell ausbleichen, deshalb muss bei der GSDIM ein spezielles Einbettmedium verwendet werden.

Bei der GSDIM ist es von grundlegender Bedeutung, dass sich die große Mehrzahl an Fluorophoren im Dunkelzustand befindet. Daher sollten solche Fluorophore ausgewählt werden, die erstens über einen möglichst langanhaltenden Dunkelzustand verfügen, da ansonsten zu viele Blink-Ereignisse im Abstand $<\lambda/2$ auftauchen. Dies würde den GSDIM-Erfassungsalgorithmus beeinträchtigen und damit indirekt die Auflösung herabsetzen (vgl. auch Formel 2.3). Zweitens sollten Fluorophore benutzt werden, die sehr hell blinken (s. Formel 2.4) und möglichst viele Fluoreszenz-Zyklen durchlaufen. In beiden Fällen hat das jeweilige Einbettmedium einen entscheidenden Einfluss, einerseits auf den Dunkelzustand und andererseits auf die Blink-Leistung, sodass dem Einbettmedium eine fundamentale Rolle in der GSDIM-Mikroskopie beikommt (Heilemann *et al.*, 2009). Dabei geht es darum, die Zeitspanne im Dunkelzustand durch die Stabilisierung des Triplettzustands zu verlängern. Dieser ist die Grundvoraussetzung für das Eintreten in noch langlebigere Dunkelzustände D (s. Abb. 2.11). Deshalb wird zum einen durch enzymatische Eliminierung von Sauerstoff bzw. Sauerstoff-Radikalen (Bsp. Glukose-Oxidase-Katalase-Mix), oder zum anderen durch das Induzieren von radikalischen Zuständen (durch Reduktion; Bsp. MEA; s. dazu auch Fölling *et al.*, 2008) der Anteil an Fluorophoren im Triplettzustand erhöht (Steinhauer *et al.*, 2008). In der Praxis wurden die Zellpräparate dafür in eine Mischung aus *Vectashield* und Glycerin-Tris-Puffer eingebettet (GSDIM-Einbettmedium).

Um die Zellen für die GSDIM-Mikroskopie einzubetten, wurden 75-100 μL GSDIM-Medium in die Vertiefung des Objektträgers pipettiert, woraufhin die Deckgläschen mit den Zellen in Richtung der Vertiefung vorsichtig aufgesetzt werden konnten. Dabei mussten Lufteinschlüsse unbedingt vermieden werden. Durch leichten Druck wurde überflüssiges Medium aus der Vertiefung gedrückt und möglichst ohne Rückstände mithilfe von Filterpapier entfernt. Die beiden Twinsil®-Komponenten wurden 1:1 vermischt und auf die Kante des Deckgläschens appliziert. Nach 10-15 min war das Zwei-Komponenten-Silikon ausgehärtet, sodass die Oberfläche des Deckgläschens noch einmal mit Ethanol gesäubert werden konnte. Das Präparat war nun bereit für die GSDIM-Mikroskopie.

Die GSDIM-Versuche wurden mit einem Leica SR GSD durchgeführt, das auf einem inversen Leica DMI6000B Stativ basiert. Um systemischen Drift und Bewegungsartefakte durch die relativ lange Erfassungszeit der Bildserien zu vermeiden, war das „HCX PL APO 160x/1.47 oil TIRF-corrected“-Objektiv über einen Nanopositionierer P-725-4CD PIFOC (Physik Instrumente) direkt am Objektisch befestigt. Zusätzlich wurde ein spezieller Objektisch verwendet, der mit einer sog. *Suppressed-Motion*-Technologie versehen war. Außerdem war das Stativ auf einem aktiv Schwingungs-dämpfenden Tisch installiert (TS-140, Table Stable Ltd). Als Detektor

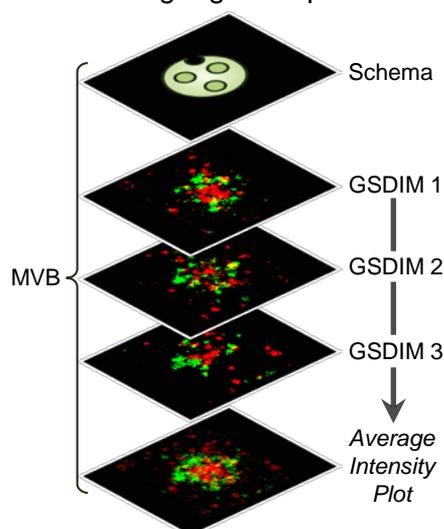


Abb. 2.14 Berechnung der Average Intensity Plots.

Die *Average Intensity Plots* wurden durch Überlagerung einzelner MVB-Aufnahmen berechnet und die durchschnittliche Intensität in einer Ebene aufgetragen. Dabei wurde auf ein technisches *Alignment* oder andere Anpassungen verzichtet.

fungierte die sehr schnelle EMCCD-Kamera iXon DU-897 (Andor Technology). Es wurden vier Feststoff-Laser mit den Wellenlängen 405 nm, 488 nm, 532 nm und 647 nm verwendet, die mit den passenden Bandpassfiltern 555/100, 610/100 und 700/100 ausgestattet waren. Als Steuerungs- und Auswertsoftware wurde auf Leica LAS X zurückgegriffen.

Nach der Aufnahme war es wichtig, die erreichte Auflösung bzw. Lokalisations-Präzision des jeweiligen Kanals, d. h. eines jeden Fluorophors, einzeln zu bewerten und zu überprüfen. Zur Approximation dieser wichtigen Kenngrößen existieren für die stochastische Lokalisations-Mikroskopie wie die GSDIM mehrere Methoden.

In der vorliegenden Arbeit wurde zum einen die Halbwertsbreite (*Full Width at Half Maximum*, FWHM) 21 einzelner Punkte gemittelt und darüber hinaus die sog. Fourier-Ring-Korrelation (FRC) berechnet (Nieuwenhuizen *et al.*, 2013, Banterle *et al.*, 2013). Um die charakteristischen Formationen der Gal3-Akkumulation an der MVB-Membran

besser darstellen zu können und dadurch eine gesicherte Klassifizierung zu ermöglichen, wurden *Average Intensity Plots* angefertigt. Dazu wurde eine variierende Anzahl von einzelnen MVBs ohne technische Prozessierung oder *Alignment* mithilfe des *ImageJ-Plugins* „Stacks“ übereinander gelegt, die durchschnittliche Intensität berechnet und schließlich in einer Ebene aufgetragen.

2.7.8 3D-GSDIM-Mikroskopie

Die 3D-GSDIM-Mikroskopie erlaubt es sogar in räumlicher Darstellung zelluläre Prozesse in Hochauflösung zu visualisieren. In diesem System sorgt eine in den Lichtpfad eingebrachte Zylinderlinse für einen optischen Astigmatismus, der solche Blink-Ereignisse elliptisch verzerrt, die sich nicht in der fokalen Ebene befinden (s. Abb. 2.15). Liegt die PSF des Ereignisses oberhalb der fokalen Ebene, so wird die PSF horizontal verzerrt. Liegt sie hingegen unterhalb der Ebene, so entsteht eine vertikale Verzerrung (s. Abb. 2.16). Die Software korreliert schließlich anhand dieser Verzerrung jedes Blink-Ereignis mit einer eigenen z-Koordinate. Offenkundig muss dazu das Gerät bzw. das Programm gut kalibriert sein. Auch die Anforderungen an die Färbung und die Einbettmethode sind ungleich höher, da in diesem Fall der Algorithmus, aufgrund der Verzerrungen, deutlich anfälliger ist und die Elliptizität jedes einzelnen Ereignisses bewertet werden muss.

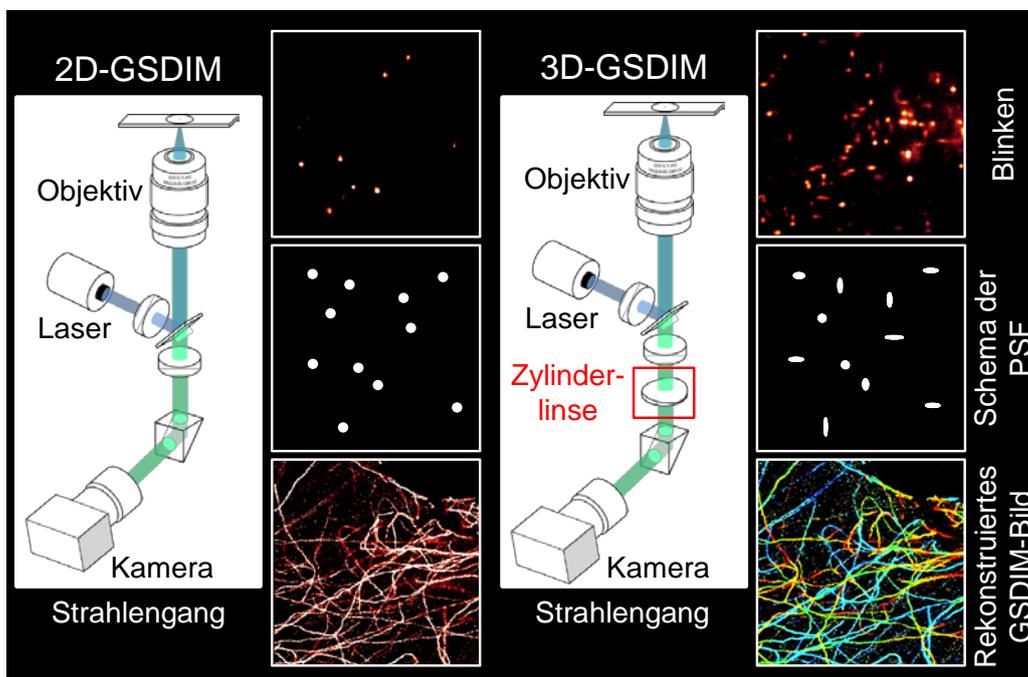


Abb. 2.15 Vergleich der beiden GSDIM-Techniken. In der 2D-GSDIM-Mikroskopie (links) werden kreisrunde Blinkereignisse aufgezeichnet, sodass der Algorithmus anhand der PSF den Ursprung in Nanometer-Auflösung bestimmen kann. Bei der 3D-GSDIM-Mikroskopie (rechts) wird mithilfe einer Zylinderlinse im Strahlengang die PSF der Blinkereignisse elliptisch verzerrt. Anhand dieses optischen Astigmatismus und der resultierenden horizontalen bzw. vertikalen Verzerrung kann ein Algorithmus die z-Position eines jeden Moleküls zuordnen.

Die 3D-GSDIM-Daten wurden, ebenso wie die 2D-Daten, mit dem Leica SR GSD-Mikroskop generiert. Das komplette Setup entsprach ebenfalls dem 2D-Aufbau.

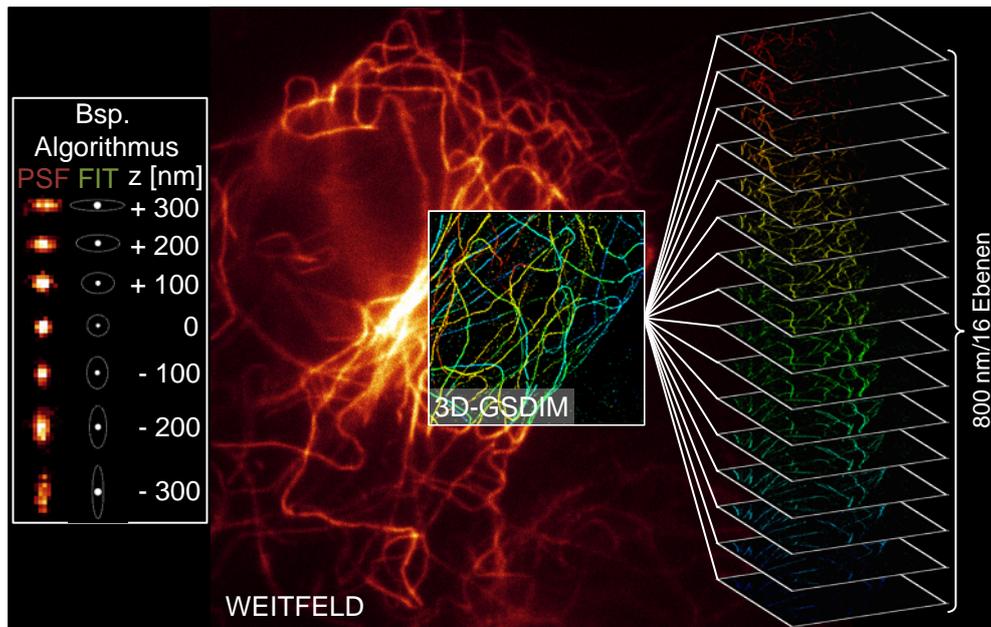


Abb. 2.16 Illustration der 3D-GSDIM-Methode. Das Mikrotubuliskelett einer MDCK-Zelle wurde mithilfe der 3D-GSDIM analysiert. Die elliptische Verzerrung der PSF ermöglicht es dem Algorithmus eine spezifische z-Koordinate für jedes Molekül zu bestimmen. Die Zuordnung der errechneten z-Koordinate erfolgt dann in eine von 16 Ebenen, die in der 3D-GSDIM zusammen genommen einen z-Bereich von 800 nm abdecken.

2.7.9 Picasso-Simulation

Um zu analysieren, ob die in den GSDIM-Aufnahmen erreichte praktische Auflösung bzw. Lokalisations-Präzision dafür ausreichte, um die einzelnen Stufen der ILV-Biogenese und die dabei stattfindende Gal3-Rekrutierung abzubilden, wurden mithilfe des Simulationsprogramms Picasso Simulationen der einzelnen Biogenese-Stufen angefertigt. Es wurde darauf geachtet, dass die angenommene Auflösung und alle Aufnahme-Parameter mit denen des GSDIM-Setups exakt übereinstimmten. Dazu gehörten beispielsweise alle Fluorophor-spezifischen Parameter (*Average Dark Time/Bright Time*), das Aufnahme-Setup (*Power Density*, PSF etc.) und alle Kamera-Parameter (Bildgröße, Integrationszeit, Anzahl der Einzelbilder, Pixelgröße etc.). Zusätzlich wurde mithilfe des sog. NeNa-Parameters die durchschnittliche Lokalisations-Präzision bestimmt (Endesfelder *et al.*, 2014). Für die betreffenden Experimente ergab sich $\sigma \approx 20$ nm für AlexaFluor555 (Gal3) und $\sigma \approx 14$ nm für AlexaFluor647 (Tsg101), was die Approximationen der praktischen Auflösung bestätigt, die mithilfe der FWHM-Messung bzw. der FRC gewonnen wurden. Darüber hinaus wurde ebenfalls der Tastgrad (*Duty Cycle*), d. h. das Blink-Verhalten der Fluorophore näher analysiert. Die Schätzung für AlexaFluor555 ergab eine durchschnittliche Blinkdauer (*On-Time*) von ~ 22 ms und eine durchschnittliche Dunkelzeit (*Off-Time*) von $\sim 26,2$ s. Das zugrundeliegende *Ground Truth Model* der MVB-Membran und der unterschiedlichen Stufen der Gal3-Rekrutierung (Bindung, Knospung, Abschnürung) wurde mit einem, eigens in *Python* angefertigten, Skript erstellt. Die Simulation selbst wurde dann mithilfe des Programms *Picasso* durchgeführt (Schnitzbauer *et al.*, 2017). Das Programm nutzt

für die Simulation der MVB-Verteilungen die *Ground Truth Models* mit den zusammengetragenen Aufnahme-Parametern, sodass die simulierten Daten mit den experimentellen GSDIM-Datenreihen verglichen werden können. Die Simulation dieses modular aufgebauten Programms basiert auf der Monte-Carlo-Methode (*Repeated Random Sampling*) und besteht aus einer großen Serie von simulierten Blink-Ereignissen. Durch die vorher festgelegte und an die experimentellen GSDIM-Parameter angepasste Fluorophor-Verteilung werden einzelne Blink-Ereignisse, d. h. die räumliche Emission von Photonen, für jede Position simuliert und letztendlich durch die (simulierte) Kamera in ein Bild konvertiert. Die Bildserie wird abschließend zu einem übereinander gelagerten, hochauflösenden Bild zusammengesetzt und exakt so bearbeitet, wie die experimentellen Daten. Bei den Simulationen wurde zusätzlich die Größe des Antikörper-*Sandwichs* berücksichtigt. Außerdem wurde die *Depth of Field* (DOF) des GSDIM-Aufbaus bzw. Objektivs bestimmt und ebenso berücksichtigt.

2.7.10 Transmissions-Elektronenmikroskopie

In der Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) macht man sich, wie oben bereits angedeutet (s. 2.7.7), die extrem hohe Wellenlänge eines Elektronenstrahls zunutze, um gemäß der Abbe-Formel (s. Formel 2.1) eine Auflösung im Nanometer-Bereich zu erhalten. Dabei wird der Elektronenstrahl im Vakuum auf ein Präparat geschossen, wo er beim Auftreffen auf verschiedenste Atome unterschiedlich stark gestreut wird. Atome mit höherer Ordnungszahl und generell dickere Objektbereiche streuen stärker, sodass diese Bereiche in der späteren Betrachtung dunkler erscheinen. Aufgrund dessen ist es von besonderer Wichtigkeit, einen gleichmäßigen Ultradünnschnitt eines Präparates anzufertigen. Die Elektronen, welche nicht gestreut wurden, werden anschließend fokussiert und mithilfe eines Leuchtschirmes oder eines CCD-Chips mit vorgeschaltetem Szintillator sichtbar gemacht.

Damit die ultrastrukturelle Analyse biologischer Präparate in der EM überhaupt möglich wird, müssen diese vorher speziell behandelt werden. So müssen die Präparate z. B. aufgrund des angelegten Vakuums vollständig dehydriert werden. Zusätzlich muss die Probe mit Schwermetallen behandelt werden, um den Kontrast der zellulären Komponenten zu erhöhen. Dieser Umstand beruht darauf, dass für einen ausreichenden Kontrast in der EM eine hohe Elektronendichte benötigt wird (s. oben), die in biologischen Materialien aufgrund der geringen Molekulargewichte nicht gegeben ist.

Für die elektronenmikroskopische Visualisierung der Gal-3-Rekrutierung an MVBs wurden zunächst MDCK-II-Zellen auf 6 cm-Plastikschalen ausgesät und 7 Tage kultiviert. Die Zellen wurden dann zweimal mit PBS++ gewaschen. Danach erfolgte die Fixation mit Ito-Puffer für 45 min bei 4°C. Dieser wurde anschließend mithilfe von 100 mM Cacodylat-Puffer einmal abgewaschen, woraufhin die Zellen bei 4°C in neuem Cacodylat-Puffer für kurze Zeit gelagert werden konnten. Die Zellen konnten danach

vorsichtig von der Platte abgekratzt, pelletiert und postfixiert werden, wobei bei jedem Waschschrift und allen folgenden Schritten zentrifugiert werden musste, um sicher zu gehen, dass keine Zellen verloren gingen. Danach erfolgte die sog. Postfixierung bzw. Osmierung für 1 h, die für die Kontrastierung des Präparates sorgt. Dazu wurden 2% Osmiumtetroxid und 3% Kaliumferrocyanat-2-trihydrat jeweils in ddH₂O zu gleichen Teilen gemischt und für 1 h auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden dann noch einmal mit 100 mM Cacodylat-Puffer gewaschen, bis keine Trübung mehr vorhanden war. Die Proben konnten nun in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert werden und zwar in 50%-, 70%-, 90%- und 100%-Ethanol jeweils zweimal für 10 min. Hierbei musste darauf geachtet werden, dass die Proben stets verschlossen waren, da die direkte Exposition gegenüber der Umgebungsluft eine zu schnelle Evaporation zur Folge hätte, die die Feinstruktur der Probe zerstören könnte. Danach wurden die Proben noch dreimal in 100%-Ethanol für 15 min inkubiert. Schließlich erfolgte die Einbettung in Epon. Dazu mussten die Proben allerdings zuvor noch zweimal für 15 min in Propylenoxid inkubiert werden. Die Epon-Gebrauchslösung wurde zu gleichen Teilen aus Stammlösung A und Stammlösung B zusammengemischt und mit 1,8% Epon-Beschleuniger DMP-30 versetzt. In einem Zwischenschritt wurden die Zellen mit einem 1:1 Gemisch aus Propylen und Epon für 1-2 h inkubiert. Erst dann wurden die Proben in reinem Epon für 12 h bei 60°C inkubiert, was die Polymerisation des Epons und die Einbettung in Gelatine kapseln erlaubte. Zu guter Letzt wurden die Präparate auf einem Ultramikrotom Ultracut FC4E (Reichert-Jung) mithilfe einer Glas- oder Diamantklinge ultradünn geschnitten und auf ein EM-Grid aufgezogen.

Für die ultrastrukturelle Analyse der EM-Präparate wurde das Zeiss EM 109S Transmissionselektronenmikroskop verwendet. Als Elektronenquelle diente eine Kathode aus Wolframdraht bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV. Die Aufnahmen wurden mit einer sog. *Bottom-mounted*-TEM-CCD-Kamera (TRS Systems) angefertigt.

2.8 Zellbiologische Methoden

2.8.1 Exosomenpräparation

Exosomen können durch differenzielle Zentrifugation aus dem Zellkulturüberstand aufgereinigt werden (Raposo *et al.*, 1996b). Dazu wurden bis zu drei 10 cm Zellkulturschalen über 16 h bei 37°C mit Zellkulturmedium inkubiert. Um falsch-positive Ergebnisse durch eine Kontamination mit bovinen Exosomen auszuschließen, wurde vorher das verwendete FKS des Zellkulturmediums für 1 h bei 100.000 g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und sterilfiltriert. Nach erfolgter Inkubation wurde das Medium in ein 50 mL Reaktionsgefäß überführt und die folgenden Zentrifugationsschritte allesamt bei 4°C durchgeführt (s. auch Abb. 2.17):

1. Zentrifugation: 500 g für 6 min (Entfernung verbliebener Zellen)
2. Zentrifugation: 5000 g für 30 min (Entfernung Zelldebris)
3. Zentrifugation: 20.000 g 30 min (Entfernung Mikrovesikel)
4. Zentrifugation: 3900 g in Amicon-Ultra-10k (Ankonzentrierung auf 1,5 mL)
5. Zentrifugation: 100.000 g für 1 h (Pelletierung der Exosomen)

Für den letzten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand zunächst in ein 1,5 mL Polyallomer-Reaktionsgefäß überführt, wobei zum Gewichtsausgleich mit PBS++ auf 1,5 mL aufgefüllt wurde. Nachdem sich das exosomale Pellet gebildet hatte, wurde der Überstand verworfen und noch einmal mit 1,5 mL PBS++ gewaschen. Daraufhin wurde eine erneute Zentrifugation in der Ultrazentrifuge bei 100.000 g für 1 h und 8 min angeschlossen. Nun konnte der Überstand abgenommen und das Pellet mit 30 µL SDS-Probenpuffer im Vortexmischer resuspendiert werden. Abschließend wurden die Proben für 10 min bei 95°C gekocht.

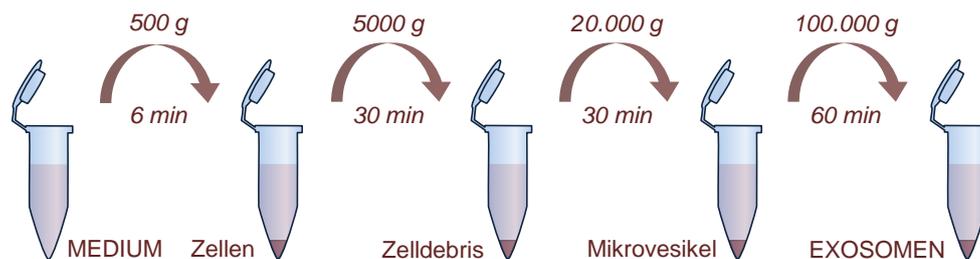


Abb. 2.17 Schema der Exosomen-Präparation.

2.8.2 Mikrovesikelpräparation

Mikrovesikel lassen sich einfacher aufreinigen als Exosomen, da diese bereits bei 10.000 g pelletieren (Muralidharan-Chari *et al.*, 2009). Es wurde deshalb bis zum 3. Zentrifugationsschritt analog zur Exosomenpräparation vorgegangen, wobei hier nur für 30 min 10.000 g angelegt werden mussten. In einem letzten Schritt wurde das Pellet mit 2 mL PBS++ gewaschen und nochmals für 30 min bei 10.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde schließlich verworfen und das Pellet in 30 µL SDS-Probenpuffer mittels Vortexmischer resuspendiert.

2.8.3 Galektin-3-Endozytose

Exogenes, rekombinant hergestelltes Gal3 wird von MDCK-Zellen endozytiert und gelangt dadurch in endosomale Kompartimente (Straube *et al.*, 2013). Um ausschließen zu können, dass exogenes Gal3 in das Lumen von Exosomen gelangen kann, wurde exogenes, biotinyliertes Gal3 auf die Zellen gegeben und die Lokalisation in Hinblick auf Exosomen analysiert.

Hierzu wurden MDCK-Zellen für 5 d kultiviert, zweimal mit PBS gewaschen und 1 h mit 5 mL Medium ohne Zusätze bei 37°C „ausgehungert“. Anschließend wurde das

rekombinante Gal3-Biotin (1 μM in PBS) für 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde durch eine Inkubation mit 150 mM Laktose in PBS überschüssiges Gal3-Biotin von der Zelloberfläche entfernt. Diese Arbeitsschritte wurden am darauf folgenden Morgen noch einmal wiederholt, um die aufgenommene Menge an Gal3-Biotin zu erhöhen. Nach 1,5 h wurde dann eine Exosomenpräparation zusammen mit einem Proteinase K-Sensitivitätstest durchgeführt. Damit eine ausreichende Menge an Exosomen aufgereinigt werden konnte, wurde das über Nacht gesammelte Medium noch einmal für besagte 1,5 h auf die Zellen gegeben und schließlich für die Exosomenpräparation verwendet.

2.8.4 Sekretionsassay

Um den Einfluss einer Inhibition des exosomal Export auf die Sekretion von Gal3 im Medium zu untersuchen, wurde Medium einer 10 cm Zellkulturplatte oder einer Multiwellplatte mit 6 Vertiefungen für 6 h oder über Nacht gesammelt. Nach dem Überführen in ein 2 mL Reaktionsgefäß wurden noch 10 μL PI hinzugefügt, um einen Proteinabbau zu verhindern. Damit abgestorbene Zellen im Medium das Ergebnis nicht verfälschten, wurde noch eine Zentrifugation für 10 min bei 800 g und 4°C durchgeführt. Falls nötig, wurde das Medium mittels Amicon Ultra 10k ankonzentriert. Der Überstand wurde abschließend mit SDS-Probenpuffer versehen und auf eine SDS-PAGE aufgetragen.

2.8.5 Proteinase-K-Sensitivitätstest

Durch einen Proteinase-K-Sensitivitätstest lässt sich feststellen, ob sich ein Protein innerhalb oder außerhalb einer membranumschlossenen, vesikulären Struktur befindet. Konkret sollte mit einem solchen Assay untersucht werden, ob sich Gal3 innerhalb von Exosomen befindet oder nur außerhalb mit der Membran assoziiert ist. Da die Proteinase-K nicht membrangängig ist, werden nur alle zugänglichen Proteine auf der Oberfläche unspezifisch degradiert. Intravesikuläre Proteine, die sich im Lumen befinden, werden dementsprechend durch die Membran des Vesikels vor Abbau geschützt. Als Positivkontrolle fungiert deshalb ein Ansatz mit zusätzlichem Detergens, das Membranen permeabilisiert und dadurch für die Proteinase zugänglich macht.

Für eine Proteinase-K-Behandlung wurde zuvor eine Exosomenpräparation von einer 10 cm Kulturplatte durchgeführt (s. 2.8.1). Anschließend wurden die Exosomen mit 20 μL PBS++ resuspendiert. Nun wurden die Proben mit 1 μL Proteinase-K (0,5 mg/mL oder 1 mg/mL) für 10 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde abschließend mit 1 μL 0,4 M PMSF gestoppt. Als Negativkontrolle bzw. Ladekontrolle diente ein Ansatz ohne Proteinase-K. Wie oben bereits beschrieben, wurde der Positivkontrolle 1 μL des Detergens Triton X-100 (10 %) hinzugefügt.

2.9 Allgemeine proteinbiochemische Methoden

2.9.1 Herstellung von Zelllysaten

Um die Proteinexpression in Zellen analysieren zu können, müssen diese aufgeschlossen und das resultierende Zelllysate später aufgetrennt werden (s. 2.9.4). Zunächst wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS++ gewaschen. Danach wurde die Kulturplatte auf Eis gestellt und alle weiteren Schritte mit eiskalten Lösungen durchgeführt, um eine vorzeitige Degradation der Proteine zu vermeiden. Die jeweiligen Volumina variierten je nach Zellkulturschale, sodass hier nur auf die Standard-10 cm Kulturplatte eingegangen werden soll. Um die Zellen zu ernten, wurde 1 mL PBS++ auf die konfluente Platte gegeben und die Zellen mit einem Schaber von der Schale gelöst. Die Zellen konnten dadurch leicht in das Reaktionsgefäß überführt und das PBS++ durch eine Zentrifugation bei 500 g für 3 min bei 4°C entfernt werden. Das Pellet konnte nun vorsichtig resuspendiert und die Zellen ein weiteres Mal mit PBS++ und analoger Zentrifugation gewaschen werden. Der Überstand wurde verworfen, sodass das Zellpellet anschließend mit 250 µL eiskaltem Lysepuffer, der zusätzlich mit 10 µL Protease-Inhibitoren-Mix versehen war, resuspendiert werden konnte. Die Zelllyse wurde für 30 min bei 4°C in einem Überkopfschüttler durchgeführt. Der entstehende Zelldebris wurde durch eine 15-minütige Zentrifugation bei 17.000 g bei 4°C entfernt. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und entweder für eine SDS-PAGE direkt verwendet oder bei -20°C eingelagert.

2.9.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Zur quantitativen Auswertung von Zelllysaten wurde die Proteinkonzentration mittels Lowry-Test bestimmt (Lowry *et al.*, 1951). Die Farbreaktion basiert dabei auf zwei Reaktionen: Erstens reagieren Cu⁺-Ionen mit der Peptidbindung zu einem blauvioletten Farbkomplex (Biuretreaktion). Zweitens werden die Kupfer(II)-Ionen durch die Peptidbindung zu Cu(I) reduziert, welches wiederum das zugefügte gelbe Folin-Ciocalteu-Reagenz zu Molybdänblau reduziert und als Maß der Proteinkonzentration dient (Legler *et al.*, 1985).

In der Praxis wurde das kommerziell erhältliche Reagenz D_c Protein Assay (Biorad) nach den Anweisungen des Herstellers verwendet.

2.9.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Da die Proteinbestimmung nach Lowry (s. 2.9.2) relativ aufwändig ist, wurde z. B. für die Mikrothermophorese zur quantitativen Bestimmung der Proteine die Bradford-Methode angewandt (Bradford, 1976). Diese beruht auf der Bindung von Coomassie *Brilliant Blue* G-250 an basische Seitenketten der Proteine, wodurch sich ein Farbkomplex ausbildet und das Absorptionsmaximum von 465 nm nach 595 nm verschoben wird. Diese Farbverschiebung kann für die Konzentrationsbestimmung einer Proteinlösung benutzt werden.

Die Bradford-Lösung (Biorad) wurde entsprechend der Herstellerangaben verdünnt und verwendet.

2.9.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine Methode zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichts.

Vor dem Auftragen auf das Gel wurden 30 µL der jeweiligen Probe in 15 µL Laemmli-Puffer (3x) für 7 min auf 95 °C schüttelnd erhitzt und bei 17.000 g für 1 min abzentrifugiert. Durch das Aufkochen und dem resultierenden Brechen der Wasserstoffbrücken wird das Peptidbackbone für Natriumdodecylsulfat (SDS) und Dithiothreitol (DTT) zugänglich gemacht. SDS bindet als Detergens in einem stabilen Verhältnis an hydrophobe Aminosäuren, die üblicherweise innerhalb des Proteins maskiert sind. Dadurch werden Proteine entfaltet und liegen schließlich linear vor. Dieser Vorgang wird durch das Reduktionsmittel DTT zusätzlich verstärkt, indem es Disulfidbrücken reduziert und so die Tertiärstruktur bzw. Quartärstruktur von Proteinen destabilisiert. Da SDS zudem negativ geladen ist, wird durch diesen Vorgang die Ladung der Proteine verdeckt und konstant vereinheitlicht.

Durch die Kopolymerisation von Acrylamidmonomeren und einem Quervernetzer, N,N'-Methylenbisacrylamid, wird ein Gel hergestellt, in dem die Proteine schließlich aufgetrennt werden. Die Polymerisation beginnt mit dem Zerfall von Ammoniumpersulfat (APS)-Ionen, was eine radikalische Kettenreaktion in Gang setzt. Die entstandenen hochreaktiven Radikale aktivieren anschließend den Polymerisierungskatalysator Tetramethylethylendiamin (TEMED). Dies führt wiederum zur kettenförmigen Aggregation radikalisierter Acrylamid-Monomere. Die Monomere werden außerdem über den bifunktionellen Vernetzer N,N'-Methylenbisacrylamid untereinander verbunden. Folglich entsteht eine siebartige Anordnung, die die Grundlage für eine erfolgreiche Auftrennung der einzelnen Proteine darstellt.

Das Prinzip der diskontinuierlichen SDS-PAGE nach Laemmli (Laemmli, 1970) erlaubt durch eine vorgeschaltete Fokussierung der Proteine (sog. Stapelungseffekt) eine scharfe Trennung der Proteinbanden. Dazu wird das Trenngel von einem Sammelgel überschichtet, in dem die Proteine zunächst zentriert werden. Erst danach kommt es im Trenngel zur Separierung. Die Porengröße der Gelmatrix wird einerseits von der Konzentration des Acrylamid-Monomers bestimmt, und andererseits vom Grad der Quervernetzung, d.h. der Konzentration von N,N'-Methylenbisacrylamid. Durch die Verwendung einer Acrylamid-Mixtur war dieses Konzentrationsverhältnis stets gleich, sodass lediglich die Gesamtkonzentration angeglichen werden musste (s. Tabelle 2-9).

Tabelle 2-9 Mengenangaben zur Erstellung der denaturierenden SDS-PA-Gele.

Komponente	Trenngel 8%	Trenngel 10%	Trenngel 12%	Sammelgel
	Volumen [mL]	Volumen [mL]	Volumen [mL]	Volumen [mL]
ddH ₂ O	4,6	4,0	3,3	2,1
30% Acrylamid-Mix	2,7	3,3	4,0	0,5
1,5 M Tris pH 8,8	2,5	2,5	2,5	-
1,0 M Tris pH 6,8	-	-	-	0,38
10% SDS	0,1	0,1	0,1	0,03
10% APS	0,1	0,1	0,1	0,03
TEMED	0,006	0,004	0,004	0,003

Die Elektrophorese wurde zunächst bis zum Erreichen des Trenngels bei 80 V durchgeführt und anschließend auf 120-180 V erhöht. Die SDS-PAGE wurde beendet, als die Farbstofffront gerade im Begriff war aus dem Gel herauszulaufen. Als Molekulargewichtsstandard dienten 3 µL PageRuler Plus (Fermentas).

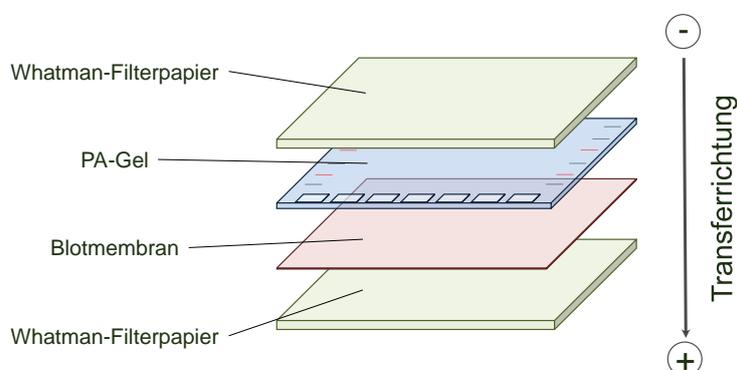
2.9.5 Coomassie-Färbung

Coomassie-Brillant-Blau wird dazu verwendet, Proteinbanden einer SDS-PAGE sichtbar zu machen. Der Triphenylmethanfarbstoff lagert sich dabei unspezifisch an die basischen Aminosäuren Lysin, Arginin und Histidin an.

Das Polyacrylamid-Gel wurde zwischen 2 und 18 h in Coomassie-Lösung gefärbt. Nach dreimaligem Waschen mit ddH₂O wurde das Gel mit Entfärber-Lösung 45 min lang inkubiert bzw. fixiert, bis klare Banden erkennbar waren.

2.9.6 Western Blot

Nach einer SDS-PAGE können die aufgetrennten Proteine durch einen elektrophoretischen Transfer auf einer Polymere membran immobilisiert und dadurch näher analysiert werden (Towbin *et al.*, 1979). Dazu wurde auf das sog. *Semidry*-Verfahren zurückgegriffen (Kyhse-Andersen, 1984) und wie in Sambrook und Russell (Sambrook & Russell, 2001) verfahren.

Abb. 2.18 Aufbau Western Blot im *Semidry*-Verfahren.

Die Blotmembran wurde zunächst kurz im Transferpuffer aktiviert. Danach wurde zusammen mit der Membran, zwei in Puffer getränkten Whatman-Filterpapieren, sowie dem PA-Gel, die in Abb. 2.18 angegebene Schichtung aufgebaut. Der Blotvorgang wurde bei 12 V (max. 400 mA) für 45-60 min durchgeführt. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen und daraus resultierende falsch-positive Signale der Antikörper durch eine Inkubation der Membran in Blocklösung, d. h. 5% (w/v) Magermilchpulver/PBS für 1 h bei RT abgesättigt. Daraufhin konnte die Blotmembran mit dem jeweiligen Primärantikörper über Nacht bei 4°C inkubiert werden. Auf viermaliges Waschen mit PBS für jeweils 10 min folgte die Inkubation des Sekundärantikörpers, der mit dem Enzym *Horseradish-Peroxidase* (HRP) konjugiert ist, für 1 h bei RT. HRP katalysiert die Oxidation von Luminol in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid und produziert so Chemilumineszenz, die mithilfe einer Kamera detektiert werden kann. Abschließend wurde wieder viermal mit PBS gewaschen. Schließlich wurde zur Detektion der markierten Proteinbanden das Kit „SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate“ (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Hierzu wurde Lösung 1 (Peroxid-Puffer) und Lösung 2 (Luminol und *Enhancer*) zu gleichen Teilen gemischt und ggf. mit PBS verdünnt. Das emittierte Licht wurde dann zu guter Letzt im Chemostar Professional System von Intas ausgewertet. Zur Detektion von biotinylierten Proteinen wurde direkt gekoppelte Streptavidin-HRP verwendet, die 1:10 in PBS verdünnt und für 30 min bei RT inkubiert wurde.

2.9.7 Ko-Immunpräzipitation

Mithilfe einer Ko-Immunpräzipitation (IP) lassen sich im Zelllysate Interaktionen zwischen einem Zielprotein und dessen möglichen Bindepartnern nachweisen. Dabei dient ein Antikörper, der meist an Sepharose- oder Agarosekügelchen (*Beads*) direkt gekoppelt oder über Protein A oder G gebunden ist, als stationäre Phase. Durch die Bindung des Antikörpers wird dementsprechend das jeweilige Antigen pelletiert und konzentrierbar. Dabei wird das Antigen zusammen mit all seinen Interaktionspartnern (Kopräzipitat) aufgereinigt bzw. präzipitiert.

Zur Vorbereitung der IP-*Beads* wurden 30 µL der Protein A-Sepharose-(PAS)-Suspension zunächst in 500 µL Waschpuffer äquilibriert. Anschließend wurden die PAS-Kügelchen für 4 min bei 4°C und 2500 g pelletiert, der Überstand verworfen und erneut mit 500 µL Waschpuffer äquilibriert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt, jedoch abschließend nur 250 µL Waschpuffer hinzugegeben. Nun wurden die *Beads* mit 2 µL V5-Antikörper (gegen V5-*Tag*) für 2 h bei 4°C inkubiert. Um die Bindung des Antikörpers an die PAS zu fixieren, wurden danach 1,5 mg des unspezifischen Protein-Quervernetzers Bis(sulfo-succinimidyl)suberat (BS3) für 2 h bei 4°C zu den IP-*Beads* gegeben. Da dieser Quervernetzer im Gegensatz zu Dithiobis(sulfosuccinimidyl)propionat DTSSP (s. unten) keine Disulfidbindung enthält

und dementsprechend nicht durch DTT spaltbar ist, konnte dadurch auch die Verunreinigung durch die leichte und schwere Kette des V5-Antikörpers im Western Blot deutlich verringert werden. Die mit dem V5-Antikörper gekoppelte PAS wurde dann über Nacht bei 4°C gelagert, um zu gewährleisten, dass die Aktivität von BS3 abgeklungen war.

Für eine Ko-Immunpräzipitation wurde eine konfluente 10 cm Zellkulturplatte wie in Abschnitt 2.9.1 beschrieben lysiert. In dieser Arbeit wurden verschiedene Gal3-V5-Mutanten verwendet bzw. präzipitiert. Für die spätere *Input*-Kontrolle wurden 30 µL des Lysats mit 15 µL Laemmlipuffer versetzt und für 7 min aufgekocht. Das restliche Lysat wurde nun zu 250 µL Waschpuffer gegeben und mit 1,5 mg DTSSP für 2 h bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Danach erfolgte dann, durch die Hinzugabe der vorbereiteten PAS zum Lysat, die eigentliche Ko-Immunpräzipitation für 2 h bei 4°C im Überkopfschüttler. Im Anschluss wurde die gesamte Lysat-PAS-Suspension auf eine Mobicol-Säule geladen und bei 3500 g und 4°C für 1 min zentrifugiert. Durch die Mobicol-Säulen konnten die Proben einfach gewaschen werden, ohne dass PAS und daran gebundene Proteine verloren gingen. Dafür wurden 500 µL Waschpuffer auf die *IP-Beads* pipettiert und eine Zentrifugation wie oben beschrieben angeschlossen. Dieser Waschvorgang wurde noch zweimal wiederholt. Danach konnte die Elution der Protein-Komplexe erfolgen, indem die Mobicol-Säulen nach der letzten Zentrifugation verschlossen, mit 40 µL Laemmlipuffer befüllt und zusammen mit 1 mL ddH₂O im Auffanggefäß für 10 min bei 95°C erhitzt wurden. Abschließend wurde das Auffanggefäß durch ein Neues ersetzt, der Verschluss entfernt und eine weitere Zentrifugation bei 3500 g und 4°C für 1 min durchgeführt.

2.10 Spezielle proteinbiochemische Methoden

2.10.1 Herstellung von rekombinantem Galektin-3

Um die *in vitro* Interaktionsstudien durchführen zu können (*in vitro Pull-down* und Mikrothermophorese), musste Gal3 in großer Menge, bei gleichzeitig sehr hoher Reinheit, hergestellt werden. Dies sollte nicht wie üblich über eine Affinitätsisolation mithilfe eines Protein-*Tags* geschehen, sondern mithilfe von *Beads* die kovalent gebundene Laktose trugen. So konnte sichergestellt werden, dass ausschließlich funktionelles, d. h. zuckerbindendes Gal3 aufgereinigt wurde, welches gesichert seinen mannigfaltigen physiologischen Wirkungen nachgehen konnte.

Die Produktion von Gal3 wurde in BL21(DE3)-Star-*E. coli*-Bakterien durchgeführt, wobei dessen Expression durch das sog. T7-System kontrolliert wurde. Dieses System stammt aus dem Phagen T7, der *E. coli* befällt und beruht auf dem Zusammenspiel von T7-RNA-Polymerase und dem T7-Promoter. Es eignet sich besonders für die Produktion von großen Mengen an rekombinantem Protein, da es sich dabei einerseits um ein besonders starkes Expressionssystem handelt, d. h. die T7-

RNA-Polymerase agiert sehr schnell und es wird sehr viel Protein pro Kopie produziert (vier bis fünfmal so schnell wie die *E. coli* RNA-Polymerase) und andererseits weist der T7-Promoter eine äußerst geringe Basaltranskription auf.

Der Bakterienstamm ist kommerziell erhältlich und wurde mithilfe des Prophagen DE3 vorbereitet, indem die T7-RNA-Polymerase in das Genom der Bakterien integriert wurde. Die Expression der T7-Polymerase wird dabei durch das lacUV5-Operon kontrolliert. Nach erfolgreicher Transformation der Bakterien mit dem Vektor pET3c, der die Expression von Gal3 mittels T7-Promoter erlaubte, erfolgte anschließend die Induktion durch Zugabe von Isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG), das im Gegensatz zur Laktose nicht metabolisierbar ist und dementsprechend eine konstitutive Expression gewährleistete.

Die Kultur der transformierten Bakterien (s. 2.11.6) wurde zunächst in 50 mL LB-Medium über Nacht bei 37°C gestartet und anschließend in 1 L LB-Medium bis zu einer optischen Dichte von 0,5 (OD bei 600 nm) weiter kultiviert. Erst dann erfolgte die Induktion mittels 0,5 mM IPTG für 3-4 h bei 37°C. Danach wurde die Kultur bei 4000 rpm für 10 min pelletiert und in ME-PBS resuspendiert, das zudem Protease-Inhibitoren enthielt. Der Zellaufschluss wurde mit einer *French Press* durchgeführt, sodass die Zellen zunächst mittels Spritze und Kanüle homogenisiert werden mussten. Nach dem Aufschluss wurde für 15 min bei 8000 rpm zentrifugiert, um den Zelldebris zu entfernen. Der Überstand wurde steril filtriert und jeweils 10 mL bei 4°C mit 1 mL Laktosylsepharose-*Beads* (EY Laboratories) über Nacht inkubiert. Nach drei Waschschritten mit ME-PBS (10 mL für 10 min Überkopfschüttler bei 4°C, anschließende Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 min bei 4°C), erfolgte die Elution des aufgereinigten Gal3 mithilfe von 5 mL 150 mM Laktose im Überkopfschüttler für 60 min bei 4°C. Dies stellte einen derartigen Überschuss dar, dass die Laktose der *Beads* verdrängt und Gal3 wieder gelöst werden konnte. Um die freie Laktose zu entfernen, die Gal3 von seiner physiologischen Wirkung in Zellexperimenten abhalten würde, wurde eine einfache (bei Benutzung des *Äktapurifiers* 10) bzw. zweifache (bei Benutzung einer PD10-Säule) Größenausschlusschromatographie einschließlich Konzentrierung an die Aufreinigung angeschlossen (s. 2.10.2). Abschließend wurde die Proteinkonzentration im Nanodrop (Absorption bei 280 nm) bestimmt.

Die Qualitätskontrolle einer jeden Gal3-Aufreinigung bestand aus einer Reinheitsbestimmung mittels SDS-Page und Coomassie-Färbung (s. 2.9.4 & 2.9.5) bzw. Gelfiltration mittels des *Äktapurifiers* (s. 2.10.2) und einer Überprüfung der Quervernetzungsfähigkeit mithilfe von Asialofetuin. Asialofetuin ist ein Protein, das über mehrere N- und O-Glykosylierungen verfügt, die wiederum mehrere LacNAc-Reste tragen, an die Gal3 mit hoher Affinität bindet und mit dem *in vitro* sichtbare Cluster

ausgebildet werden (Lepur *et al.*, 2012). Die Ausbildung solcher hochmolekularer Cluster wurde mithilfe einer Streulichtmessung bei 350 nm detektiert und bestimmt (s. 2.12.3).

2.10.2 Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie oder Gelfiltration ermöglicht die Fraktionierung von hoch- und niedrigmolekularen Stoffen. Aus diesem Grund wurde die Gelfiltration in dieser Arbeit für die Trennung von Gal3 und Laktose genutzt (s. Elution 2.10.1), um sicherzugehen, dass Gal3 seine volle Aktivität besaß und die Bindungstasche nicht durch Laktose besetzt war. Die Methode der Größenausschlusschromatographie beruht auf der unterschiedlichen Verteilung zwischen einer porösen Gelmatrix und dem umgebenden Medium. Substanzen mit großer räumlicher Ausdehnung, in diesem Fall Gal3, können nur sehr wenig mit der Matrix interagieren, da es aufgrund der Größe kaum zu einem Einsinken in die Poren der Matrix kommt. Gal3 wird deshalb in einer frühen Fraktion eluiert. Laktose dagegen wird von der Matrix aufgehalten, da es in die Poren diffundiert und taucht deshalb in einer sehr späten Fraktion auf. Die Diffusionsgeschwindigkeit in der Gelfiltration ist folglich proportional zu dem Logarithmus der molaren Masse.

Für die Trennung von Gal3 und Laktose wurden PD10-Entsalzungssäulen mit der porösen Matrix Sephadex G-25 (GE Healthcare) verwendet. Mit diesen Säulen war es möglich, Stoffe mit einem Molekulargewicht über 5 kDa abzutrennen. Zum Schutz vor Proteasen wurden alle Arbeiten bei 4°C und mit eiskalten Lösungen durchgeführt. Zu Beginn wurden die PD10-Säulen mit 20 mL filtriertem, autoklavierten PBS äquilibriert. Daraufhin konnte die Säule mit 1 bis 2,5 mL Lösung von Gal3-Laktose beladen werden. Die Elution erfolgte mit 3,5 mL PBS.

Der Nachteil einer jeden Gelfiltration ist die Tatsache, dass das gewünschte Protein durch die Elution verdünnt wird. Aufgrund dessen musste das eluierte Gal3 mittels Zentrifugation in einem Amicon Ultra 10k (Millipore) bei 4000 rpm auf ein Volumen von ca. 1 mL ankonzentriert werden (s. auch 2.10.1).

Im Laufe dieser Arbeit konnte allerdings gezeigt werden, dass durch die Verwendung der PD-Säulen, in Verbindung mit der Konzentrierung im Amicon Ultra 10k, von 10-15 mg Gesamtausbeute an Gal3, rund ein Drittel verloren ging. Deshalb wurde in der Folge, speziell bei sich wiederholenden Gelfiltrationsschritten (vgl. 2.10.1), der ÄKTApurifier 10 (GE Healthcare) mit einer Sephadex 200-Säule (Trennbereich 10-300 kDa) benutzt. Folglich konnte so noch einmal die Reinheit des Proteins überprüft werden. Alle eingesetzten Puffer wurden zuvor steril filtriert und nach Herstellerangaben verwendet.

2.10.3 Farbstoffmarkierung von rekombinantem Galektin-3

Nach der Aufreinigung von Gal3 und einer erfolgreichen Qualitätskontrolle wurde das Protein mit dem synthetischen Farbstoff AlexaFluor647 (Life Technologies) stabil

markiert. Vor der Markierung wurde der kommerziell erhältliche AlexaFluor647-N-Hydroxysuccimid-Ester (NHS; Life Technologies) aufgrund seiner Hydrophobizität zunächst in DMSO aufgenommen (10 mg/mL). Danach wurden 500 μ L einer 2 mg/mL Gal3-Lösung mit 50 μ L 1 M Natriumhydrogencarbonat-Puffer versetzt. Die Anhebung des pH-Wertes auf ca. 8,3 war besonders wichtig, da Succimid-Ester am effizientesten bei pH-Werten von 7,5-8,5 reagieren (s. unten). Um sicherzustellen, dass Gal3 voll funktionsfähig war, wurde die Bindungstasche mit Laktose besetzt, sodass es dort nicht zu einer Markierung mit AlexaFluor647 kam. Dazu wurden zusätzlich 150 mM Laktose der Protein-Lösung hinzugefügt.

Daraufhin wurde die Protein-Lösung mit 50-100 μ L der Farbstoff-Lösung vermischt und unter ständigem Rühren bei RT für 1 h inkubiert. Während dieser Zeit bildete der NHS-Ester spontan Amidbindungen zu primären Aminen, d. h. zu Lysin und der N-terminalen Aminosäure Methionin aus. Da eine Amidbindung nur mit deprotonierten primären Aminen möglich ist, liegt das pH-Optimum der Reaktion im basischen Bereich.

Ungebundener Farbstoff wurde abschließend mittels Größenausschlusschromatographie (s. 2.10.2) entfernt.

2.10.4 GFP-Pull-down

Mithilfe eines *Pull-downs* lassen sich, analog zur Ko-Immunpräzipitation, Interaktionen zwischen eGFP-Fusionsproteinen und deren Bindepartnern analysieren. Die Verwendung einer sog. *Nanobody-Trap* (Chromotek) hat jedoch gegenüber einer konventionellen Ko-Immunpräzipitation mehrere Vorteile. Zum einen ist die Bindungsaffinität des *Nanobodys* an das eGFP-Fusionsprotein extrem hoch, zum anderen kommt es zu keinen Verunreinigungen durch die schwere oder leichte Kette der verwendeten Antikörper. Dies war insbesondere von Wichtigkeit für die Detektion des Gal3-Interaktionspartners Tsg101, das ein Molekulargewicht von 43,9 kDa aufweist.

Für einen eGFP-*Nanobody Pull-down* wurde analog zur Ko-Immunpräzipitation in Abschnitt 2.9.7 vorgegangen. Auf eine Kopplung der IP-*Beads* mit einem Antikörper konnte dagegen durch die Verwendung der eGFP-*Nanobody-Trap* verzichtet werden, wobei 25 μ L der Suspension identisch äquilibriert wurden. Ein weiterer Unterschied bestand in der Immunpräzipitation, deren Dauer aufgrund der hohen Affinität auf 1 h bei 4°C im Überkopfschüttler reduziert werden konnte.

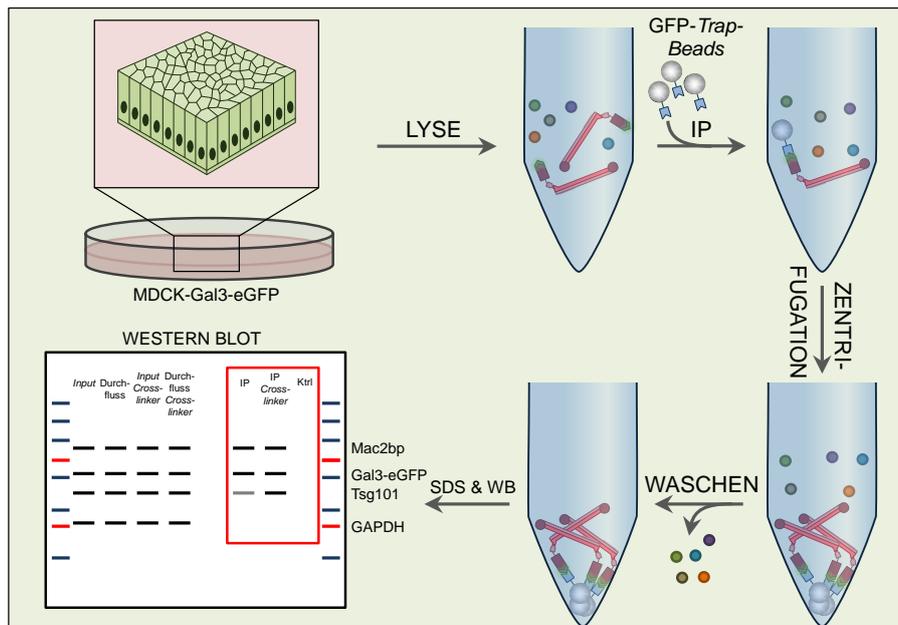


Abb. 2.19 Schema des GFP-Pull-downs. Nach der Lyse der Zellen lässt sich mithilfe der *Nanobody-Trap* eine *in vivo* Interaktion zwischen GFP-Fusionsprotein und dem möglichen Bindepartner nachweisen. Die Auswertung erfolgt per SDS-PAGE (SDS) und Western Blot (WB).

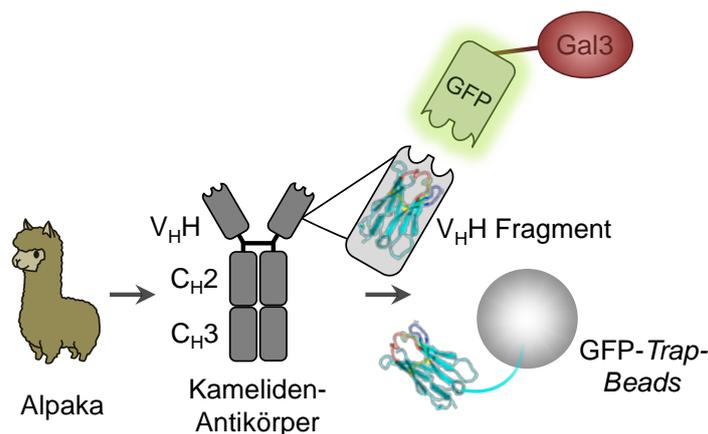


Abb. 2.20 Schema zur GFP-Nanobody-Trap. Das V_{HH} -Fragment eines Alpaka-Antikörpers, auch *Nanobody* genannt, wird dabei gegen GFP gerichtet und an *Agarose-Beads* gekoppelt. Durch die extrem hohe Affinität zu GFP ($K_d=1$ pM, laut Herstellerangaben) wird eine hohe Bindungseffizienz garantiert. Im Gegensatz zur konventionellen Ko-Immünpräzipitation kommt es aufgrund des geringen Molekulargewichts des Fragments (13 kDa) zu keiner Verunreinigung bzw. Kreuzreaktion mit schweren oder leichten Ketten von (konventionellen) Antikörpern, sodass die resultierenden Western Blots sehr einfach auszuwerten sind. Dies war besonders wichtig für die Detektion von Tsg101.

2.10.5 Laktose Pull-down

Aufgrund der hohen Affinität der CRD kann Gal3 ebenfalls mithilfe von *Laktose-Beads* präzipitiert werden. Die Durchführung erfolgte analog zum *GFP-Pull-down*.

2.10.6 *In vitro* Pull-down

Im Gegensatz zur Immunpräzipitation bzw. dem *in vivo* *Pull-down*, bei denen Zielprotein und Bindepartner auch indirekt über einen Proteinkomplex präzipitiert werden können, ist der *in vitro* *Pull-down* das Mittel der Wahl um eine direkte Interaktion zwischen zwei Proteinen nachzuweisen.

Als stationäre Phase wurde rekombinant hergestelltes, humanes Tsg101 verwendet, das zusätzlich über einen *GST-Tag* an *Glutathion-Sepharose-Beads*

gekoppelt war. Der *Pull-down* wurde wie im Abschnitt 2.9.7 beschrieben analog zur Ko-Immunpräzipitation durchgeführt, wobei auf die Zellernte und –Lyse verzichtet werden konnte und 1,5 μM Gal3 wt bzw. 10 nM Gal3-PSAP/ASAA direkt zur Mischung aus Lyse- und Waschpuffer (jeweils 250 μL) gegeben wurde. Daraufhin wurde der *Pull-down* mit 30 μL äquibrierter Tsg101-GST-Glutation-Sepharose für 2 h bei 4°C im Überkopfschüttler durchgeführt.

2.10.7 Goldmarkierung von GFP-*Nanobody*

Um eine Immunmarkierung für die Elektronenmikroskopie realisieren zu können, musste der eGFP-*Nanobody* mit elektronendichten Gold-Partikeln gekoppelt werden. Dazu wurde ein NHS-Ester mit 5 bzw. 15 nm großen Nanopartikeln (Cytodiagnosics) verwendet. Die Verknüpfung wurde streng nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Durch die sehr geringe Größe von 2,5 x 4,5 nm eignet sich die direkte Markierung mit diesem Gold-gekoppelten *Nanobody* ganz besonders für die Elektronenmikroskopie, da ansonsten die Größe eines Antikörper-Sandwiches die Beurteilung der Gal3-Lokalisation an der MVB- bzw. Exosomenmembran stark beeinträchtigt hätte.

2.10.8 Mikrothermophorese

Mithilfe der optisch erzeugten Mikrothermophorese (*Microscale Thermophoresis*, MST) lassen sich Bindungskinetiken zwischen zwei Proteinen bestimmen und sogar Dissoziationskonstanten ableiten (Duhr & Braun, 2006). Die Technik basiert auf dem Prinzip der Thermophorese, d. h. der Bewegung und der sich daraus ergebenden Konzentrationsdepletion eines Teilchens, ausgelöst durch einen Temperaturgradienten (Ludwig-Soret-Effekt). Bei der MST wird mithilfe eines Infrarot-Lasers (IR-Laser) ein mikroskopischer Temperaturgradient innerhalb einer flüssigkeitsgefüllten Glaskapillare erzeugt, der dafür sorgt, dass sich ein fluoreszenzmarkiertes Protein innerhalb kürzester Zeit (üblicherweise zu niedrigen Temperaturen) nach außen bewegt (Wienken *et al.*, 2010). Die thermophoretische Konzentrationsdifferenz kann dann als Fluoreszenzabnahme gemessen werden, die als normalisierte Fluoreszenz F_{norm} beschrieben wird ($F_{\text{norm}} = F_{\text{warm}}/F_{\text{kalt}}$). Jegliche Interaktion zweier Proteine resultiert in einem veränderten Diffusionsverhalten entlang des Temperaturgradienten, da die Wechselwirkung eine Differenz in Größe, Ladung und Solvatisierung bedingt. Es ergibt sich dann, bei Annahme von einem Anteil von x gebundenen Makromolekülen, folgende Gleichung für F_{norm} (Baaske *et al.*, 2010):

$$F_{\text{norm}} = (1 - x)F_{\text{norm}}(A) + xF_{\text{norm}}(AT) \quad 2.6$$

Dabei beschreibt $F_{\text{norm}}(A)$ die Fluoreszenz des freien Proteins und $F_{\text{norm}}(AT)$ die Fluoreszenz des gebundenen Proteinkomplexes. Die quantitative Auswertung der Proteininteraktion kann dann mittels Verdünnungsreihe des Bindepartners und gleichbleibender Konzentration des fluoreszierenden Zielproteins erfolgen. Letztendlich

ergibt sich durch das Auftragen von F_{norm} gegen den Logarithmus der aufsteigenden Bindepartner-Konzentration eine sigmoidale Bindungskurve, aus der mittels *Fitting* die Dissoziationskonstante abgeleitet werden kann.

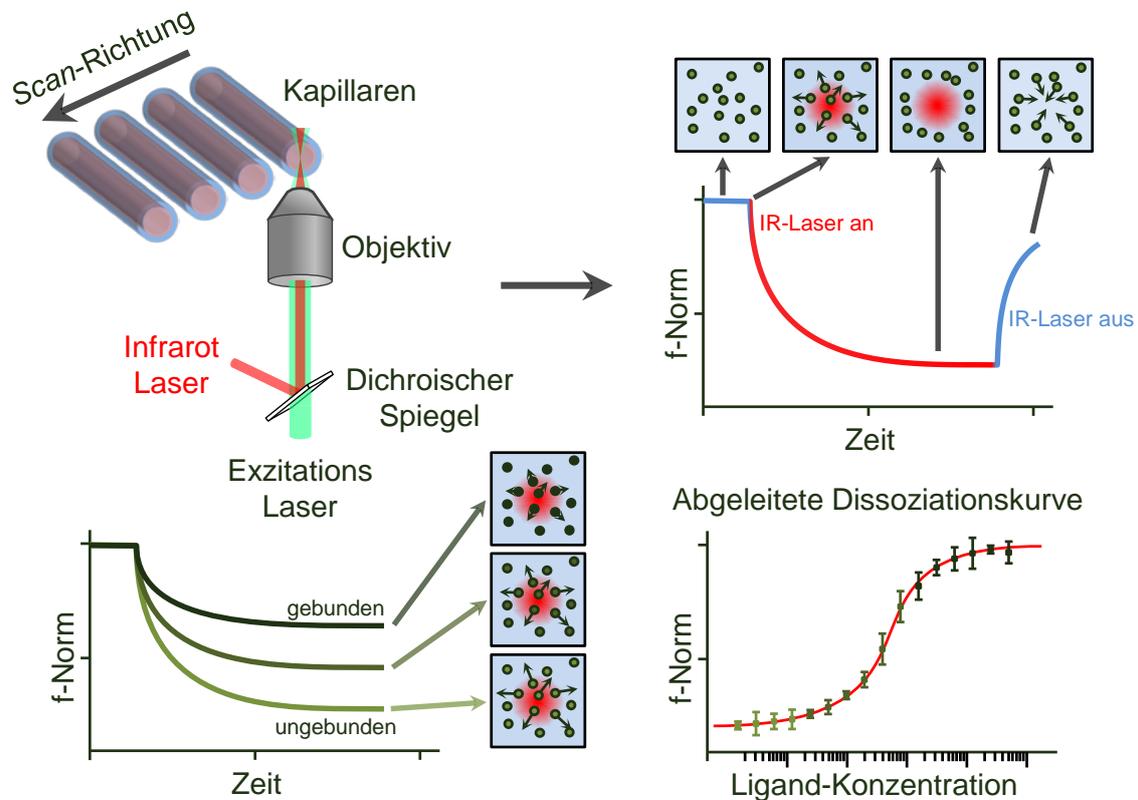


Abb. 2.21 Die Mikrothermophorese (MST). Die Dissoziationskonstante einer Proteininteraktion kann mithilfe der MST abgeleitet werden. Dazu wird ein Protein mit einem Fluoreszenz-Farbstoff markiert und der Bindepartner in einer Verdünnungsreihe hinzugegeben. Durch das Anlegen eines Infrarot-Lasers (IR) und dem daraus resultierenden Temperaturgradienten entsteht ein Konzentrationsgefälle des markierten Proteins in Richtung kälterer Bereiche. Kommt es jedoch zur Interaktion, wird dieser Prozess erschwert und das Protein (-Pärchen) verbleibt mehr im Bereich des IR-Lasers, d. h. das Fluoreszenzsignal nimmt nicht mehr so stark ab. Aus diesem Zusammenhang lässt sich die Dissoziationskonstante ableiten.

Die MST wurde mit einem Monolith NT.155 (NanoTemper Technologies) bei 21°C durchgeführt. Die Leistung der roten LED-Lampe zur Fluoreszenz-Anregung wurde auf 20-40% gesetzt. Zum Aufbau des Temperaturgradienten wurde der Infrarot-Laser auf 60% gestellt. Rekombinant hergestelltes Tsg101 (Mybiosource; sog. UEV-Fragment, das für eine Bindung an PSAP-Sequenzen verantwortlich ist; bestehend aus einer Peptidkette der Aminosäuren 1-145) wurde nach den Angaben des Herstellers mit dem roten Farbstoff NT 647 (NanoTemper Technologies) gekoppelt. Anschließend wurden 9 nM rTsg101-UEV in einer Verdünnungsreihe mit unmarkiertem Gal3 eingesetzt. Als Puffer diente PBS mit zusätzlich 5 mM DTT, 10 $\mu\text{g/mL}$ BSA und 0,05% Tween. Für die Bestimmung einer Dissoziationskonstanten wurden neun unabhängige Messungen bei 680 nm durchgeführt. Die Analyse erfolgte mit NanoTemper Analysis 1.2.009 und Origin8.

2.11 Molekularbiologische Methoden

2.11.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der exponentiellen *in vitro*-Amplifikation von DNA. Dazu werden drei wesentliche Schritte in mehreren Zyklen wiederholt: Zuerst wird der zu vervielfältigende DNA-Doppelstrang (*Template*) durch Anlegen von 98°C getrennt. Durch die hohe Temperatur werden die Wasserstoffbrücken zwischen den Basen aufgebrochen. Anschließend erfolgt die Anlagerung der beiden Oligonukleotide, sog. *Primer*, bei 50-60°C (die genaue Temperatur hängt von der Schmelztemperatur, d. h. der Länge und G-C-Gehalt der *Primer* ab) an den jeweils entgegengesetzten Strang. In einem dritten Temperaturschritt (72°C) verlängert eine spezielle, temperaturabhängige DNA-Polymerase die Oligonukleotide in 5'→3' Richtung und synthetisiert so den homologen Tochterstrang. Das Ende der Polymerase-Reaktion auf dem ursprünglichen *Template* ist im ersten Zyklus noch nicht exakt festgelegt. Dies geschieht erst im zweiten Zyklus: Hier liegen zum ersten Mal Tochterstränge bzw. *Templates* vor, bei denen der eingebaute Oligonukleotid-*Primer* das Ende der Reaktion markiert. Die Menge an gewünschtem DNA-Konstrukt mit exakter Länge wächst exponentiell, wohingegen Konstrukte mit 3'-Überhang lediglich linear ansteigen und folglich einen verschwindend geringen Einfluss auf das Endergebnis haben.

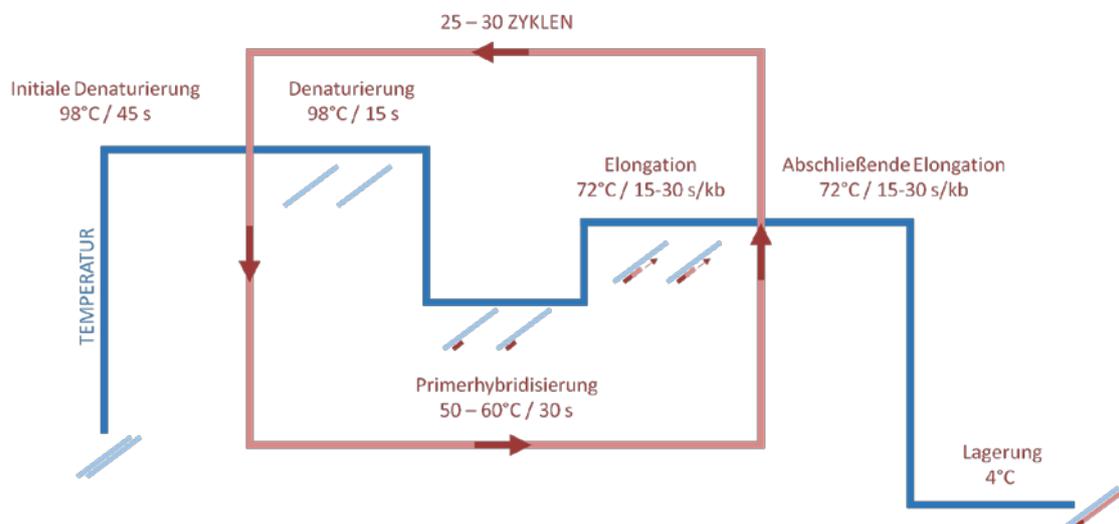


Abb. 2.22 Schema zur Darstellung der Temperaturzyklen in der Polymerase-Ketten-Reaktion.

Aufgrund ihrer proof-reading-Aktivität wurde die Phusion® (NEB) in der PCR verwendet. Durch ihre 3'→5'-Exonuklease-Aktivität ist diese Polymerase in der Lage, etwaige Fehler während der Elongation zu entfernen. Die Phusion®-Polymerase wurde gemäß Tabelle 2-10 mit den *Primern*, Mononukleotidtriphosphaten (dNTPs; Fermentas) und dem *Template* gemischt und gemäß Abb. 2.22 im *Thermocycler* inkubiert. Variiert wurden dabei, falls nötig, die Anzahl der sich wiederholenden Zyklen, die Temperatur der *Primerhybridisierung* und die Zeit der *Elongation* (je nach Größe des zu amplifizierenden Bereichs).

Tabelle 2-10 PCR-Ansatz

Komponente	Volumen pro Reaktion [μL]	Endkonzentration
dNTP	1	200 μM
Oligonukleotid (vorwärts)	2,5	0,5 μM
Oligonukleotid (rückwärts)	2,5	0,5 μM
DNA	Variiert	< 100 ng
Puffer (HF®, NEB)	10	1x
Phusion® Polymerase	0,5	1 U
ddH ₂ O	Auf 50 μL auffüllen	

Um nach der PCR das erhaltene DNA-Konstrukt zu analysieren oder für weitere Arbeiten zu nutzen, wurden 10 μL des PCR-Produkts mit 2 μL DNA-Probenpuffer (Thermo Fisher Scientific) vermischt und mittels Agarose-Gelelektrophorese bei 80 - 100 V aufgetrennt (45-60 min). Das Agarosegel wurde nach *Molecular Cloning* (Sambrook & Russell, 2001) angefertigt: (1% (w/v) Agarose in TAE-Puffer, 3,7 $\mu\text{L}/\text{mL}$ SYBR Safe-DNA-Färbelösung (Invitrogen), 5 μL DNA-Marker (Fermentas)).

DNA-Konstrukte geeigneter Größe wurden anschließend aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mittels „freeze ´n ´squeeze“-Technik aufgereinigt (s. 2.11.3). Die so erhaltenen Fragmente konnten danach in verschiedene Vektoren ligiert werden (s. 2.11.5) und zur Transformation chemisch kompetenter Bakterien verwendet werden (s. 2.11.6). Diese Transformation diente zum einen der Vervielfältigung der ligierten Plasmide oder der Produktion von rekombinantem Gal3 (s. 2.11.7 bzw. 2.10.1).

2.11.2 Mutagenese-PCR

Um sog. *Rescue*-Experimente durchführen zu können, musste die siRNA-Bindestelle in der mRNA von Tsg101-eGFP maskiert werden. Dazu wurde eine DpnI-basierte ortsspezifische Mutagenese durchgeführt. Es wurde dabei besonderes Augenmerk darauf gelegt, die Aminosäuresequenz beizubehalten. Dies war unter Zuhilfenahme der Redundanz des genetischen Codes möglich. Die Vorgehensweise für den DpnI-Verdau und die Mutagenese-PCR wurde aus *Molecular Cloning* (Sambrook & Russell, 2001) entnommen. Es wurden folgende Primer benutzt (mutierte Nukleotide sind durch kleine Buchstaben markiert):

5'-GGA AGA GAT GGT TAC aCG TcT AGA TCA AGA AGT AG-3'

5'-CTA CTT CTT GAT CTA gAC GtG TAA CCA TCT CTT CC-3'

Für die Übertragung einer PSAP-Domäne auf eGFP wurde analog vorgegangen. Die Sequenz PGPSAPGP wurde am C-Terminus eingefügt. Es wurden dafür das Plasmid pEGFP-N1 und die folgenden Primer verwendet (eingefügte Nukleotide sind durch kleine Buchstaben markiert):

5'-C ATG GAC GAG CTG ccc ggg cca agt gct cct ggt cca TAC AAG TAA AGG-3'

5'-CCT TTA CTT GTA tgg acc agg agc act tgg ccc ggg-CAG CTC GTC CAT G-3'

2.11.3 Gelextraktion von DNA-Fragmenten

Die DNA-Extraktion erfolgte nach der sog. „freeze ´n´squeeze“-Technik. Dabei wurde, nach Auftrennung durch die Agarose-Gelelektrophorese, die gewünschte DNA-Bande mittels UV-Licht sichtbar gemacht und mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Das Gelstück wurde anschließend in ein Reaktionsgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff für ca. 1 min schockgefroren. Die Extraktion wurde dann durch Andrücken des Gelstücks vorgenommen: Dazu wurde ein passendes Stück Parafilm einmal gefaltet und das noch gefrorene Gelstück hineingelegt. Nach einem kurzen Antauen des Gels durch leichten Fingerdruck wurde das Gel mithilfe eines Objektträgers ausgedrückt und die gewonnene Flüssigkeit in einem Reaktionsgefäß gesammelt. Die derart isolierte DNA musste danach ausgefällt werden. Dies wurde durch die Zugabe von 3 M Natriumacetat und 96% Ethanol bei 4°C für 10 min induziert, wobei sich das jeweilige Volumen an der DNA-Lösung orientierte (3 M Natriumacetat 1/10 und 96% Ethanol zweifaches Volumen der DNA-Lösung). Die gefällte DNA wurde anschließend bei 13.000 rpm/4°C/15 min pelletiert, mit 70% Ethanol gewaschen und noch einmal der vorherigen Zentrifugation unterzogen. Zu guter Letzt musste nur noch der Alkohol abgesaugt und das Pellet für 15-30 min bei 37°C getrocknet werden. Nach der Aufnahme in 20 µL ddH₂O, konnte das DNA-Konstrukt bei -20°C gelagert werden.

2.11.4 Restriktionsendonukleasebehandlung

Um einzelne Bereiche eines Plasmids zu isolieren, wurden Restriktionsendonukleasen verwendet, die die DNA anhand einer kurzen, palindromischen Sequenz erkennen und an ebendieser Stelle spalten. Restriktionsenzyme stammen aus Bakterien und dienen dort eigentlich zur Abwehr von Phagen.

Tabelle 2-11 Ansatz Restriktionsendonukleasebehandlung

Komponente	Volumen pro Reaktion [µL]
Vektor-DNA	10 µg
<i>Fast-Digest</i> -Restriktionsendonuklease A	1,5
(evtl. <i>Fast-Digest</i> -Restriktionsendonuklease B)	1,5
Reaktionspuffer	5
ddH ₂ O	Auf 50 µL auffüllen

Der nach obigem Pipettierschema erstellte Ansatz wurde für 5-15 min bei 37°C inkubiert und jeweils 25 µL in Hinblick auf die korrekte Größe per Agarose-Gelelektrophorese analysiert, sowie 25 µL zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Korrekte DNA-Fragmente, die im Agarosegel die erwartete Größe aufwiesen, konnten nun mittels Gelextraktion (s. 2.11.3) aufgereinigt werden.

2.11.5 Ligation

Damit das DNA-Konstrukt (*Insert*) in Bakterien eingebracht und exprimiert werden kann, musste dieses in ein Plasmid (Vektor) ligiert werden. Dazu wurde eine T4-DNA-Ligase verwendet. Um eine möglichst effiziente und korrekte Ligation zu erreichen, wurde die

DNA-Konzentration des *Inserts* und des Vektors mittels Nanodrop-Mikrovolumen-Spektralphotometer bestimmt und ein Verhältnis der Molekülanzahl von 1:3 bis 1:5 an Vektor zu *Insert* eingestellt. Die Ligation erfolgte daraufhin in Hinblick auf Inkubationsbedingungen und Stoffmengen anhand der Herstellerangaben zur T4-Ligase unter Beachtung von „klebrigen DNA-Enden“ (Thermo Fisher Scientific). Nach erfolgreicher Ligation wurden die Proben direkt für die Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Bakterien verwendet (s. 2.11.6).

Tabelle 2-12 Ligationsansatz

Komponente	Volumen pro Reaktion [μ L]
Vektor	X
Insert	Y
Reaktionspuffer (10x)	2
T4 DNA-Ligase	1
ddH ₂ O	Auf 50 μ L auffüllen

2.11.6 Transformation chemisch-kompetenter *Escherichia coli*-Bakterien

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene *Escherichia coli*-Stämme (*E. coli*) transformiert: Zum einen DH5 α (NEB) zur Amplifikation von Plasmiden und zum anderen BL21-Star (DE3; NEB) zur Produktion von Proteinen, in diesem Fall von Gal3. DH5 α -Bakterien besitzen spezifische Mutationen in Endonukleasen (*recA1* und *endA1*), wohingegen BL21-Star (DE3) eine Mutation im Gen für die RNaseE aufweist, was dementsprechend zu einer Zunahme an mRNA führt.

Die Bakterien-Aliquots (100 μ L) wurden zunächst auf Eis aufgetaut und mit 5-10 μ L des Ligationsansatzes vermischt. Es folgte anschließend eine Inkubation von 30 min auf Eis. Der Hitzeschock erfolgte bei 42°C für 30 s, worauf sich eine Inkubation (5 min) auf Eis anschloss. Danach wurden die Bakterien zur Regeneration in 950 μ L SOC-Medium aufgenommen und für 1 h bei 1000 rpm/37°C schüttelnd inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen bei 5000 rpm für 1 min zentrifugiert, 850-900 μ L des Überstands verworfen und das Pellet mit dem restlichen Überstand resuspendiert. Die Zellen wurden schließlich auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert. Als Selektionsmarker fungierten entweder Ampicillin oder Kanamycin (jeweils 25 μ g/mL).

2.11.7 Plasmidisolierung

Die Plasmidisolierung im kleinen Maßstab (Minipräp) wurde nach Birnboim und Kollegen durchgeführt, die auch als „alkalische Lyse“-Methode bekannt ist (Birnboim & Doly, 1979). Dabei wird die verunreinigende genomische DNA selektiv denaturiert. Die Denaturierung erfolgt durch eine Neutralisation, die zur Ausbildung von Aggregaten der genomischen DNA führt, sodass diese einfach per Zentrifugation von der Plasmid-DNA abgetrennt werden kann. Darüber hinaus präzipitieren RNA und SDS-Proteinkomplexe, sodass eine effiziente Plasmidaufreinigung gewährleistet ist.

Vor der Isolierung wurden mithilfe einer sterilen Pipettenspitze positive Kolonien einer Kulturplatte gepickt und in 3 mL LB-Medium aufgenommen. Das Medium enthielt dabei zusätzlich den jeweiligen Selektionsmarker, der dem Resistenzgen des Plasmids entsprach. Die Kultur wurde über Nacht bei 37°C angezogen und daraufhin einer Zentrifugation von 5000 rpm für 1 min unterzogen. Das Pellet wurde dann in 100 µL Lösung 1 (zuvor mit zusätzlich RNase 0,1 mg/mL angesetzt) resuspendiert. 100 µL Lösung 2 wurden nun direkt hinzugefügt und vorsichtig durch Drehen des Reaktionsgefäßes vermischt. Nach 5 min bei RT wurde Lösung 3 analog hinzugegeben. Nach 10 min wurde das Gemisch erneut bei maximaler Geschwindigkeit für wiederum 10 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet verworfen. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt, um sicherzugehen, dass die eingangs erwähnten Aggregate ausreichend entfernt werden konnten. Die Plasmid-DNA konnte nun mit 450 µL Isopropanol gefällt und mithilfe einer Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit für 20 min pelletiert werden. Nach einem Waschschrift mit 300 µL Ethanol wurde die Plasmid-DNA bei 37°C getrocknet (15-30 min) und schließlich in 50 µL TE-Puffer resuspendiert. Die genaue Plasmid-DNA-Konzentration wurde mit dem Nanodrop-Spektralphotometer bestimmt. Für eine Plasmidisolierung im großen Maßstab (Maxipräp) wurde ein kommerziell erhältliches Kit verwendet (Jetstar 2.0, Genomed). Hier diente eine in 200 mL LB-Medium gewachsene Bakterienkultur als Ausgangsmaterial.

Lösungen Plasmidisolierung:

Lösung 1:

50 mM Glukose
 10 mM EDTA
 25 mM Tris
 Eingestellt auf pH 8 (mit NaOH)

Lösung 2:

200 mM NaOH
 1% (w/v) SDS

Tabelle 2-13 Verwendete Plasmide

Bezeichnung	Vektor-hintergrund	Kurzbeschreibung
Tsg101-eGFP	pEGFP C2	Tsg101, ESCRT-I-Komponente; zur Verfügung gestellt von Prof. Bong-Yoon Kim, Yonsei-Universität, Seoul (Südkorea)
*mTsg101-eGFP	pEGFP C2	Tsg101 mit mutierter siRNA-Bindestelle

Tsg101-GST	pGEX-4T1	Tsg101 fusioniert mit GST-Tag; Expressionsplasmid zur Herstellung von rekombinatem Tsg101-GST in <i>E. coli</i> ; Zur Verfügung gestellt von Prof. Tikkanen, Justus-Liebig-Universität Gießen
*eGFP-PSAP	pEGFP N1	eGFP mit einer an den C-Terminus angefügten PGPSAPGP-Sequenz
*Gal3-mCherry	pmCherry C1	Humanes Gal3 mit angefügtem mCherry
*Gal3-ASAA-V5	pETDuet	Humanes Gal3 mit mutierter Tsg101-Bindedomäne PSAT→ASAA und angefügtem V5-Tag; Expressionsplasmid zur Herstellung von rekombinanten Gal3-ASAA-V5
*Gal3-PSAP-V5	pETDuet	Humanes Gal3 mit mutierter Tsg101-Bindedomäne PSAT→PSAP und angefügtem V5-Tag; Expressionsplasmid zur Herstellung von rekombinanten Gal3-ASAA-V5
Gal3 der Ratte	-	Gal3 aus <i>Rattus norvegicus</i> ; Zur Verfügung gestellt von Prof. Leffler, Universität Lund (Schweden)

2.11.8 Sequenzierung

Nach erfolgreicher Klonierung und Plasmidisolierung wurde die korrekte Basenreihenfolge mittels Sequenzierung überprüft. Die Sequenzierung der jeweiligen Proben führte die Firma Seqlab (Göttingen) durch. Die Probenvorbereitung, u. a. durch spezifische Sequenzierprimer, erfolgte nach Anweisung der Firma.

2.12 Spektroskopie

2.12.1 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels UV-Spektroskopie

Für die Konzentrationsbestimmung einer Protein-Lösung wurde ein Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific) Mikrovolumen-Spektralphotometer genutzt. Dieses Gerät misst die Absorption bei 280 nm, die durch aromatische Aminosäuren hervorgerufen wird. Diese Methode ist störanfällig gegenüber Detergenzien, Reduktionsmitteln etc., reichte aber in den meisten Fällen aus, sodass kolorimetrische Verfahren wie z. B. dem Bradford- oder Lowry-Assay mitunter nicht angewendet werden mussten.

Zunächst wurde vor jeder Messung eine Kalibrierung mit ddH₂O durchgeführt. Anschließend wurde der Nullwert mit dem entsprechenden Puffer eingelesen, in dem sich das zu bestimmende Protein befand. Danach wurde die Absorption der Protein-Probe dreimal gemessen und der Mittelwert verwendet. Mit dieser Methode ließ sich ebenfalls die Effizienz der AlexaFluor647-Markierung von Gal3 bestimmen, indem

einerseits die Absorption bei 280 nm und andererseits bei 650 nm gemessen wurde (s. 2.10.3).

2.12.2 Fluoreszenzpolarisation

Mithilfe der Messung der Fluoreszenzpolarisation lassen sich Wechselwirkungen und Bindungen zwischen zwei Molekülen nachweisen. Diese Methode beruht auf dem Prinzip, dass Fluorophore, die mit linear polarisiertem Licht angeregt werden, ebenfalls linear polarisiertes Licht wieder emittieren. Die Fluoreszenzpolarisation wird folglich nur dann verändert, wenn sich das Fluorophor bewegt bzw. rotiert. Tatsächlich ist die durchschnittliche Rotationsgeschwindigkeit eines frei beweglichen Fluorophors hoch genug, um trotz dessen äußerst geringer Fluoreszenzlebensdauer τ_{fl} (vgl. 2.7.7) die Polarisation der abgegebenen Photonen zu beeinflussen.

In der Praxis wird das Anregungslicht mithilfe eines Polarisators linear polarisiert und auf die Probe geschickt. Die Intensität des resultierenden Emissionslichtes wird wiederum nach der Passage eines Polarisators gemessen, wobei dies an zwei Positionen durchgeführt wird, die perpendicular zueinander liegen. Die Differenz zwischen beiden Fluoreszenzintensitäten wird als Maß für den Grad der Polarisierung des Emissionslichtes herangezogen. Diese Differenz ist gering, wenn die Rotationsgeschwindigkeit hoch ist und sich die untersuchten Fluorophore in ihrer Orientierung zufällig verteilen. Bindet hingegen das Fluorophor an ein Protein, verlangsamt sich die Rotationsgeschwindigkeit, was zur Folge hat, dass sich die Differenz zwischen beiden Intensitäten vergrößert, weil die Fluoreszenzpolarisation im Emissionslicht verbleibt – die sog. Anisotropie steigt.

Die Messungen der Fluoreszenzpolarisation wurden in schwarzen 96-well-Platten durchgeführt und jeweils dreimal wiederholt. Es wurde eine Konzentration von 5 μM Gal3 und 0,05 μM von Fluorescein-markiertem A-Tetra (GalNAc α 1-3(Fuca α 1-2)Gal β 1-4Glc) verwendet.

2.12.3 Turbiditätsassay

Gal3 ist in der Lage zu oligomerisieren und hochmolekulare Cluster zu bilden (s 1.3). Diese Quervernetzung ist in manchen Fällen so stark und die Cluster von solcher Größe, dass sich *in vitro* eine Lösung eintrübt. Diese Trübung lässt sich bei 350 nm detektieren. Als Ligand für diese Messungen diente Asialofetuin (ASF), das bekanntlich Gal3 stark vernetzen kann, da es über mehrere N- und O-Glykosylierungen verfügt. Drei der N-Glykosylierungen besitzen dahingehend neun terminale LacNAc-Reste, an die Galektine bevorzugt binden (Dam *et al.*, 2005).

Die Titrationsreihen wurden in 96-well-Platten durchgeführt und dreimal wiederholt. Die Oligomerisierung von Gal3 ist bei einer Konzentration von 3,125 μM ASF maximal (vgl. 2.10.1). Wird bei dieser ASF-Konzentration Gal3 in verschiedenen Konzentrationen hinzugegeben, beginnt die detektierbare Komplexierung bei 2,5 μM

Gal3 (von Mach, 2013). Für den Assay wurde eine Konzentration von 5 μM Gal3 und 12,5 μM ASF eingesetzt.

2.12.4 Circulardichroismus (CD)

Die CD-Spektroskopie erlaubt die Analyse bzw. Aufklärung der Sekundärstruktur eines Proteins. Diese Methode basiert auf der unterschiedlich starken Absorption von zirkular-polarisiertem Licht eines chiralen Moleküls. Das CD-Spektrum wird in Abhängigkeit der Wellenlänge gemessen und aufgetragen. Die Sekundärstruktur eines Proteins hat Einfluss auf das CD-Spektrum eines Proteins, wobei rein α -helikale Strukturen bzw. reine β -Faltblätter spezifische und repräsentative spektrale Signaturen aufweisen. Aus diesem Grund ist es möglich, das CD-Spektrum eines gemessenen Proteins mithilfe von Datenbanken abzugleichen und so Rückschlüsse auf die vorhandene Sekundärstruktur zu ziehen.

Zur Strukturbestimmung der beiden rekombinanten Proteine Gal3-PSAP und Gal3-ASAA wurden diese auf 25 μM in 10 mM Tris pH 8 verdünnt. 300 μL der verdünnten Lösung wurden anschließend in eine 1 mm lange Quartz-Küvette (Helma Analytics) überführt, sodass mit der Messung der CD-Spektren begonnen werden konnte. Für die Messung wurde ein Jasco J815 CD-Spektrometer verwendet. Die verschiedenen Aufnahme-Parameter wurden wie folgt eingestellt: Abrastgeschwindigkeit 50 nm/min, *Response Time* 2 s, *Data Pitch* 0,1 nm, Bandbreite 1,71 nm. Für jede Probe wurden jeweils drei Spektren von 250 bis 195 nm Wellenlänge bei einer Temperatur von 21°C aufgezeichnet. Die Analyse der Daten erfolgte mit der *Spectra Manager* Software (Jasco). Um den jeweiligen Anteil der Sekundärstrukturen zu bestimmen, wurde die BESTSEL-(Web)-Analyse verwendet (Micsonai *et al.*, 2015). Der berechnete NRMSD-Wert (*Normalized Root-Mean-Square Deviation*) betrug für Gal3-PSAP 0,0174 und für Gal3-ASAA 0,0166 (200-250 nm).

2.13 Statistik

Alle statistischen Analysen dieser Arbeit wurden mit der Software *Graphpad Prism* 5.03 ausgeführt. Falls nicht anders angegeben, wurde der Mittelwert stets mit dem dazugehörigen Standardfehler (*Standard Error of the Mean*, SEM) angegeben. Wenn die sog. „relative Menge“ zwischen zwei Gruppen einer Western Blot-Quantifizierung angegeben wurde, so waren damit die Normalisierung auf das jeweilige Marker- (z. B. Tsg101) bzw. konstitutiv exprimierte Protein (z. B. GAPDH), sowie der Bezug auf das korrespondierende Zelllysate gemeint. Statistische Unterschiede zwischen zwei Gruppen mit normalverteilten Merkmalen wurden durch den ungepaarten Student's *t*-Test bewertet. Das Signifikanzniveau der Abbildungen ist folgendermaßen angegeben mit: ns (nicht signifikant) = $P > 0,05$; * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$. Es wurden in der Regel drei unabhängige Experimente durchgeführt ($n=3$), wobei Abweichungen von dieser Regel in der Bild-Legende gekennzeichnet sind.

3 Ergebnisse

Gal3 verfügt über keine ER-Signalsequenz, dennoch wird dieses Lektin sekretiert und kann in der Folge im extrazellulären Raum und nach erfolgter Endozytose im endosomalen Kompartiment wichtigen Aufgaben nachgehen. Die daraus resultierenden Fragestellungen, nämlich die Identifikation der Transport-Carrier, die Bestimmung des Sekretionsmechanismus und des dafür benötigten Sortiersignals, konnten in dieser Arbeit beantwortet werden. Die Aufklärung dieser Fragen soll in den nachfolgenden Kapiteln dargestellt werden.

3.1 Gal3 befindet sich in apikalen Exosomen

Es existieren mehrere Studien, die Gal3 entweder in Mikrovesikeln oder in Exosomen nachweisen konnten (Mehul & Hughes, 1997, Thery *et al.*, 2001). Einige Daten aus der Exosomen-Aufreinigung, die in diesem Abschnitt präsentiert werden, wurden bereits durch Dr. Dominik Schneider erarbeitet und mit der Hilfe der Master-Studentin Jenny Dewes vervollständigt (Schneider, 2011). Auch die elektronenmikroskopische Analyse der beiden Vesikelfractionen stammt aus der Arbeit von Dr. Dominik Schneider und soll hier nur der Vollständigkeit halber präsentiert werden. Um den spezifischen Gal3-Transporter in MDCK-Zellen zu bestimmen, wurde der Zellkulturüberstand polarer, sieben Tage alter MDCK-Zellen über Nacht gesammelt und einer differenziellen Zentrifugation unterzogen (s. 2.8.1 und 2.8.2). Die resultierenden Fraktionen, wobei Mikrovesikel bei 10.000 g und Exosomen bei 100.000 g pelletieren, konnten anschließend entweder im TEM (s. 2.7.10) oder per Western Blot (s. 2.9.6) analysiert werden. Die mittels Elektronenmikroskop visualisierte exosomale Fraktion enthielt eine homogene Population von kleinen, runden Vesikeln, die einen Durchmesser von ca. 50-90 nm aufwiesen (s. Abb. 3.1a; Schneider, 2011; vgl. auch van der Pol *et al.*, 2012). Das Aussehen und der Durchmesser entsprechen exakt der Beschreibung von typischen Exosomen (Denzer *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu stand das Erscheinungsbild der Mikrovesikel-Fraktion: Eine heterogene Population von Vesikeln mit variierendem Durchmesser von 100-1000 nm (s. Abb. 3.1b), die mitunter sogar eher tubulären Strukturen ähnelten und damit der Beschreibung von Mikrovesikeln in der Literatur entsprachen (Muralidharan-Chari *et al.*, 2010).

Beide Pellets wurden anschließend im Western Blot auf ein Vorkommen von endogenem Gal3 untersucht (s. Abb. 3.1c). Die exosomale Fraktion enthielt die beiden exosomalen Markerproteine Alix und Tsg101 (Baietti *et al.*, 2012), aber nicht das ER-Enzym Proteindisulfid-Isomerase (PDI), die als Kontrolle auf zytoplasmatische Verunreinigung diente. Die Fraktion der Mikrovesikel wies weder Alix noch PDI auf (s. Abb. 3.1d), jedoch konnte das Markerprotein Aktin nachgewiesen werden (Kowal *et al.*, 2016). Ein positiver Nachweis von Gal3 ergab sich ausschließlich für die exosomale

Fraktion, nicht aber für die Mikrovesikel-Fraktion. Dies zeigt, dass in MDCK-Zellen Exosomen der alleinige *Carrier* für den vesikulären Gal3-Export sind.

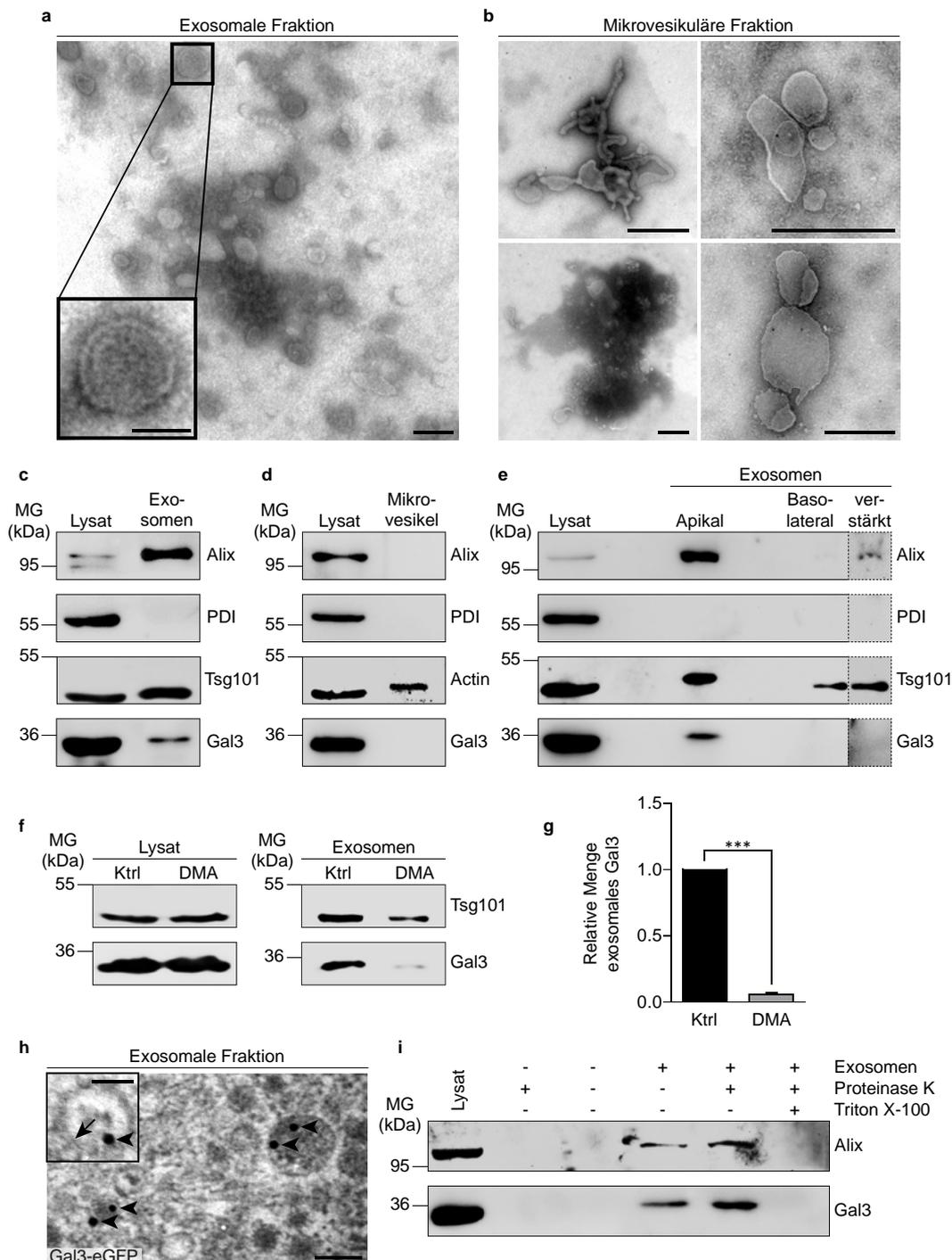


Abb. 3.1 Gal3 befindet sich im Lumen apikaler Exosomen. (a, b) Die Pellets der exosomalen (100.000 g) bzw. mikrovesikulären (10.000 g) Fraktion wurden mithilfe der Elektronenmikroskopie visualisiert. Die Einfügung verweist auf ein typisches Exosom. (c, d) Beide Fraktionen wurden per Western Blot analysiert. Als Positiv-Kontrolle der Exosomen dienten Tsg101 und Alix, PDI dagegen als Negativ-Kontrolle. Aktin gilt als Positiv-Kontrolle für Mikrovesikel. Gal3 kam ausschließlich in der exosomalen Fraktion vor. (e) Vollständig polarisierte Zellen auf Filter-Einsätzen waren gekennzeichnet durch eine polarisierte, d. h. ausschließlich exosomale Sekretion von Gal3. (f) Die Inkubation von 15 nM DMA über Nacht hemmte die exosomale Sekretion von Gal3 und dem Markerprotein Tsg101. (g) Quantifizierung der Experimente aus f; $n=5$ unabhängige Experimente. (h) Das Pellet der exosomalen Fraktion Gal3-eGFP-exprimierender Zellen wurde eingebettet und mit Gold-markierten GFP-Nanobodies (Pfeilköpfe) markiert. Die Einfügung verweist auf ein typisches Exosom mit sichtbarer Doppelmembran (Pfeil). (i) Die Analyse mithilfe des Proteinase K-Sensitivitätstests belegte, dass Gal3 im Lumen der Exosomen vor dem Abbau durch die Proteinase geschützt war. Maßstäbe: a, h, 100 nm; a, h, Einfügung, 50 nm; b, 500 nm. Aus Bänfer *et al.*, 2018.

Dieses Ergebnis wird zusätzlich von Nycodenz Flotations-Studien gestützt, die darauf hindeuten, dass der Hauptanteil von Gal3 mit Membran- bzw. Vesikelfractionen assoziiert ist (Schneider, 2011). Dabei flotiert Gal3 in Fraktionen mit ähnlichen Dichten, die in der Literatur für Exosomen beschrieben worden sind (Raposo *et al.*, 1996a, They *et al.*, 1999).

Da Gal3 in polaren MDCK-Zellen hauptsächlich in das apikale Medium abgegeben wird (Lindstedt *et al.*, 1993), sollte anschließend überprüft werden, ob diese Polarisation auf der gerichteten exosomalen Sekretion von Gal3 basiert. Tatsächlich enthielten ausschließlich apikale Exosomen Gal3, wohingegen das exosomale Markerprotein Tsg101 in beiden Fraktionen vorkam (s. Abb. 3.1e). Die Verteilung des Markerproteins Alix ist der von Gal3 ähnlich, jedoch konnte im Gegensatz zu Gal3 durch eine verstärkte Belichtung noch basolaterales Alix nachgewiesen werden.

Durch die Verwendung des spezifischen Inhibitors Dimethyl-Amilorid (DMA), der die Sekretion von Exosomen verhindert (Savina *et al.*, 2003), konnte nun die exosomale Sekretion von Gal3 bestätigt werden (s. Abb. 3.1f, g). Dementsprechend sank unter dem Einfluss von DMA die Menge des Markerproteins Tsg101. Der Anteil von Gal3 in der Exosomen-Fraktion wurde dadurch sogar dramatisch verringert. Dies verdeutlicht nochmals, dass Gal3 Exosomen als Vehikel nutzt.

Um dies weitergehend abzusichern, wurde die exosomale Fraktion von Gal3-eGFP exprimierenden Zellen für die TEM präpariert und mit GFP-Nanobodies gefärbt. Diese eignen sich aufgrund ihrer geringen Größe und hohen Affinität besonders für die Immuno-EM. Zur Visualisierung in der TEM waren die Nanobodies direkt mit 15 nm Goldpartikeln gekoppelt (s. 2.10.7). Tatsächlich konnten Gal3-anzeigende Goldpartikel im Lumen oder an der Membran typischer Exosomen detektiert werden (s. Abb. 3.1h). Um diese Beobachtung, dass Gal3 im Inneren der Exosomen vorkommt, zu überprüfen, wurde ein Proteinase-K-Sensitivitätstest durchgeführt (s. 2.8.5). Dazu wurde die aufgereinigte exosomale Fraktion in An- bzw. Abwesenheit von Triton X-100 mit Proteinase-K behandelt. Weder Gal3 noch das Markerprotein Alix wurden durch die Proteinase abgebaut (s. Abb. 3.1i). Dies unterstreicht nochmals, dass beide Proteine im Lumen der Exosomen vor Degradation geschützt waren. Erst nach Zugabe des Detergens Triton X-100 wurden beide Proteine abgebaut. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Gal3 in MDCK-Zellen im Lumen von Exosomen apikal sekretiert wird.

3.2 Gal3 kolokalisiert mit MVB-assoziierten Proteinen

Um den Sortierprozess, der schließlich zur exosomalen Sekretion von Gal3 führt, nachvollziehen zu können, sollte die Assoziation von Gal3 mit MVB-Markerproteinen mikroskopisch untersucht werden. Dazu wurde endogenes Gal3 zusammen mit den ESCRT-Komponenten Hrs und Tsg101, sowie dem ESCRT-assoziierten Protein Alix, mithilfe einer Antikörper-Färbung markiert und im KLSM analysiert.

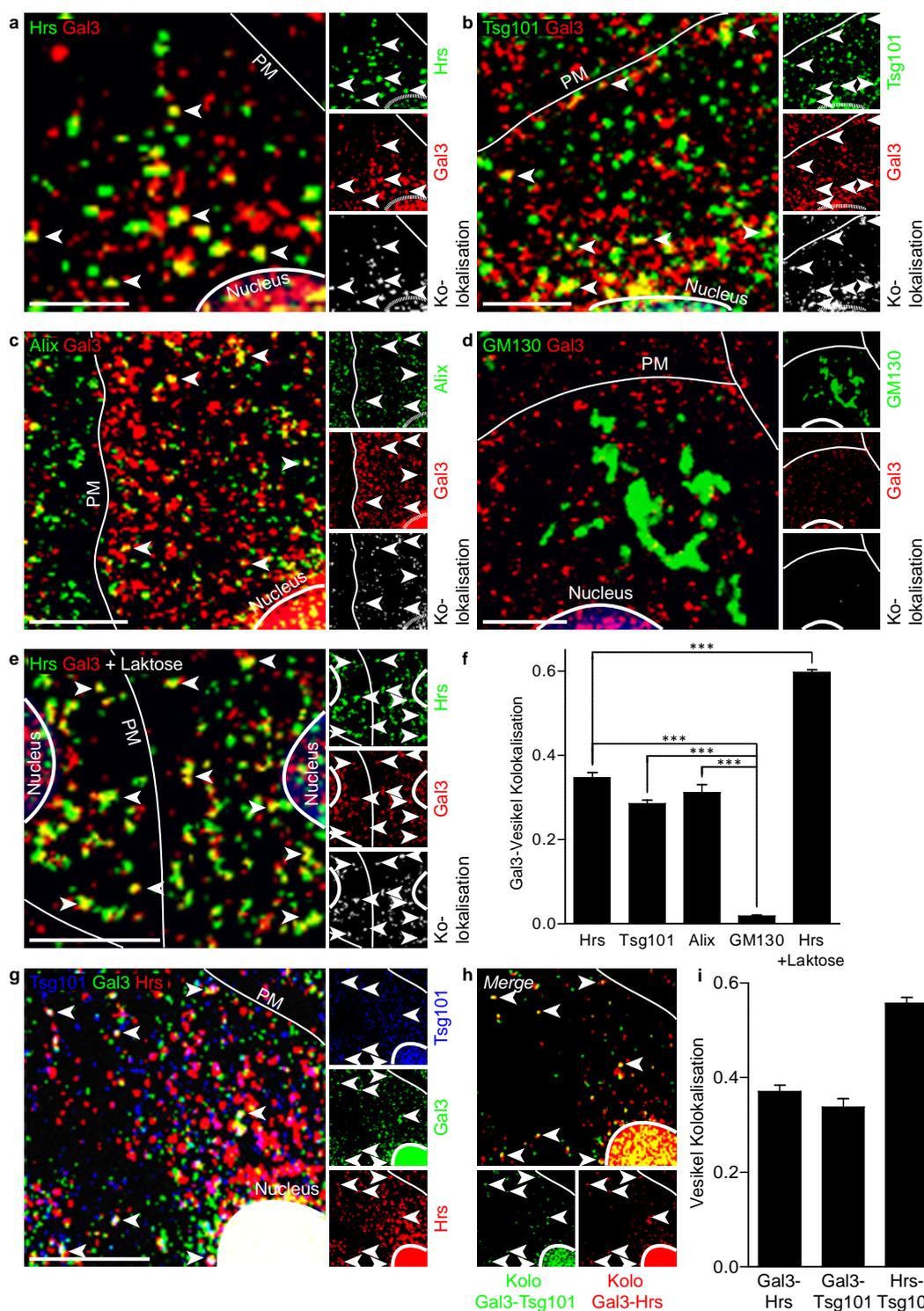


Abb. 3.2 Gal3 kolokalisiert mit Proteinen des ESCRT-Superkomplexes. (a-d) KLSM-Kolokalisationsstudien zwischen Gal3 und den ESCRT-Proteinen Hrs (a), Tsg101 (b) und Alix (c), sowie der Negativ-Kontrolle GM130 (c) in immungefärbten MDCK-Zellen. Kolokalisierende Strukturen wurden mithilfe eines eigenen Kanals dargestellt (weiß) und durch Pfeilköpfe markiert. (e) Durch eine Behandlung der Zellen mit 150 mM Laktose (zweimal 40 min vor der Immunfluoreszenzfärbung und ein zusätzlicher Laktose-Waschschritt) und dem daraus folgenden Ausschluss von endozytiertem Gal3 ließ sich der Anteil an Kolokalisationen mit Hrs drastisch steigern. Es bleibt demnach nur der zytoplasmatische, mit MVBS-assoziierte und folglich Laktose-unabhängige Teil von Gal3 zurück. (f) Quantifizierung der Kolokalisationen der Experimente a-e mithilfe des Manders-Koeffizienten. Nuclei wurden von der Quantifizierung ausgeschlossen, 15-20 Zellen pro Experiment. (g, h) KLSM-Kolokalisationsstudie einer Dreifach-Färbung von Gal3, Tsg101 und Hrs. Dreifach-positive Strukturen wurden durch Pfeilköpfe gekennzeichnet. (h) Die berechneten Kolokalisationskanäle (Kolo) zwischen Gal3 und Tsg101 (grün) bzw. Hrs (rot) wurden übereinander gelegt (Merge), um die Dreifach-Kolokalisationen zu illustrieren. (i) Quantifizierung der Experimente aus g (Parameter wie in f). Maßstab: a-g, 10 µm.

Für die Quantifizierung der jeweiligen Gal3-Kolokalisation mit einem Markerprotein wurden zunächst alle vesikulären Strukturen beider Kanäle bestimmt und schließlich für jede der Manders-Koeffizient berechnet. Dadurch konnte bestimmt werden, dass in MDCK-Zellen $34,6 \pm 1,2\%$ der Gal3-Vesikel mit Hrs kolokalisierten (s. Abb. 3.2a). Ein vergleichbarer Anteil von $28,4 \pm 0,9\%$ bzw. $31 \pm 1,9\%$ ergab sich für die Kolokalisation von Gal3-Vesikeln mit Tsg101- bzw. Alix-positiven Strukturen (s. Abb. 3.2b, c). Als Negativ-Kontrolle fungierte GM130, das im Golgi-Apparat vorkommt und mit einem Anteil von lediglich $1,8 \pm 0,2\%$ mit Gal3-Vesikeln überlappte (s. Abb. 3.2d).

Die bisherigen Erkenntnisse sollten zusätzlich durch eine Dreifach-Färbung von Gal3, Hrs und Tsg101 abgesichert werden (s. Abb. 3.2g-i). Dabei ergaben sich für die Kolokalisation zwischen Gal3-Vesikeln und Hrs ($37,1 \pm 1,3\%$) bzw. Tsg101 ($33,8 \pm 1,8\%$) ähnliche Werte, wie in den Doppelfärbungen. Ein Großteil dieser Strukturen war jedoch auch dreifach positiv (s. Abb. 3.2h). Für die beiden Markerproteine selbst betrug die Überlappung $55,6 \pm 1,7\%$, was einerseits verdeutlicht wie konservativ die verwendete Analyseverfahren mittels Vesikelbestimmung und nachfolgender Berechnung der jeweiligen Manders-Koeffizienten ist und andererseits, dass beide Markerproteine für eine Markierung der MVBs verwendet werden können.

Die Tatsache, dass nur rund ein Drittel aller vesikulären Gal3-Strukturen mit MVB-Markerproteinen kolokalisierten, könnte auf einen größeren Anteil an endozytiertem Gal3 zurückzuführen sein, dass sich dementsprechend im frühen endosomalen Kompartiment oder in Recycling-Endosomen aufhielt (Schneider *et al.*, 2010). Um diese Annahme zu überprüfen, wurden die Zellen vor der Immunfluoreszenz-Färbung zweimal mit Laktose behandelt und die (Wieder-) Aufnahme von Gal3 damit unterbunden (Straube *et al.*, 2013). Tatsächlich erhöhte sich durch den Ausschluss von internalisiertem Gal3 die Kolokalisation mit Hrs auf $59,6 \pm 0,6\%$ (s. Abb. 3.2e). Dies verdeutlicht zudem, dass die beobachtete Assoziation von Gal3 und MVBs unabhängig vom endozytotischen Weg zustande kam.

Die Antikörper-Spezifität der Immunfluoreszenz-Färbung von Gal3, Hrs und Tsg101 wurde in Zellen mit CRISPR-Cas9-induziertem *Knockout* (MDCK $_{\Delta Gal3}$) (Jinek *et al.*, 2012, Gasiunas *et al.*, 2012) bzw. mit siRNA-induziertem *Knockdown* (Hrs, Tsg101) überprüft (s. Abb. 3.2Abb. 3.3).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass ein bedeutender Anteil von Gal3 zusammen mit ESCRT-Markerproteinen an Multivesikulären Körperchen organisiert ist, die das Ursprungskompartiment für Exosomen darstellen.

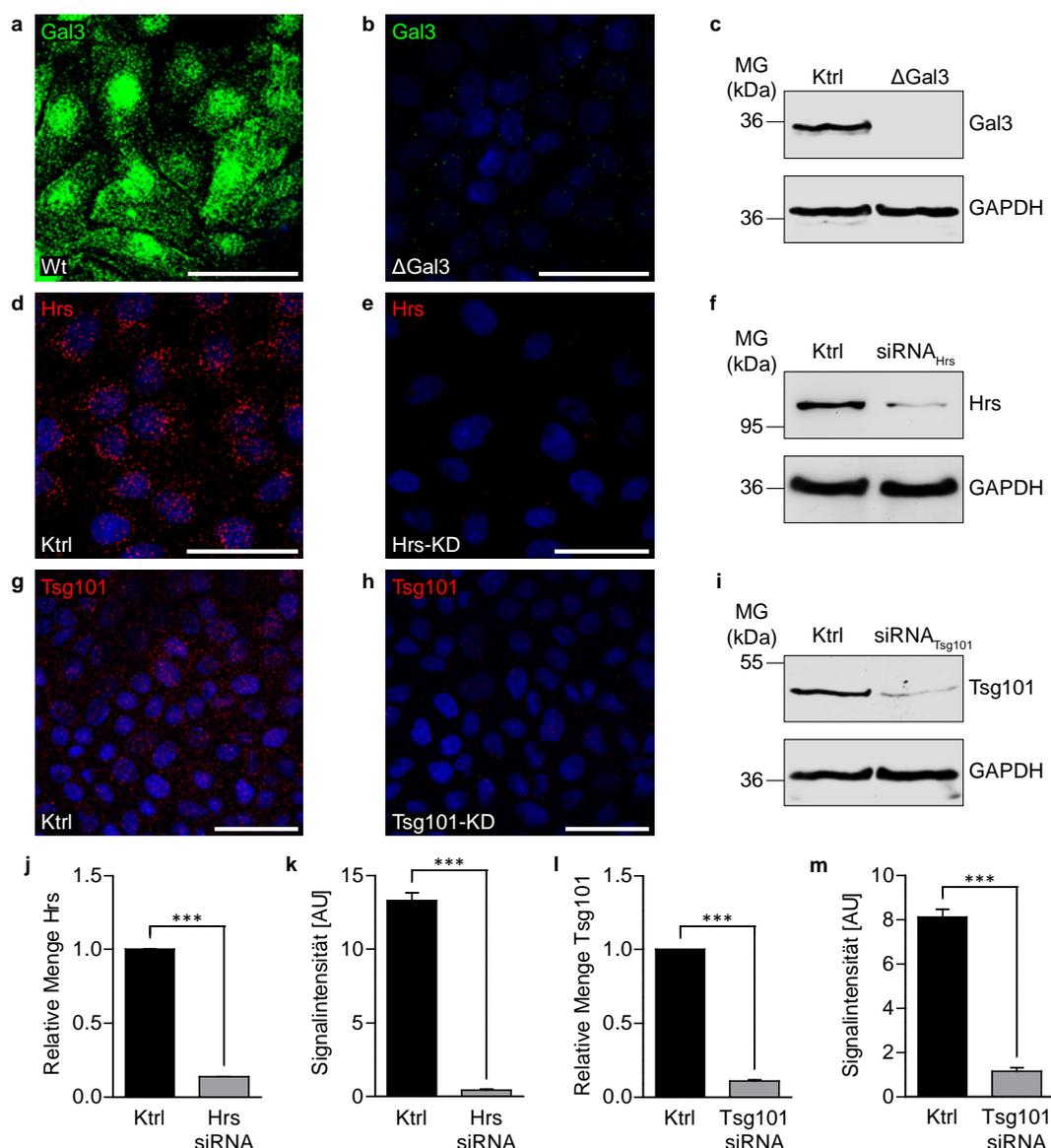


Abb. 3.3 Überprüfung der Antikörper-Spezifität. (a, b) Gal3 wurde wie in Abb. 3.2 in Wildtyp-MDCK- (a) bzw. Δ Gal3-Zellen (b) mit Antikörpern angefärbt und mithilfe der KLSM bei gleichen Parametern ausgewertet. (c) Western Blot-Analyse der korrespondierenden Zelllysate. (d, e) Die Hrs-Färbung wurde ebenso in unbehandelten MDCK-Zellen (d) bzw. in Zellen, die mit siRNA gegen Hrs behandelt wurden (e), bei gleichen Parametern überprüft. (f) Western Blot-Analyse der korrespondierenden Zelllysate. (g, h) Die Tsg101-Färbung wurde in Wildtyp-MDCK-Zellen (g) und in Tsg101-depletierten Zellen (h) verglichen. (i) Western Blot-Analyse der korrespondierenden Zelllysate. (j) Der effiziente *Knockdown* von Hrs wurde durch die Quantifizierung der Western Blot-Signale verifiziert ($n=2$). (k) Die Spezifität der Hrs-Antikörper wurde durch den Vergleich der beiden Fluoreszenz-Intensitäten überprüft. Die Abnahme der Fluoreszenz in den Hrs-depletierten Zellen (auf 3,6%) war noch ausgeprägter als die *Knockdown*-Effizienz (auf 13,6%). Es wurden pro Gruppe 25-30 Bilder ausgewertet bei $n=2$. (l) Die Effizienz des Tsg101-*Knockdowns* wurde durch die Quantifizierung der Experimente aus i bestätigt. (m) Auch hier wurde durch den Vergleich der Fluoreszenz-Intensität die Antikörper-Spezifität bestimmt. Die Abnahme des Signals (auf 14,2%) war vergleichbar mit der biochemisch ermittelten *Knockdown*-Effizienz (auf 13,6%). Für die Auswertung wurden 23-30 Zellen pro Gruppe analysiert bei $n=2$ unabhängigen Experimenten. Maßstab: a, b, d, e, g, h, 50 μ m.

3.3 Die Visualisierung des Gal3-Sortierprozesses mittels ultrahochoflösender Mikroskopie

3.3.1 GSDIM

Da die KLSM, aufgrund der begrenzten Auflösung, weder Hinweise auf etwaige Proteininteraktionen liefert, noch Rückschlüsse auf den genauen Sortierprozess erlaubt, wurde schließlich die GSDIM-Technik im analogen Versuchsaufbau verwendet. Es

wurden dazu Immunfluoreszenz-behandelte MDCK-Zellen entsprechend präpariert, um mit dem Auflösungsvermögen der GSDIM den molekularen Ablauf der Verpackung von Gal3 in ILVs abzubilden. Zunächst wurde die durchschnittliche Größe der prominenten Tsg101 bzw. Hrs Akkumulationen bestimmt, um sicher zu gehen, dass es sich dabei um MVBs handelt. Die Größe betrug für Tsg101 $511,9 \pm 6,4$ nm und für Hrs $483,6 \pm 5,8$ nm (Mittelwert \pm s.e.m, $n=3$ Experimente, jeweils 5-7 Zellen) und entsprach damit exakt den in der Literatur beschriebenen Werten (400-500 nm) (Gruenberg & Stenmark, 2004). Genau an diesen Stellen konnte auch Gal3 nachgewiesen werden, das mit dem jeweiligen Markerprotein eng in Verbindung stand (s. Abb. 3.4; vgl. auch Appendix Abb. 10.1 und Abb. 10.2). Bei dem Vergleich der Protein-Verteilungen zeigte sich, dass Gal3 in drei unterschiedlichen räumlichen Anordnungen vorkam, die den drei Phasen der ILV-Biogenese bzw. -Knospung entsprechen (Henne *et al.*, 2011).

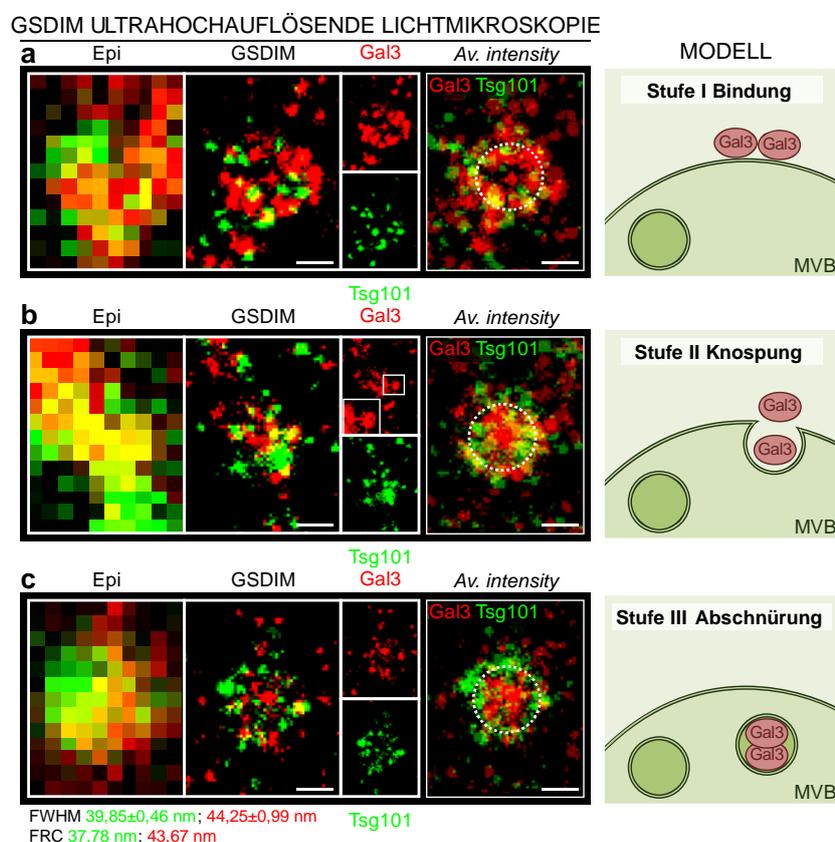


Abb. 3.4 Gal3-Rekrutierung in ILVs (I). (a-c) Die genaue Lokalisation der Gal3-Akkumulationen an und in den MVBs konnte durch die ultrahochauflösende GSDIM-Methode visualisiert werden. Tsg101 wurde als Markerprotein verwendet. Die ultrastrukturell definierten MVBs (GSDIM) sind dabei zum Vergleich mit dem korrespondierenden Epifluoreszenz-Bereich (Epi) korreliert. Schließlich wurde durch die Überlagerung von jeweils vier einzelnen MVBs ein *Average Intensity Plot* (*Av. intensity*) angefertigt. (a) Die erste Stufe der Gal3-Rekrutierung war durch eine Akkumulation von Gal3-Clustern am Rand der zirkulären Markerprotein-Ansammlungen charakterisiert. (b) Die zweite Stufe, die Knospung der ILVs in das Lumen der MVBs, war durch fingerartige Strukturen gekennzeichnet, die ausgehend vom MVB-Rand in Richtung Zentrum ausstrahlen (s. Einfügung). Diese auffälligen Gal3-Konstruktionen entsprangen dabei Ansammlungen des Markerproteins Tsg101. (c) Die finale Stufe zeichnete sich durch eine zentrale Akkumulation von Gal3 im Inneren der MVBs aus, die von dem Marker Tsg101 orbital umrahmt wurde. Die *Average Intensity Plots* verdeutlichen, wie nach der initialen Akkumulation am Rand der MVBs, Gal3 darauffolgend progressiv in das Zentrum der MVBs rekrutiert wurde. Die gestrichelten Linien verweisen auf die idealisierte MVB-Membran und besitzen einen Durchmesser von 450 nm. Die erreichte Auflösung für beide Farbkanäle wurde durch FRC und FWHM bestimmt. Maßstab: a-c, 250 nm. FRC, Fourier Ring Korrelation; FWHM, *Full Width at Half Maximum*.

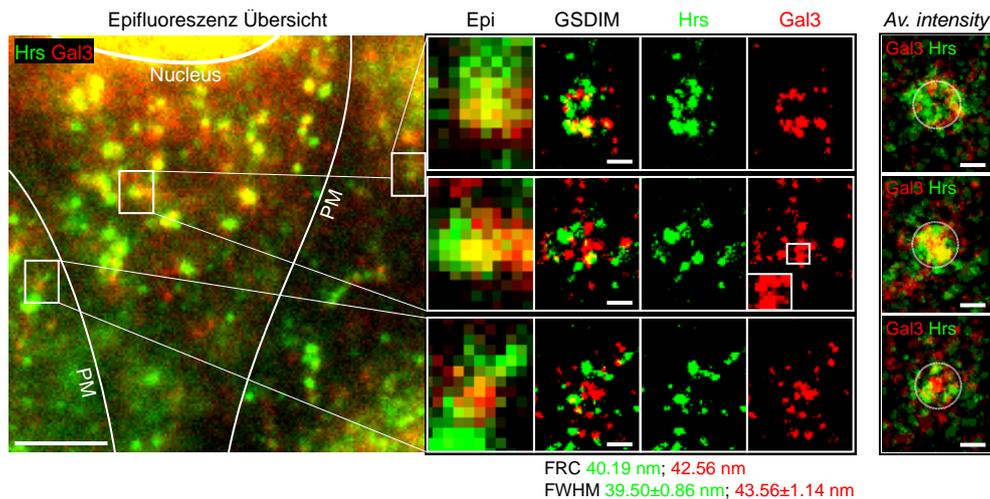


Abb. 3.5 Gal3-Rekrutierung in ILVs (II). In einer analogen Vorgehensweise wie in Abb. 3.4 wurde Hrs als Markerprotein für MBVs eingesetzt. Zusätzlich verdeutlicht die Epifluoreszenz-Übersicht das Auflösungsvermögen der GSDIM-Methode und erlaubt die Einordnung der Epifluoreszenz-Ausschnitte. Auch mit dem Marker Hrs ließen sich entsprechende Strukturen visualisieren, die die fortschreitende Rekrutierung von Gal3 in ILVs kongruent abbildeten. Die gestrichelten Linien besitzen wie in Abb. 3.4 einen Durchmesser von 450 nm. Maßstäbe: Übersicht, 2,5 µm; GSDIM, 250 nm. PM, Plasmamembran; Av. intensity, Average Intensity Plot; FRC, Fourier Ring Korrelation; FWHM, Full Width at Half Maximum.

In der ersten Stufe akkumulierte Gal3 am Rand der zirkulären Markerprotein-Ansammlungen und wies dementsprechend eine orbitale Verteilung auf (s. Abb. 3.4a, Abb. 3.5). Dies kann somit als *Cargo-Clustering* bzw. Gal3-Rekrutierung aufgefasst werden. In Strukturen, die der zweiten Phase der ILV-Biogenese zugerechnet werden konnten, d. h. der Vesikelknospung, erschien Gal3 als fingerartige Projektionen, die den Markerprotein-Akkumulationen entsprangen und in Richtung Zentrum des MVBs abgeschnürt wurden (s. Abb. 3.4b, Abb. 3.5). Diese Anordnung könnte demgemäß den Prozess der Gal3-Vesikelknospung mittels Membrankonstriktion widerspiegeln. MVBs, die der dritten und finalen Phase der ILV-Biogenese entsprachen, waren durch eine zentrale Akkumulation von Gal3-Vesikeln charakterisiert, die von einer orbitalen Markerprotein-Ansammlung umgeben waren (s. Abb. 3.4c, Abb. 3.5). Vor allem die *Average Intensity Plots* verdeutlichen den Prozess der Gal3-Internalisierung in ILVs: Zunächst kam es zur Akkumulation an der MVB-Membran, wohingegen in den nachfolgenden Stufen die progressive Rekrutierung von Gal3 ins Zentrum des MVBs erfolgte. Die erreichte Lokalisations-Präzision bzw. Auflösung betrug ~40 nm und wurde mittels FWHM-Analyse und FRC approximiert (Nieuwenhuizen *et al.*, 2013, Banterle *et al.*, 2013, Bänfer *et al.*, 2018). Diese Ultrastruktur-Daten dokumentieren somit auf molekularer Ebene, wie Gal3 an MVBs rekrutiert, sortiert und abschließend in ILVs verpackt wurde.

Um diese Schlussfolgerungen abzusichern und eine Beurteilung der erreichten praktischen Auflösung zu ermöglichen, wurden Computer-basierte Simulationen durchgeführt (Schnitzbauer *et al.*, 2017), die die experimentellen Parameter der GSDIM-Mikroskopie exakt nachbildeten (s. 2.7.9). Die Simulations-Modelle wurden in

Zusammenarbeit mit dem Kooperationspartner, der AG Jungmann (Ludwig Maximilian Universität München/Max Planck Institut für Biochemie Martinsried) erstellt.

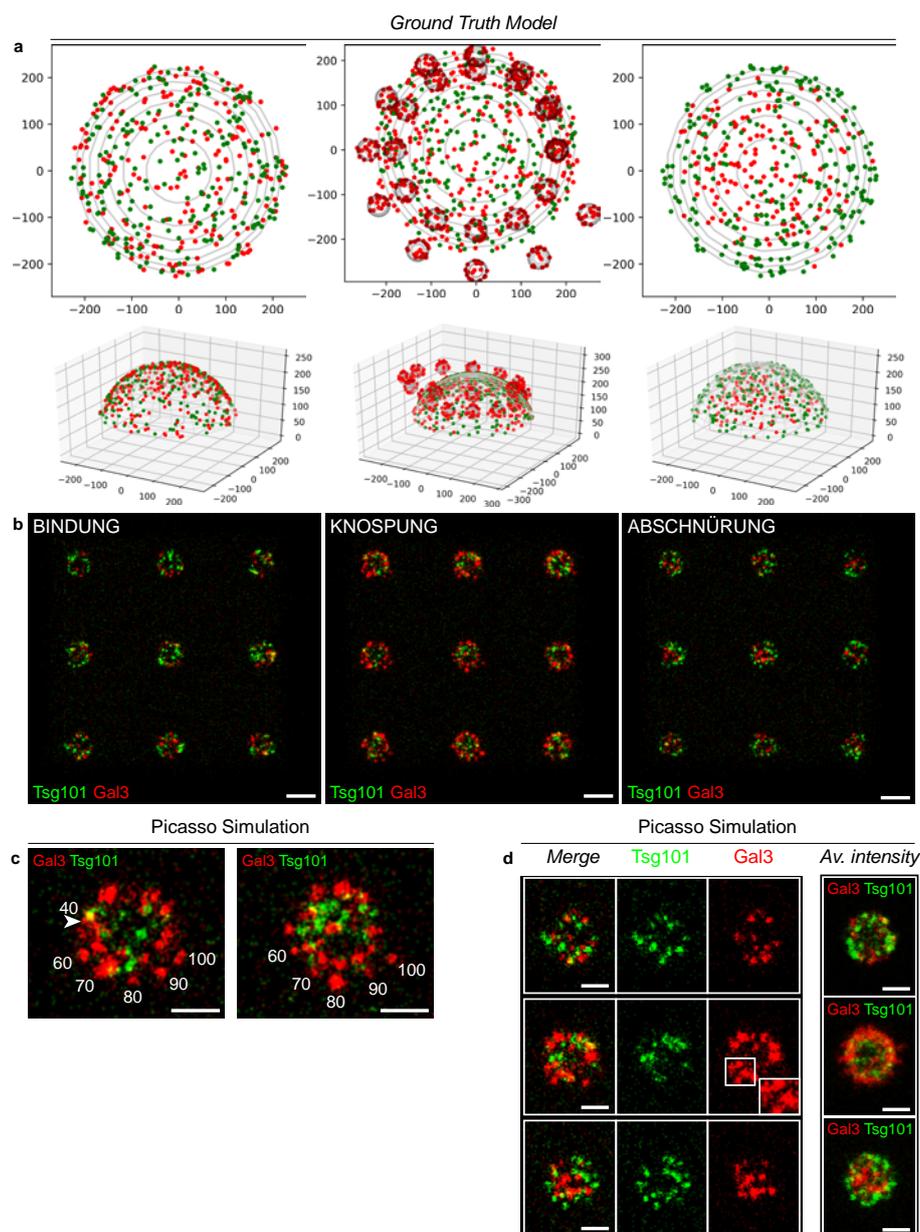


Abb. 3.6 Computer-basierte Simulationen zur Verifizierung der experimentellen GSDIM-Daten. (a) Die *Ground Truth* Modelle zu den einzelnen Stadien der Gal3-Rekrutierung bildeten die Grundlage für die Simulation. Die Größe der berechneten Fokalebene wurde berücksichtigt, indem nur der bestimmte Bereich der MVB-Oberfläche verwendet wurde. Um die erste Stufe zu reproduzieren, wurde Gal3 und Tsg101 zufällig auf der Oberfläche des 500 nm großen Vesikels simuliert. Um die besonders komplexe Knospung nachzubilden wurde auf eine artifizielle, spiralförmige Anordnung zurückgegriffen. Für die dritte Stufe wurde die zufällige Verteilung von Gal3 innerhalb des MVB-Lumens angenommen. (b) Picasso Simulationen der jeweiligen Stufen. Es wurde immer ein Set aus neun MBVs simuliert. (c) Vergrößerung des Knospungs-Stadiums und der simulierten spiralförmigen Anordnung der ILVs. Die beiden korrespondierenden ILVs (Durchmesser 50 nm) wurden in aufsteigender Distanz von 0-100 nm Abstand voneinander simuliert. Ab einer Distanz von ~40-50 nm konnten beide Vesikel unterschieden werden und es entstanden die typischen fingerartigen Strukturen (Pfeilkopf). (d) Zwei-Kanal-Bilder der Picasso Simulationen zum Vergleich mit den experimentellen GSDIM-Daten. Zusätzlich wurde aus den neun MVBs ein *Average Intensity Plot* (*Av. intensity*) erstellt. Maßstäbe: **b**, 500 nm; **c**, **d**, 250 nm.

Der Rekrutierungs-Prozess wurde demgemäß simuliert, indem rote (entsprechen Gal3) und grüne (entsprechen Tsg101) *Handles* zufällig auf der Oberfläche eines 500 nm großen Vesikels verteilt wurden (s. Abb. 3.6a). Für die dritte Phase der ILV-Biogenese

wurden die Gal3-Lokalisationen zufällig im Lumen der MVBs simuliert (s. Abb. 3.6a). Für den Abknospungs-Prozess wurde eine artifizielle spiralförmige Ordnung gewählt, bei der Gal3 in zwei korrespondierenden ILVs mit unterschiedlichen Distanzen zueinander bzw. zur MVB-Membran verteilt war (s. Abb. 3.6a). Diese Verteilung wurde dazu verwendet, die besonders schwierig einzuordnenden Strukturen der zweiten Phase bewerten zu können. Interessanterweise konnten durch diese Vorgehensweise für Distanzen zwischen ~40 und ~50 nm äquivalente Gal3-Formationen simuliert werden (s. Abb. 3.6b, c). Auch die rekonstruierten Aufnahmen der beiden anderen Phasen erlaubten eine klare Unterscheidung zwischen der Rekrutierung, Abknospung und finalen Abschnürung von Gal3 und kongruierten in verblüffender Ähnlichkeit mit den experimentellen GSDIM-Daten (s. Abb. 3.6c). Dies wurde besonders deutlich beim Vergleich der jeweiligen *Average Intensity Plots* aus der Picasso-Simulation (s. Abb. 3.6d) und den GSDIM-Daten. Darüber hinaus wurde noch eine zusätzliche Simulation für das dritte Stadium durchgeführt, in der die abgeschnürten Vesikel mit einem Durchmesser von 50 nm im Inneren der MVBs nachgebildet wurden und in zufälliger Verteilung mit Gal3 beladen waren (s. Abb. 3.7a). Auch diese Simulationen decken sich mit den experimentellen GSDIM-Daten, wenngleich die Gal3-Akkumulationen im Inneren der MVBs größer ausfielen als in den vorangegangenen Simulationen (s. Abb. 3.7b). Diese Herangehensweise bildet die GSDIM-Daten der Praxis noch besser ab.

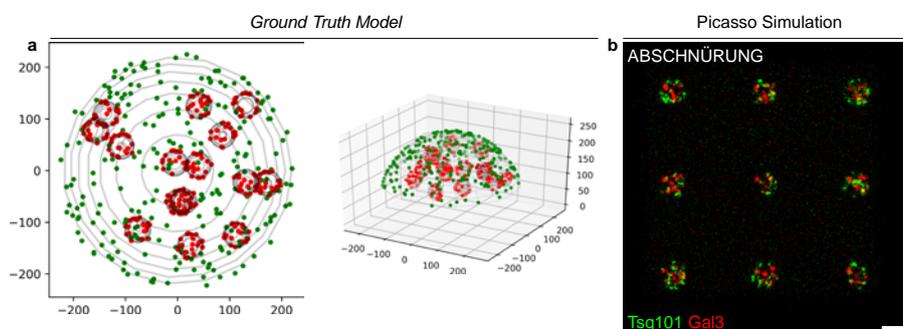


Abb. 3.7 Picasso Simulation intraluminal Gal3-Rekrutierung. Um den Prozess der Gal3-Rekrutierung noch stringenter nachzubilden, wurde zusätzlich die intraluminal Lokalisation von Gal3 in 50 nm großen ILVs simuliert. Maßstab, 500 nm.

Die simulierten Daten stützen damit die Schlussfolgerung, zusammen mit der FRC- und FWHM-Analyse, dass das erreichte, praktische Auflösungsvermögen der GSDIM ausreichte, um distinkte Phasen der Rekrutierung und Verpackung von Gal3 in ILVs abzubilden. Dadurch werden auch tieferegehende Analysen dieses Prozesses ermöglicht, was die Grundlage für spätere Versuche darstellte (s. 3.5 und 3.6).

In einem nächsten Schritt sollte nun die bisherige Ultrastruktur-Analyse der Gal3-Sortierung mit der 3D-GSDIM-Mikroskopie erweitert werden. Mithilfe dieser Methode sollte insbesondere die Knospungsphase genauer studiert werden. Auch in der 3D-GSDIM konnten Gal3-Strukturen visualisiert werden, die allen drei Phasen entsprachen (s. Appendix, Abb. 10.3 und Abb. 10.4). Die Aufnahmen zur zweiten Phase zeigten

nochmals, wie die knospenden Gal3-ILVs aus einer Markerprotein-Akkumulation heraus in das Zentrum abgeschnürt wurden (s. Appendix, Abb. 10.3b, Abb. 10.4b).

3.3.2 Elektronenmikroskopie

Da die Daten der ultrahochauflösenden Lichtmikroskopie, aufgrund der fehlenden Membran-Markierung, keinen endgültigen Nachweis der Membranvorgänge am MVB zuließen, sollten die Erkenntnisse aus der GSDIM mit der Immuno-EM untermauert werden. Dazu wurden stabil transfizierte Gal3-eGFP-MDCK-Zellen (s. Abb. 3.9a) nach der EM-Einbettung mit GFP-*Nanobodies* gefärbt, die direkt mit 15 nm großen Goldpartikeln gekoppelt waren. Tatsächlich konnten alle drei Stufen der Gal3-Sortierung, d. h. Rekrutierung, Knospung und Vesikel-Abschnürung mit dem Elektronenmikroskop detailliert abgebildet werden (s. Abb. 3.8a-c). Dass es sich dabei wirklich um eine negative Membrankrümmung bzw. reverse Abknospung vom Zytoplasma weg in das Innere des MVBs handelt, es sich dementsprechend nicht um den umgekehrten Prozess, d. h. eine Vesikelfusion mit Ausschüttung ins Zytoplasma handeln kann, beweisen die sichtbaren ESCRT-III Konstriktionsringe auf eindrucksvolle Art und Weise (s. Abb. 3.8b; vgl. dazu von Schwedler *et al.*, 2003, Morita *et al.*, 2011).

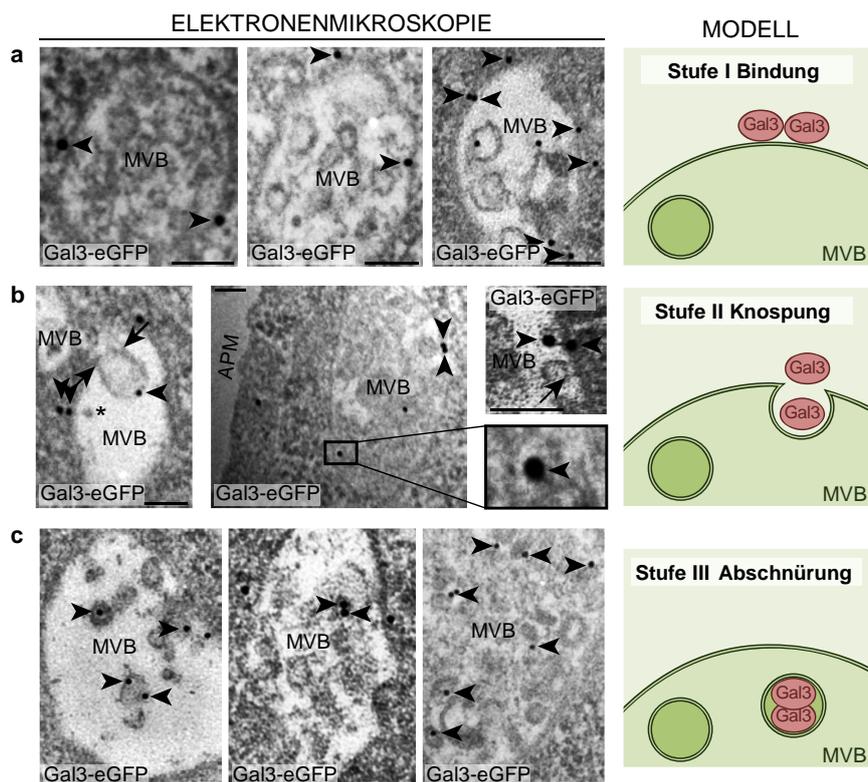


Abb. 3.8 Gal3-Rekrutierung in ILVs (Elektronenmikroskopie). Immuno-Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Gal3-eGFP exprimierenden MDCK-Zellen, die mit einem Gold-gekoppelten *Nanobody* direkt markiert wurden (Pfeilköpfe). (a-c) Gal3 konnte in jedem der drei ILV-Biogenese Stadien nachgewiesen werden. (a) Gal3-eGFP war auf der zytoplasmatischen Seite der begrenzenden MVB-Membran lokalisiert. (b) Gal3 anzeigende Gold-Partikel waren auch mit knospenden ILVs assoziiert. Links: Gal3 an der Membran eines ILVs, dessen ESCRT-III-Konstriktionsring sehr gut sichtbar war (Pfeile). Zusätzlich war ein knospendes ILV angeschnitten, das sich nicht innerhalb der fokalen Ebene befand (Sternchen). Auf der zytosolischen Seite der ILV-Basis konnte ebenfalls ein Gal3-Cluster nachgewiesen werden. Mitte und Rechts: Gal3-eGFP-Signale an dem zytosolischen Ursprung der ILV-Konstriktion und im Lumen knospender ILVs. (c) Gal3-eGFP konnte schließlich auch im Lumen abgeschnürter ILVs nachgewiesen werden. Maßstab: a-c, 100 nm. APM: Apikale Plasmamembran.

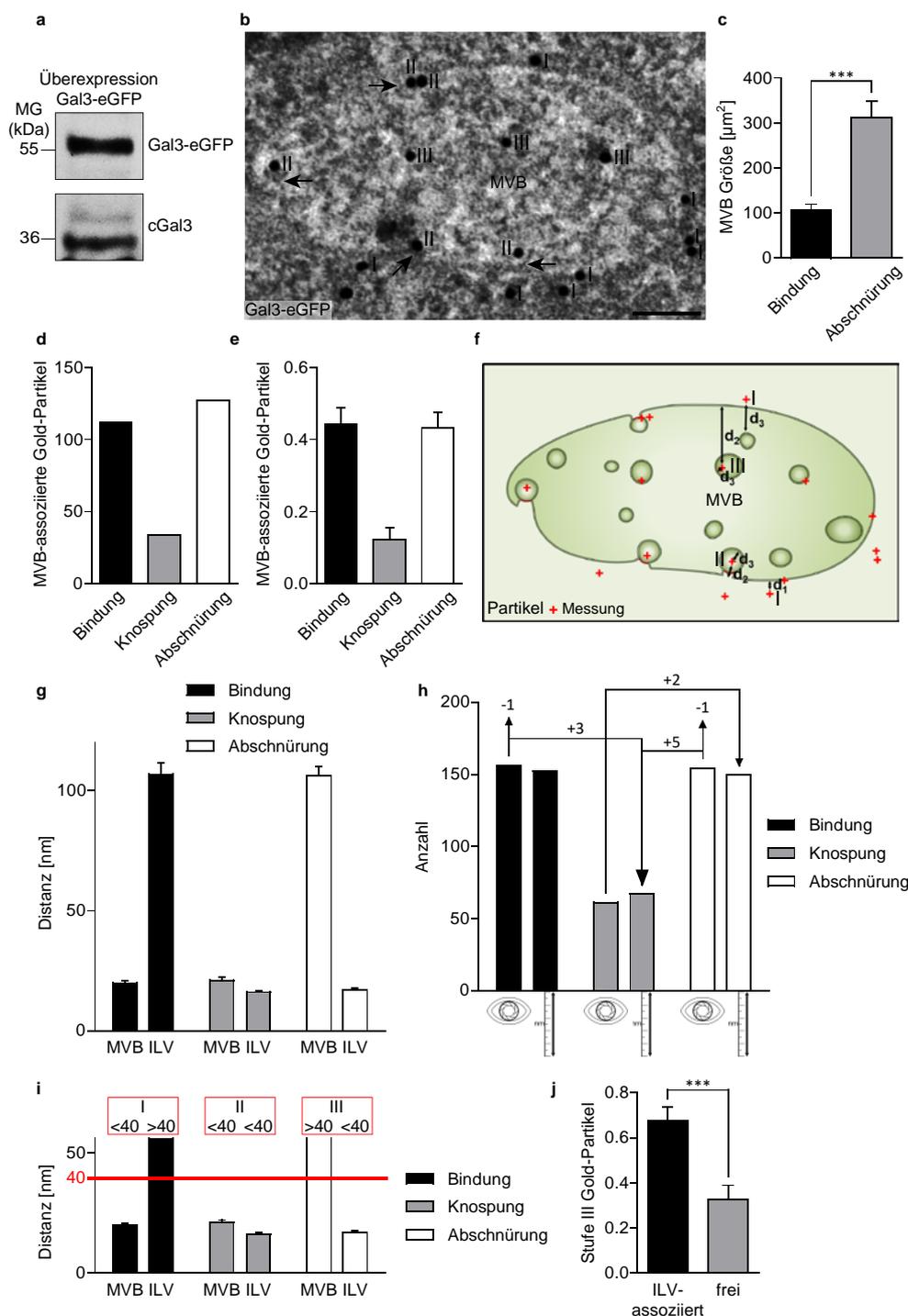


Abb. 3.9 Statistische Analyse der elektronenmikroskopischen Daten. Legende s. nächste Seite.

Im Gegensatz zur GSDIM, in der das gesamte Multivesikuläre Körperchen jeweils einer Stufe zugeordnet wurde, ist es in der TEM möglich, jeden Gal3-positiven Goldpartikel einzeln zu klassifizieren (s. Abb. 3.9b). Dadurch konnte die Gal3-Sortierung in der EM statistisch umfangreich analysiert und ausgewertet werden. Auf diese Weise konnte nachgewiesen werden, dass MVBs mit einer Mehrzahl von Phase I-Partikeln signifikant kleiner waren, als MVBs, die hauptsächlich Phase III-Partikel aufwiesen (s. Abb. 3.9c). Dies könnte darauf hindeuten, dass MVBs in der zeitlichen Abfolge größer werden und reifen, während im Lumen immer mehr Gal3 beinhalten ILVs akkumulieren.

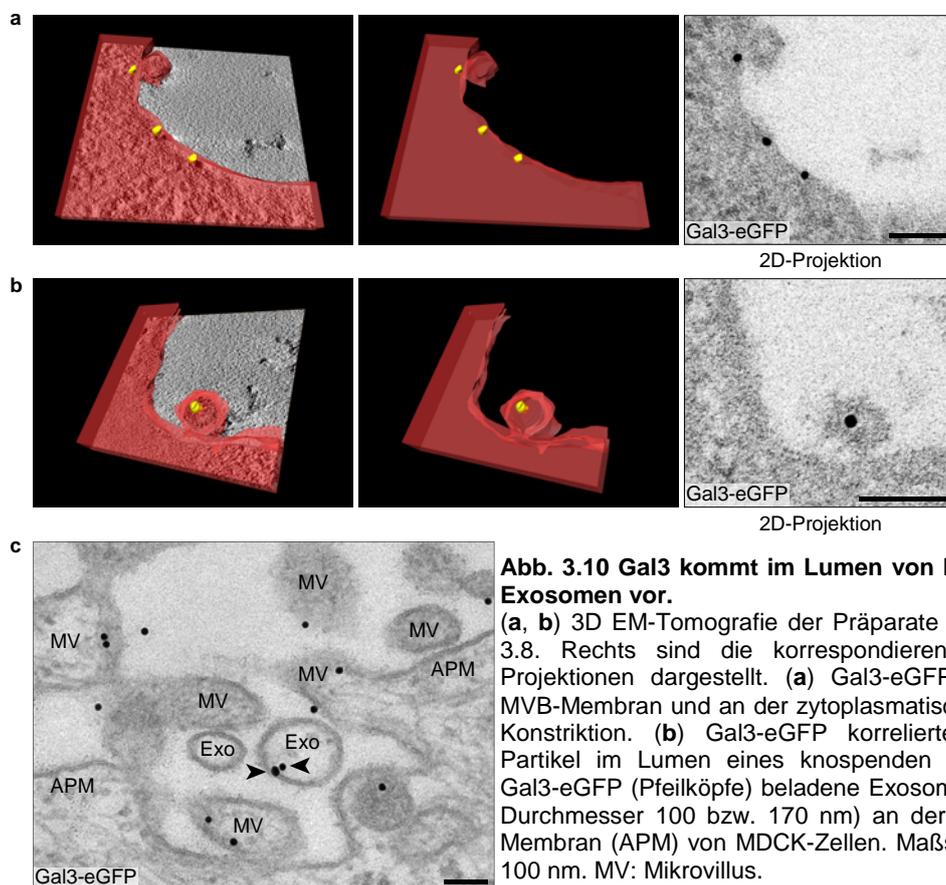
Zu Abb. 3.9 (a) Western Blot-Analyse der verwendeten Gal3-eGFP-MDCK-Zelllinie. Um das humane Gal3-eGFP und das endogene, canine Gal3 (cGal3) gleichzeitig zu markieren, wurden polyklonale Gal3-Antikörper zur Markierung benutzt. Das Verhältnis von endogenem zu Gal3-eGFP war $1:3,11 \pm 0,48$ bei $n=5$ analysierten Lysaten. (b) EM-Aufnahme eines kompletten MVBs, wobei die jeweilige Klassifizierung eines Gold-Partikels in die Rekrutierungsstadien Bindung (I), Knospung (II), Abschnürung (III) durch römische Ziffern gekennzeichnet wurde. Jedes Typ-II Partikel weist einen sichtbaren ESCRT-III-Ring auf (Pfeile). (c) Die Größe derjenigen MVBs wurde gemessen, die entweder eine Mehrzahl an kategorisierten Stufe-I-Partikeln oder aber an Stufe-III-Partikeln besaßen. Die Größe der MVBs stieg mit Anzahl an Stufe-III-Partikeln. 20 MVBs wurden ausgewertet. (d) Alle MVB-assoziierten Gold-Partikel wurden visuell kategorisiert. 273 Partikel wurden ausgewertet. (e) Die relative Menge der drei Stadien wurde pro MVB bestimmt. 46 MVBs wurden dabei analysiert. (f) Für die statistische Bewertung der (visuellen) Partikel-Einteilung wurde ein Modell aufgestellt, bei dem drei verschiedene Parameter gemessen wurden. Bei diesen Parametern handelte es sich um den Abstand des jeweiligen Partikels zur MVB-Membran (d_1 und d_2), sowie die Distanz zur ILV-Membran (d_3). Anhand dieser beiden Variablen (d_1 oder d_2 je nach Kategorie) war es möglich, quantifizierbare Parameter zur Einteilung zu verwenden. (g) Vergleich der Klassifizierung per Auge (g; stilisiertes Auge) und der Klassifizierung per Messung (stilisiertes nm Maßband; anhand der Einteilung in i). Die beiden Verteilungen waren nahezu kongruent. Die Pfeile zeigen an, wie viele Partikel jeweils neu eingruppiert werden mussten. Zwei Partikel ($d_1 > 40 \text{ nm} + d_3 > 40 \text{ nm}$; $d_2 > 40 \text{ nm} + d_3 > 40 \text{ nm}$) konnten nicht eingeteilt werden und wurden verworfen. (i) Modell für die Klassifizierung per Messung und den *Cutoff*-Bereich. Anhand der beiden Parameter (d_1/d_2 , d_3) wurde die Einteilung vorgenommen. Der *Cutoff*-Wert betrug 40 nm, d. h. ein Partikel wurde in Stadium I eingruppiert wenn die Distanz zur MVB-Membran $< 40 \text{ nm}$ und die zum ILV $> 40 \text{ nm}$, Stufe-II positiv wenn d_2 and $d_3 < 40 \text{ nm}$ und Stufe-III positiv, wenn die Distanz zur MVB-Membran (d_2) $> 40 \text{ nm}$ und zum ILV $< 40 \text{ nm}$. (j) Die der Stufe-III zugeordneten Gold-Partikel wurden auf ihre Assoziation mit ILVs untersucht. Die Mehrheit dieser Partikel war entweder im Lumen oder an der Membran der ILVs anzutreffen. Es konnten jedoch auch Partikel nachgewiesen werden, die vermeintlich frei im MVB vorkamen. 85 Stufe-III Partikel wurden ausgewertet. Maßstab: **b**, 100 nm.

Daneben konnte die per Auge vorgenommene Kategorisierung der Partikel (s. Abb. 3.9d, e) statistisch abgesichert werden, indem der Abstand der einzelnen Partikel jeweils zu den verschiedenen Membranpopulationen (MVB, Exosom) gemessen wurde (s. Abb. 3.9f). Anhand von diesen quantifizierbaren Parametern wurde eine zweite Klassifizierung vorgenommen und mit den visuell beurteilten Daten verglichen (s. Abb. 3.9g-i). Es ergab sich eine nahezu identische Verteilung für beide Vorgehensweisen. Die Stufen-I und -III wiesen eine ausgeglichene Verteilung auf, wohingegen in der Knospung befindliche Gal3-Vesikel weniger oft beobachtet werden konnten. Dies könnte darauf hinweisen, dass MVBs einen relativ langsamen Prozess der Gal3-Rekrutierung durchlaufen, gefolgt von einem relativ schnell ablaufenden *Budding*-Prozess.

Abschließend sollte statistisch erfasst werden, inwieweit Stufe-III Goldpartikel mit abgeschnürten ILVs assoziiert waren, oder ob diese frei im Lumen der MVBs vorlagen. Tatsächlich trat die überwiegende Anzahl ($67.2 \pm 6.2\%$) an Partikeln im Lumen oder an der Membran der ILVs auf (s. Abb. 3.9j). Der Anteil an Gal3-positiven Partikeln, der nicht mit ILVs korrelierte, könnte zum einen auf der sehr geringen Schichtdicke der Ultradünnschnitte und dem daraus resultierenden Ausschluss angrenzender Bereiche beruhen, oder zum anderen auf endozytiertem, endosomalen Gal3, das zu einem gewissen Anteil späte Endosomen und damit auch MVBs erreichen könnte.

Schließlich sollten diese Erkenntnisse, analog zur 3D-GSDIM, durch eine morphologische Analyse der räumlichen Verteilung von Gal3 überprüft werden. Dazu wurden, in Zusammenarbeit mit der AG Maier (Marburg), 3D-Tomographien der EM-Schnitte angefertigt. Diese Technik eignet sich besonders für die Analyse der Verteilung

von Gal3 innerhalb der ILVs und erlaubt damit eine noch stringenter Bewertung der Gal3-Lokalisation während der ILV-Biogenese. Es konnten mithilfe der 3D-Analyse alle drei Phasen der ILV-Biogenese abgebildet werden, wobei Gal3-positive Goldpartikel wie in der TEM an der MVB-Membran, direkt an der Membrankonstriktion und schließlich im Lumen eines knospenden ILVs nachgewiesen werden konnten (s. Abb. 3.10a, b).



Das finale Stadium, die Fusion des MVBs mit der Plasmamembran und die Freisetzung der Gal3-beladenen Exosomen, konnte ebenfalls mit der TEM visualisiert werden (s. Abb. 3.10c, b vgl. dazu Möbius *et al.*, 2003). Kurzum, die Daten aus der Elektronenmikroskopie und der 3D-Tomographie stehen im Einklang mit den Beobachtungen aus der GSDIM und stützen die Theorie, dass Gal3 in ILVs rekrutiert, verpackt und schließlich innerhalb von Exosomen sekretiert wird. Ein Prozess, der möglicherweise durch die Interaktion mit den für diesen Sortierprozess essenziellen Komponenten des ESCRT-Komplexes induziert werden könnte (vgl. GSDIM-Kokalisationen Abb. 3.4).

3.4 Gal3 interagiert direkt mit Tsg101

Um diese These zu evaluieren und um die Bestandteile des Sortiermechanismus aufzuklären, wurde eine Ko-Immünpräzipitation von Gal3-eGFP durchgeführt (GFP-Pull-down 2.10.4). Dazu wurden die besonders effektiven eGFP-Nanobody-Trap Beads verwendet. Diese Beads ermöglichten die sehr sensitive Identifikation möglicher Bindepartner von Gal3, die die Rekrutierung und Sortierung in ILVs initiieren könnten.

Tatsächlich konnte mit Tsg101 als ESCRT-I-Untereinheit eine Komponente des ESCRT-Komplexes als neuer, bisher noch nicht beschriebener Bindepartner von Gal3 identifiziert werden (s. Abb. 3.11a). Auch das ESCRT-assoziierte Protein Alix wurde, wenn auch schwach, kopräzipitiert. Die Interaktion von Alix und Gal3 ist bereits beschrieben worden (Chen *et al.*, 2009, Liu *et al.*, 2012, Wang *et al.*, 2014). Die hier beobachtete Interaktion könnte allerdings theoretisch auch auf indirekten Effekten beruhen, da Alix und Tsg101 untereinander selbst über eine PSAP-Domäne interagieren (s. 1.5). Dieser Effekt konnte jedoch später mithilfe von *in vitro* Experimenten ausgeschlossen werden (siehe unten). Als Positiv-Kontrolle fungierte Mac2bp, dessen Bindung an Gal3 schon lange bekannt ist (Inohara & Raz, 1994). GAPDH bildete die Negativ-Kontrolle, um auszuschließen, dass lösliche Proteine von Gal3 oder evtl. auch eGFP unspezifisch gebunden wurden. Durch die Hinzugabe von 3 mM des bifunktionellen Proteinvernetzers DTSSP konnte die nachgewiesene Proteininteraktion zwischen Gal3 und Tsg101 verstärkt bzw. stabilisiert werden. Auch die präzipitierte Menge der beiden anderen Bindepartner Alix und Mac2bp wurde durch DTSSP erhöht. Durch einen komplementären Versuchsaufbau mit Tsg101-eGFP exprimierenden MDCK-Zellen (Morita *et al.*, 2007) sollten diese Ergebnisse validiert werden (s. Abb. 3.11b). Tatsächlich wurde Gal3 in Anwesenheit von Tsg101-eGFP kopräzipitiert. Beide GFP-Pull-downs wurden nochmals überprüft, indem nicht-gekoppeltes eGFP-Protein allein exprimiert und auf eine etwaige Kopräzipitation getestet wurde (s. Abb. 3.11d). Eine unspezifische Interaktion von Gal3 oder Tsg101 mit eGFP konnte damit ausgeschlossen werden. Zusätzlich bestätigte dieses Experiment jedoch auch, dass die Funktion der Cluster-Bildung bzw. Homo-Oligomerisierung in Gal3-eGFP nicht beeinträchtigt war, da neben Tsg101 auch endogenes, canines Gal3 kopräzipitiert wurde. Dieses Ergebnis ist wichtig, da viele Experimente dieser Arbeit, wie auch z. B. die Elektronenmikroskopie und 3D-Tomographie, auf der Verwendung von humanem Gal3-eGFP basierten. Um im Gegenzug ebenso die physiologische Funktion der C-terminalen CRD zu überprüfen, wurde ein Pull-down mit Laktose-gekoppelten Beads durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Zucker-Bindung in eGFP gekoppeltem Gal3 tadellos funktioniert, da neben endogenem Gal3 (cGal3) eben auch Gal3-eGFP gebunden wurde (s. Abb. 3.11e). Im Vergleich zum Lysat wurde sogar signifikant mehr Gal3-eGFP als cGal3 aufgereinigt (s. Abb. 3.11f). Zusätzlich konnte, aufgrund des geringeren Molekulargewichtes, eine geringe Menge an humanem Gal3 (hGal3) nachgewiesen werden, das höchstwahrscheinlich von eGFP abgetrennt worden war. Diese Ergebnisse stehen zudem im Einklang mit Studien, die ein reguläres Verhalten von Gal3-eGFP im intrazellulären Transport dokumentieren konnten (Delacour *et al.*, 2007).

Mithilfe des Laktose-Pull-downs sollte jedoch noch eine weitere Fragestellung beantwortet werden: Kürzlich konnte eine Studie aufzeigen, dass die Interaktion einer zytoplasmatischen Lysyl-tRNA-Synthetase mit Syntenin-1 in einer exosomalen Sekretion resultiert (Kim *et al.*, 2017). Aus diesem Grund wurde untersucht, ob eine evtl. Interaktion zwischen Gal3 und Syntenin-1 vorlag (s. Abb. 3.11e). Dies scheint jedoch in MDCK-Zellen nicht der Fall zu sein, da dafür im Laktose-Pull-down keine Evidenzen gefunden werden konnten.

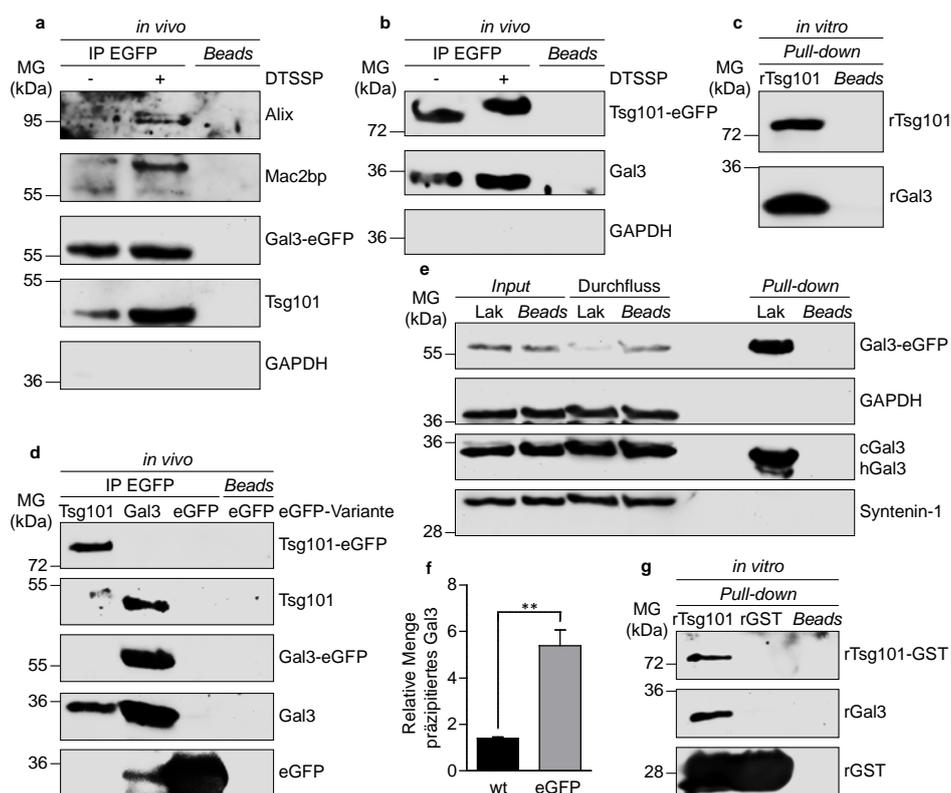


Abb. 3.11 Gal3 interagiert mit der ESCRT-I-Untereinheit Tsg101. (a) Ko-Immünpräzipitation von Gal3-eGFP mithilfe der GFP-Nanobody-Trap. Tsg101 wurde als neuer Bindepertner identifiziert. Als Positiv-Kontrolle einer erfolgreichen Ko-IP diente Mac2bp und Alix, wohingegen GAPDH als Negativ-Kontrolle eingesetzt wurde. Zusätzlich wurde der unspezifische *Crosslinker* DTSSP verwendet, der die Interaktion verstärkte. *Beads*: Verwendete Agarose-Beads ohne *Nanobody*. (b) Der komplementäre Ansatz, mit Tsg101-eGFP als an die stationäre Phase gekoppelte „Beute“ resultierte ebenfalls in einer Präzipitation von Gal3. (c) Durch einen *in vitro* Pull-down mit rekombinantem Gal3 und Tsg101 (rGal3, rTsg101) sollte untersucht werden, ob es sich bei der Interaktion um eine direkte Bindung handelt. Tsg101-GST fungierte mit Glutathion-Sepharose als stationäre Phase. Es wurden $n=4$ unabhängige Experimente durchgeführt. *Beads*: Ungekoppelte Glutathion-Sepharose-Beads. (d) Kontrolle der *in vivo* eGFP-Pull-downs in a und b. Dazu wurden Gal3-eGFP und Tsg101-eGFP, sowie ungekoppeltes eGFP exprimierende Zellen einer GFP-Ko-IP unterzogen. Eine unspezifische Bindung von Tsg101 oder Gal3 an das ungekoppelte eGFP konnte dadurch ausgeschlossen werden. Zu beachten ist darüber hinaus, dass endogenes, canines Gal3 mit dem humanen Gal3-eGFP interagiert und dadurch kopräzipitiert wird. Dies verdeutlicht, dass Gal3-eGFP seine physiologische Fähigkeit der Oligomerisierung behalten hat. (e) Um neben der Oligomerisierung auch die unbeeinträchtigte Zucker-Bindung von Gal3-eGFP zu bestätigen, sowie eine mögliche Interaktion mit Syntenin-1 zu untersuchen, wurde zusätzlich ein Pull-down mithilfe von Laktose-Beads (Lak) durchgeführt. (f) Quantifizierung der Ergebnisse aus Experimenten wie in e. Tatsächlich wurde Gal3-eGFP noch stärker als das canine Gal3 von Laktose gebunden. (g) Überprüfung des *in vitro* Pull-downs mit ungekoppeltem GST. Eine unspezifische Bindung von rGal3 konnte dadurch ausgeschlossen werden. hGal3: Von eGFP entkoppeltes humanes Gal3.

Da allen vorherigen *in vivo* Experimenten, durch die Verwendung von Zelllysaten, auch indirekte Interaktionen zugrunde liegen bzw. nicht ausgeschlossen werden können (s. oben), wurden anschließend *in vitro* Interaktionsstudien mit aufgereinigten,

rekombinanten Proteinen (rGal3 und rTsg101-GST) durchgeführt (s. 2.10.6). Dazu wurde an Glutathion-*Beads* gebundenes rTsg101-GST als stationäre Phase verwendet und mit 1,5 μ M rGal3 inkubiert. Tatsächlich wurde rGal3 durch rTsg101-GST immobilisiert (s. Abb. 3.11c), was einen deutlichen Beweis für eine direkte Interaktion der beiden Proteine darstellt. Da diese Erkenntnis von zentraler Bedeutung war, wurde ein zusätzliches *Pull-down*-Experiment mit ungekoppeltem GST-Protein (rGST) als Kontrolle durchgeführt (s. Abb. 3.11g). Eine unspezifische Wechselwirkung zwischen rGal3 und dem äußerst stark präzipitierten GST konnte ausgeschlossen werden.

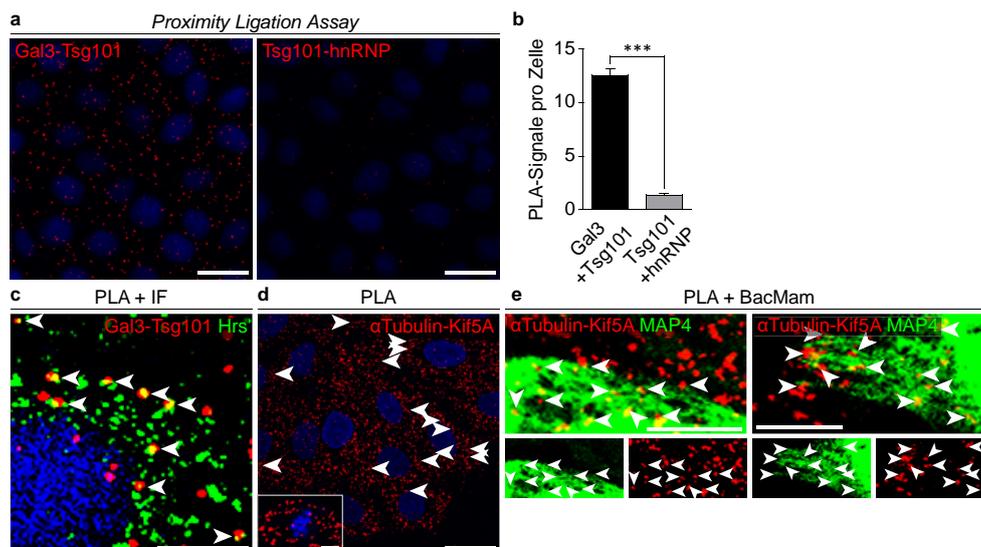


Abb. 3.12 Proximity Ligation Assay von Gal3 und Tsg101. (a) MDCK-Zellen wurden einem PLA unterzogen und im KLSM ausgewertet. Bei der Verwendung von Primärantikörpern gegen Gal3 und Tsg101 konnte eine Vielzahl von PLA-Signalen detektiert werden, die die physikalische Nähe beider Proteine (<40 nm) anzeigten. Bei der Negativ-Kontrolle bestehend aus Tsg101 und dem im Nucleus lokalisierten hnRNP zeigten sich dagegen kaum Signale. (b) Quantifizierung der identifizierten PLA-Signale pro Zelle. Es wurden je Experiment ($n=3$) 10-15 Zellen ausgewertet. (c) Um sicherzustellen, dass die Interaktion auch an MVBs stattfand, wurde der PLA mit einer Immunfluoreszenz gegen Hrs kombiniert. Viele der PLA-Signale kolokalisierten mit Hrs (Pfeilköpfe). Dieser Versuch wurde jedoch nur einmal ($n=1$) durchgeführt. (d) Als Positiv-Kontrolle diente das Pärchen α Tubulin und Kif5A. Die PLA-Signale erschienen dadurch perlschnurartig entlang der Mikrotubuli. Die Einfügung illustriert den Spindelapparat in der Metaphase. (e) Um diese Erkenntnisse abzusichern, wurde mithilfe von einer durch Baculoviren induzierten MAP4-eGFP Gen-Transduktion das Mikrotubuli-Skelett der Zellen gegengefärbt. Die PLA-Signale konnten mit einzelnen Mikrotubuli korreliert werden. Maßstab: a, d, 25 μ m; c, 10 μ m; Einfügung, e, 5 μ m.

Zusätzlich wurde die direkte Bindung von Gal3 an Tsg101 durch einen PLA abgesichert. Dieser Assay erlaubt es, die physikalische Nähe zweier Proteine (unter 40 nm) im Mikroskop darzustellen. Es zeigte sich, dass im Gegensatz zur Negativ-Kontrolle, bestehend aus Tsg101 und dem im Nukleus vorhandenen hnRNP, eine hohe Dichte an PLA-Signalen zwischen Gal3 und Tsg101 detektiert werden konnte (s. Abb. 3.12a). Aus der nachfolgenden Quantifizierung der PLA-Signale pro Zelle geht hervor, dass bei der Verwendung von Gal3 und Tsg101-Primär-Antikörpern eine signifikant höhere Anzahl an PLA-Signalen vorlag als in der Kontrolle (s. Abb. 3.12b). In einem weiteren Experiment sollte bestimmt werden, ob die Interaktion auch an den relevanten Lokalisationen, den MVBs, stattfand. Dazu wurde der PLA mit einer konventionellen Immunfluoreszenz-Färbung kombiniert. Dadurch konnte visualisiert werden, dass die

Mehrzahl der PLA-Signale mit dem MVB-Markerprotein Hrs kolokalisierten (s. Abb. 3.12c). Da der PLA durch das punktuelle Erscheinungsbild schwer zu überprüfen und fehleranfällig ist, wurden mehrere Positiv-Kontrollen an die Experimente angeschlossen. Dafür wurden Kontrollen gewählt, aus deren Struktur heraus eine klare Bewertung der einwandfreien Funktion möglich war. Aus diesem Grund wurde das Interaktions-Pärchen α Tubulin und Kif5A gewählt, die es ermöglichten die perlschnurartigen Interaktionen auf den Mikrotubuli darzustellen (s. Abb. 3.12d). Interessantweise war es sogar möglich, den Spindelapparat einer mitotischen Zelle in Metaphase zu visualisieren. Um ganz sicher zu gehen, wurde als Gegenfärbung zusätzlich noch MAP4-eGFP mittels Baculovirus induzierter Gen-Transduktion exprimiert, was die bereits offensichtliche Spezifität der PLA-Methode nochmals unterstrich (s. Abb. 3.12e).

3.5 Der *Knockdown* von Tsg101 führt zu einer verringerten Gal3-Sekretion

Um zu untersuchen, ob die Interaktion mit Tsg101 verantwortlich für die exosomale Sekretion von Gal3 ist, wurde ein siRNA-vermittelter Tsg101-*Knockdown* in MDCK-Zellen etabliert (s. Abb. 3.13a, c). Anschließend wurde das Kulturmedium dieser Zellen über Nacht gesammelt und mittels Western Blot analysiert (s. Abb. 3.13b). Eine Quantifizierung der gewonnenen Daten offenbarte, dass die Menge an sekretiertem Gal3 signifikant abnahm, im Gegenzug aber der intrazelluläre Anteil anstieg (s. Abb. 3.13d, e). Dies zeigt, dass der allergrößte Anteil an sekretiertem Gal3 auf einem funktionierenden ESCRT-I-Komplex angewiesen ist und damit der hauptverantwortliche Gal3-Sekretionsmechanismus in MDCK-Zellen auf Exosomen basieren könnte. Tatsächlich wurde der sekretierte, exosomale Anteil von Gal3 durch die Applikation von Tsg101-siRNA drastisch reduziert (s. Abb. 3.13f, g). Erstaunlicherweise trifft dies nicht auf das exosomale Markerprotein Alix zu, das nahezu unverändert in der exosomalen Fraktion nachgewiesen werden konnte (s. Abb. 3.13h). Dieser Befund ist angesichts der tiefgreifenden Veränderungen des endosomalen Kompartiments nach einer erfolgten Tsg101-Depletion überraschend (Doyotte *et al.*, 2005). Aufgrund neuerer Studien, die eine feine Differenzierung der jeweiligen Aufgaben einzelner ESCRT-Komponenten erlauben, erscheint die Wirkung eines Tsg101-*Knockdowns* jedoch in einem ganz anderen Licht. Es zeigte sich, dass Tsg101 mehr für das *Targeting*, d. h. für die Rekrutierung und Sortierung von exosomalen Cargoproteinen in ILVs verantwortlich ist (Colombo *et al.*, 2014). Tatsächlich verändert ein Tsg101-*Knockdown* den Proteingehalt in Exosomen, sowie die allgemeine (Protein-) Zusammensetzung von Exosomen. Der gegenteilige Effekt der Tsg101-Depletion auf Alix bzw. Gal3 ist deshalb, insbesondere in Hinblick auf den Mechanismus der exosomalen Sekretion, sehr interessant, da zwar das ESCRT-assoziierte Alix noch in Exosomen auftaucht, Gal3 als Cargoprotein aber auf die Verpackung durch den zentralen Sortierrezeptor Tsg101 essenziell angewiesen

zu sein scheint. Die hier gewonnenen Erkenntnisse decken sich zudem mit anderen Arbeiten, die zeigen konnten, dass gleichzeitig verschiedene Subpopulationen von MVBs bzw. Exosomen in einer Zelle vorkommen (White *et al.*, 2006, Buschow *et al.*, 2009, Bobrie *et al.*, 2012).

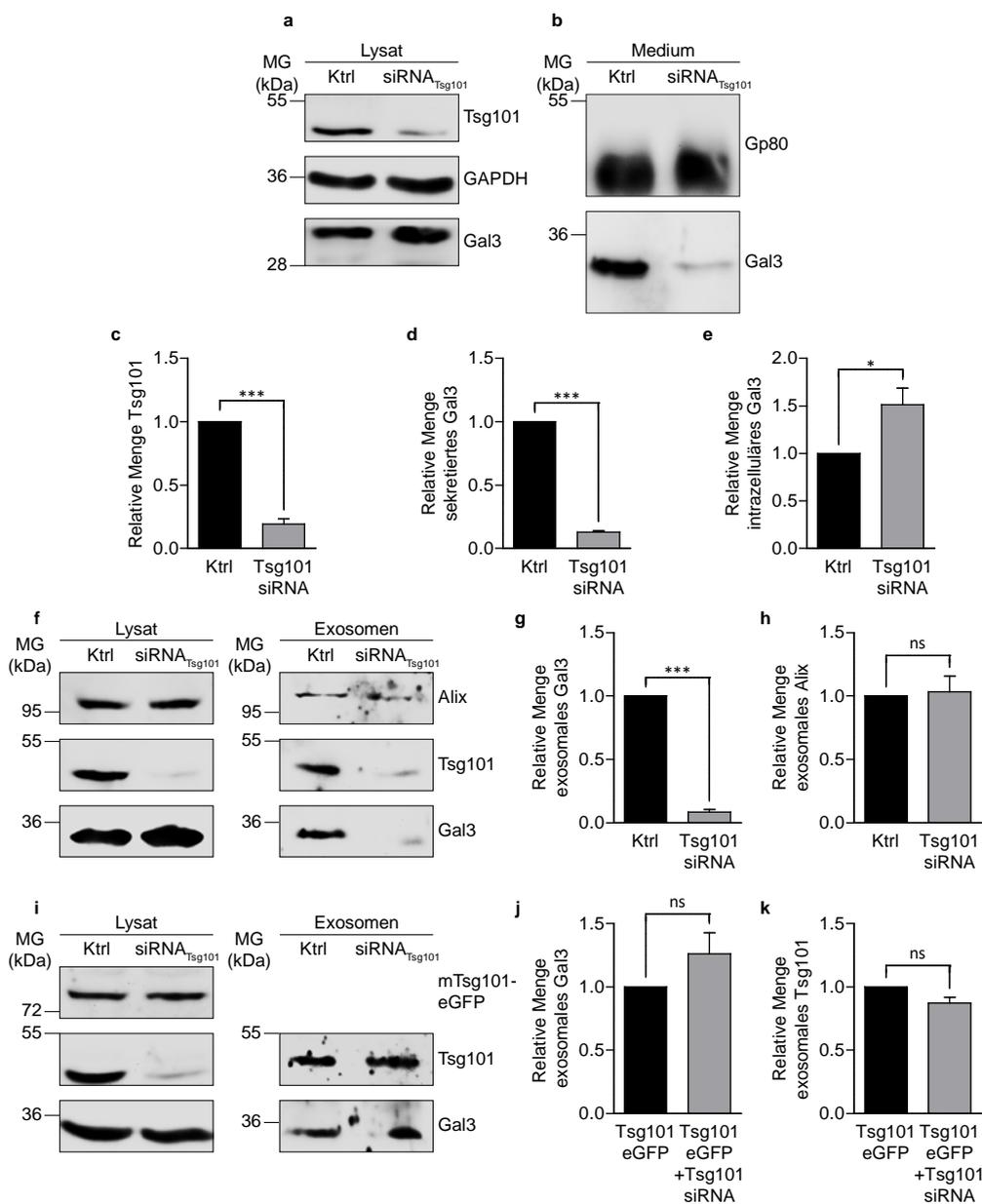


Abb. 3.13 Der Knockdown von Tsg101 reduziert die exosomale Gal3-Sekretion. (a, b) Tsg101 wurde mithilfe von siRNA in MDCK-Zellen depletiert und das dazugehörige Zellkulturmedium über Nacht gesammelt. Lysat (a) und Medium (b) wurden schließlich im Western Blot analysiert. (c) Die Effizienz des Tsg101-Knockdowns wurde mithilfe einer Quantifizierung belegt. Die Zellviabilität wurde durch Trypanblau Exklusion bestimmt und betrug $96,33 \pm 0,88\%$ in der Kontrolle, sowie $97,33 \pm 0,33\%$ in den Knockdown-Zellen. (d) Durch den Knockdown von Tsg101 sank die sekretierte Menge an Gal3 im Medium. (e) Die Menge an intrazellulärem Gal3 stieg hingegen signifikant an, was auf eine Akkumulation von Gal3 hindeuten könnte. (f) Analog zu den vorangegangenen Experimenten wurde nun eine Exosomen-Präparation in Tsg101-depletierten Zellen durchgeführt. Als exosomale Markerproteine dienten Alix und Tsg101 selbst. (g) Die Quantifizierung der Ergebnisse aus f verdeutlicht, dass die Menge an exosomalem Gal3 dramatisch abnahm. (h) Die exosomale Sekretion von Alix schien jedoch nicht durch einen Tsg101-Knockdown beeinträchtigt zu sein. (i-k) Sog. Rescue-Assay zur Überprüfung der vorangegangenen Experimente. Die Variante mTsg101-eGFP besitzt eine mutierte siRNA-Bindestelle und wurde stabil in MDCK-Zellen exprimiert. Die analoge Vorgehensweise wie in f zeigte, dass mTsg101-eGFP in der Lage war, den Knockdown des endogenen Tsg101 funktionell auszugleichen und die exosomale Sekretion von Gal3 (j) und endogenem Tsg101 (k) wiederherzustellen.

Um den Zusammenhang zwischen der Tsg101-Depletion und einer verminderten exosomal Sortierung von Gal3 abzusichern, wurden sog. *Rescue*-Experimente durchgeführt. Dazu wurde eine besondere Variante von Tsg101 überexprimiert, die nicht in der Lage war, mit der verwendeten siRNA zu hybridisieren: Tsg101-eGFP, dessen siRNA-Bindestelle mutiert (mTsg101-eGFP) und dadurch unzugänglich gemacht wurde. Aufgrund der Redundanz des genetischen Codes war es jedoch möglich, die Aminosäure-Sequenz zu bewahren. Die adventive Überexpression von mTsg101-eGFP kompensierte tatsächlich den *Knockdown* des endogenen, caninen Tsg101, was sich in der unverminderten Menge an exosomalem Gal3 ausdrückte (s. Abb. 3.13i, j). Interessanterweise wurde durch die Überexpression der Anteil des endogenen, caninen Tsg101 in der exosomalen Fraktion ebenfalls ausgeglichen (s. Abb. 3.13k), was nochmals verdeutlicht, dass mTsg101-eGFP funktionell aktiv für eine physiologische Exosomenfreisetzung sorgte.

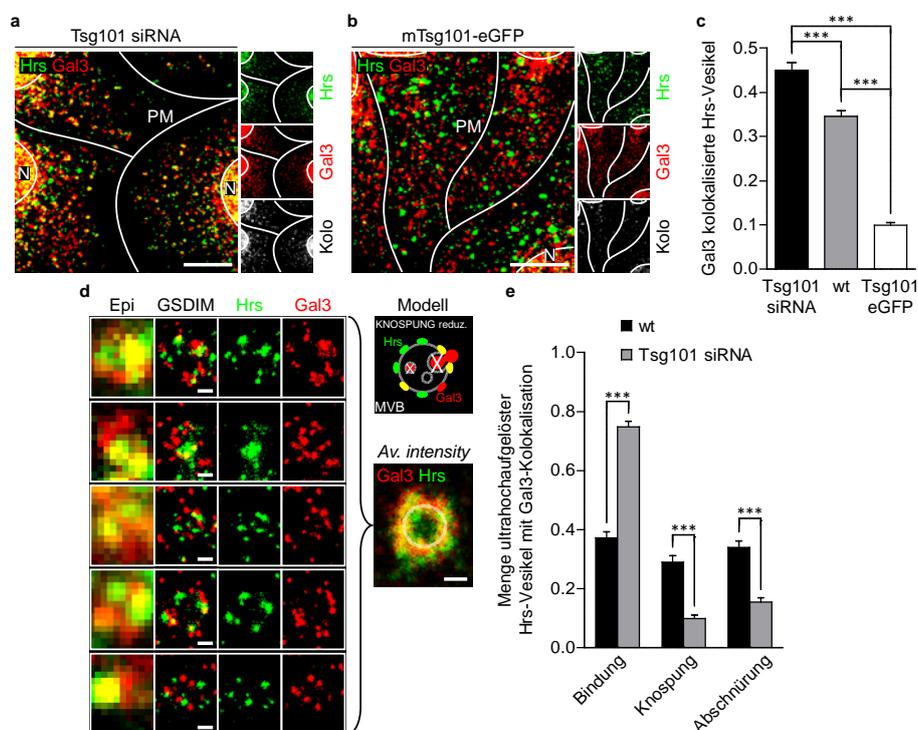


Abb. 3.14 Der *Knockdown* von Tsg101 führt zu einer intrazellulären Akkumulation von Gal3. (a) MDCK-Zellen wurden mit siRNA gegen Tsg101 behandelt, anschließend mittels Immunfluoreszenz-färbung gegen Gal3 und Hrs markiert und schließlich im KLSM ausgewertet. (b) Stabil transfizierte mTsg101-eGFP-MDCK-Zellen wurden ebenfalls gegen Hrs und Gal3 gefärbt. (c) Die Quantifizierung der Daten aus **a**, **b** und **Abb. 3.2 a** zeigt, dass der Anteil kolokalisierte Vesikel in Tsg101-*Knockdown*-Zellen am höchsten war, in Tsg101 überexprimierenden Zellen hingegen, wie mTsg101-eGFP, dieser Anteil jedoch deutlich reduziert ist. Die Quantifizierung der Kokalisation wurde wie in **Abb. 3.2** vorgenommen. 15-20 Zellen wurden jeweils analysiert. (d) Die Akkumulation und die fehlende Rekrutierung in das Innere der MVBs ließen sich durch die ultrahochauflösende GSDIM darstellen. Dazu wurden die Zellen wie in **a** behandelt und gefärbt. Durch die Überlagerung von 35 Einzelbildern in dem *Average Intensity Plot* (*Av. intensity*) wird besonders deutlich, dass sich Gal3 am Rand der MVBs ansammelte und keine Abschnürung in das Lumen der MVBs stattfand. Die gestrichelte Linie besitzt einen Durchmesser von 450 nm und entspricht damit einer idealisierten MVB-Membran. (e) Zur statistischen Auswertung dieses Prozesses wurden die einzelnen MVBs kategorisiert und mit den Verhältnissen in unbehandelten Zellen verglichen. Der *Knockdown* von Tsg101 verschob das nahezu ausbalancierte Verhältnis der drei Rekrutierungsstadien stark in Richtung Stufe-I, d. h. es konnten nur sehr wenige MVBs beobachtet werden, die Stufe-II oder -III entsprachen. Maßstab: **a**, **b**, 10 μ m; **d**, 250 nm. PM: Plasmamembran; N: Nucleus; Kolo: Kokalisationkanal.

Die funktionelle Rolle von Tsg101 in der exosomalen Rekrutierung von Gal3, deren Beschreibung bisher auf biochemischen Analysen beruhte, sollte anschließend durch mikroskopische Arbeiten gestützt werden. Insbesondere sollte eine mögliche Akkumulierung von Gal3 an MVBs untersucht werden, die als Indikator einer gestörten Sortierung dienen könnte. Dazu wurde analog ein Tsg101-*Knockdown* durchgeführt, die Zellen anschließend einer Immunfluoreszenzfärbung gegen Gal3 und Hrs unterzogen und schließlich im KLSM ausgewertet (s. Abb. 3.14a). Dabei zeigte sich im Vergleich zu unbehandelten Zellen eine signifikant erhöhte Kolokalisation zwischen Gal3 und Hrs in denjenigen Zellen, die mit siRNA gegen Tsg101 behandelt wurden (s. Abb. 3.14c). Im Gegensatz dazu war die Kolokalisation beider Proteine in Tsg101-überexprimierenden Zellen deutlich vermindert (s. Abb. 3.14b, c). Um tiefere Einblicke in den Prozess der Depletions-bedingten Akkumulation von Gal3 zu gewinnen und um die genaue Lokalisation dieser Gal3-Anhäufung zu überprüfen, wurden in einem analogen Versuchsaufbau GSDIM-Aufnahmen der einzelnen Hrs-markierten MVBs angefertigt (s. Abb. 3.14d). Diese zeigten, dass Gal3 mit den Markerprotein-Ansammlungen kolokalisierte, was einen deutlichen Hinweis für eine Akkumulierung außerhalb der MVBs bzw. an der begrenzenden MVB-Membran darstellt. Die fehlende Inkorporierung in das Innere der MVBs wird insbesondere durch den aus 35 Einzelbildern berechneten *Average Intensity Plot* veranschaulicht, bei dem Gal3 und Hrs an der äußeren Grenze (stilisiert durch die gestrichelte Linie mit 450 nm Durchmesser) der MVBs kolokalisierten. Im Vergleich zu der progressiven Rekrutierung in das Innere der MVBs in unbehandelten Wildtyp-Zellen (s. 3.3.1), wird klar, dass die Gal3-Sortierung durch die Tsg101-Depletion stark beeinträchtigt wurde. Dies konnte auch quantitativ untersucht werden, indem die verschiedenen MBVs klassifiziert und die ermittelten Anzahlen mit unbehandelten Zellen verglichen wurden (s. Abb. 3.14e). Der Anteil der einzelnen MVB-Klassifizierungen war in unbehandelten Zellen relativ ausgeglichen, wohingegen in Tsg101-depletierten Zellen $74,9 \pm 1,8\%$ der MVBs der ersten Stufe, d. h. der Membran-Bindung, entsprachen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Verpackung von Gal3 in ILVs bzw. Exosomen durch einen Tsg101-*Knockdown* stark beeinträchtigt wurde und, dass Gal3 infolge dieser Depletion höchstwahrscheinlich an der Membran der MVBs akkumulierte. Indes kann man davon ausgehen, gepaart mit den KLSM-Daten, dass Gal3 trotz der Abwesenheit des Bindepartners Tsg101 noch immer an die MVBs rekrutiert wird. Dies könnte darauf hinweisen, dass Gal3, neben Tsg101, noch mit weiteren ESCRT-Proteinen interagiert. Der Hauptkandidat dafür könnte Alix sein, dessen Interaktion mit Gal3 schon beschrieben wurde (s. 3.4).

3.6 Die dominant-negative Vps4a^{E228Q}-Mutation inhibiert die Gal3-Sekretion

Um zu prüfen, ob die exosomale Sekretion von Gal3 auf einem funktionierenden ESCRT-Superkomplex angewiesen war, wurde eine stabile Zelllinie etabliert, die über eine induzierbare Vps4a^{E228Q}-eGFP-Expression verfügte (Bishop & Woodman, 2000).

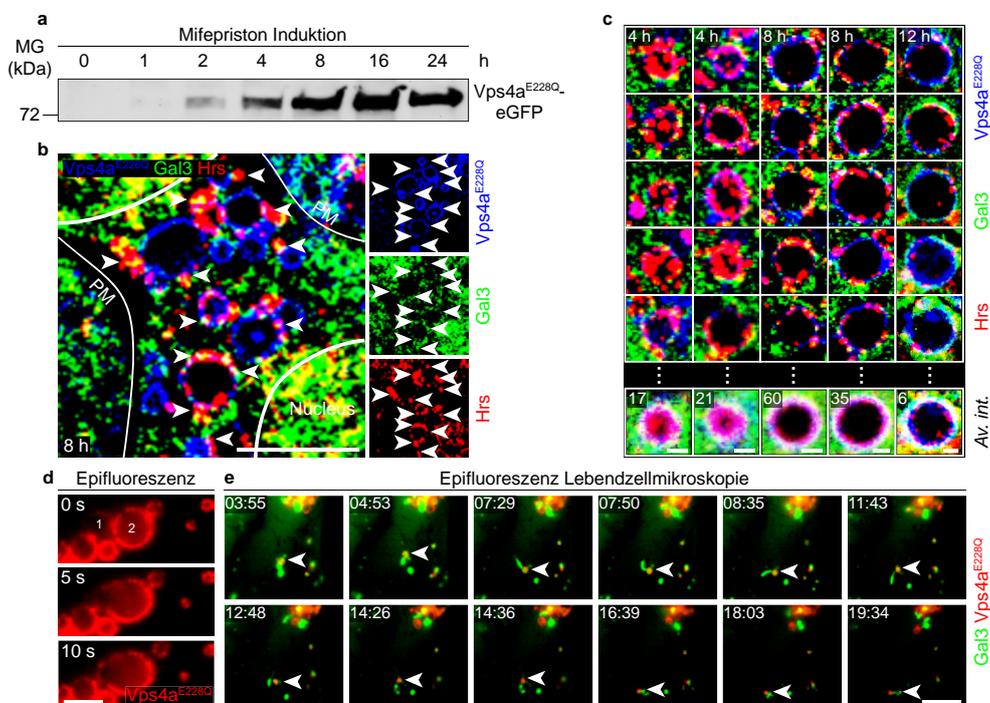


Abb. 3.15 Die dominant-negative Mutation von Vps4a führt zu einer Akkumulation von Gal3 (I). (a) Durch die Behandlung mit 10 nM Mifepriston wird die Expression von Vps4a^{E228Q}-eGFP innerhalb kurzer Zeit induziert. Nach zwei Stunden ist kann das Fusionsprotein im Lysat gut nachgewiesen werden. (b) Nach acht-stündiger Mifepriston-Behandlung wurden die Zellen fixiert, eine Immunfluoreszenz gegen Gal3 und Hrs durchgeführt und anschließend im KLSM ausgewertet. Gal3 akkumulierte perlschnurartig auf der MVB-Membran (Pfeilköpfe), die durch Vps4a^{E228Q}-eGFP sichtbar wurde. (c) Einzelne MVBs wurden benutzt, um *Average Intensity Plots* (*Av. int.*) zu berechnen. Die Zeitdauer der Mifepriston-Behandlung wurde stets angegeben. Die Anzahl der verwendeten MVBs wurde ebenfalls im Plot eingezeichnet. Für die beiden Zeitpunkte 4 h und 8 h wurden zwei unterschiedliche MVB-Größen benutzt. Gal3 kolokalisierte am Rand der MVBs (weiße Dreifach-Kolokalisation). Weiter innen kolokalisierten nur Hrs und Vps4a^{E228Q}-eGFP. (d) Die stabile Zelllinie Vps4a^{E228Q}-eGFP/Gal3-mCherry erlaubte die Analyse der dynamischen Vorgänge in der lebenden Zelle. Die vergrößerten MVBs fusionierten zu immer größeren Strukturen (MVB 1 und 2 wurden markiert). (e) Mithilfe dieser Zelllinie konnte die Akkumulation von Gal3 auf der MVB-Membran live beobachtet werden (das MVB ist durch Pfeilköpfe markiert). Einige Gal3-Akkumulationen erinnerten dabei sogar an flexible Filamente (Pfeilkopf). Die relative Zeitdauer der Beobachtung ist angegeben. Maßstäbe: b, 10 µm; c, 2 µm; d, 3 µm; e, 8 µm. Zeitangaben in e: min, s. PM: Plasmamembran.

Durch die Applikation von 10 nM Mifepriston konnte in dieser Zelllinie innerhalb kurzer Zeit die AAA-ATPase Vps4 (s. 1.5.5) dominant-negativ inhibiert werden. Vps4 ist essenziell für die ILV-Biogenese und das Recycling der ESCRT-III-Untereinheiten. Bereits nach zwei Stunden war Vps4a^{E228Q}-eGFP im Western Blot nachweisbar (s. Abb. 3.15a). Daraufhin schwellten die MVBs nach und nach an und fusionierten schließlich untereinander oder mit Lysosomen zu immer größeren Vesikeln, sodass diese im KLSM klar sichtbar wurden und die umschließende MVB-Membran eindeutig mithilfe des eGFP-Signals identifizierbar war (s. Abb. 3.15b; s. Abb. 3.15d; vgl. auch Fujita *et al.*, 2003). Hrs akkumulierte genau an dieser Membran, was neben der Verifizierung durch

den Hrs-Knockdown (s. 3.2) nochmals die Spezifität dieser Immunfluoreszenzfärbung unterstreicht. Interessanterweise kolokalisierte Gal3 bei ATPase-Defizienz mit den Hrs-Ansammlungen, sodass sich ein perlschnurartiges Bild ergab: Vps4a^{E228Q}-eGFP bildete das Band, wobei die Perlen aus Hrs und Gal3 bestanden (Dreifach-Kolokalisation). Durch die Verwendung von konfokalen *Average Intensity Plots* konnte außerdem gezeigt werden, dass Gal3 eher am äußeren Rand der Vps4a^{E228Q}-eGFP-Hrs-Akkumulationen vorkam (s. Abb. 3.15c). Dies zeigt, in direkter Analogie zu den Daten, die mithilfe der Tsg101-Depletion gewonnen wurden, dass Gal3 für die Inkorporation in das Innere der MVBs einen intakten ESCRT-Komplex benötigte.

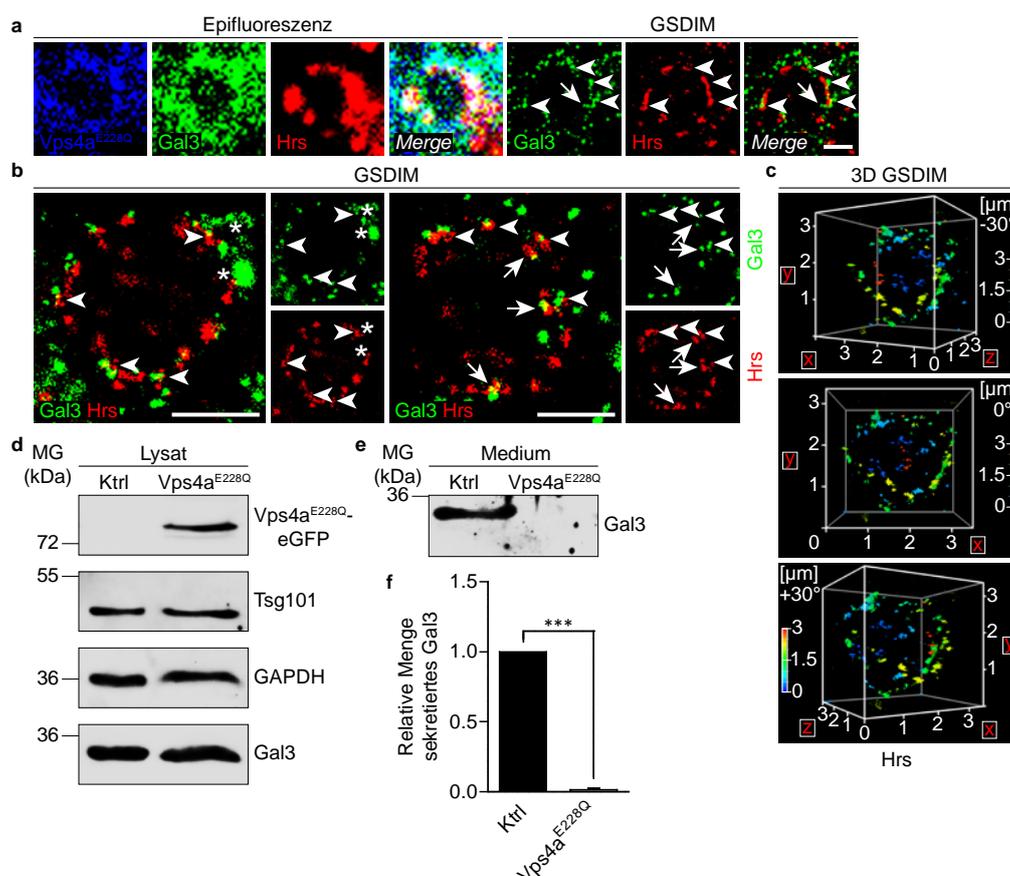


Abb. 3.16 Die dominant-negative Mutation von Vps4a führt zu einer Akkumulation von Gal3 (II). (a) Analog zu der Behandlung in Abb. 3.15 wurden Vps4a^{E228Q}-eGFP-Zellen für 8 h mit 10 nM Mifepriston behandelt und eine Immunfluoreszenzfärbung gegen Gal3 und Hrs durchgeführt. Anschließend wurden die Präparate mit der GSDIM analysiert. In dem Epifluoreszenz-Modus konnte zusätzlich das eGFP-Signal ausgewertet werden. Im GSDIM-Modus war es möglich, die Gal3-Akkumulation auf der MVB-Membran nachzuweisen (Pfeilköpfe). Zusätzlich fanden sich Strukturen von Gal3, die ausgehend von der Membran in das Innere der MVBs ragten und auf eine imperfekte Knospung der ILVs hindeuten könnten (Pfeil). (b) In weiteren GSDIM-Aufnahmen konnten dichte Gal3-Anhäufungen nachgewiesen werden (Sternchen), die neben den Ansammlungen auf der Membran (Pfeilköpfe) sehr prominent hervorstachen. Auch Gal3-Projektionen in das Lumen konnten beobachtet werden (Pfeile), die den Schluss nahelegen, dass sich knospende ILVs an der Membran anhäufte. (c) Mithilfe der 3D-GSDIM konnte sichergestellt werden, dass der Marker Hrs ausschließlich auf der Membran des vergrößerten MVBs vorkam. (d, e) Vps4a^{E228Q}-eGFP-Zellen wurden für 6 h mit 10 nM Mifepriston behandelt und das Zellkulturmedium gesammelt. Lysat und Medium konnten dann im Western Blot ausgewertet werden. Aufgrund der dominant-negativen Inhibition verringerte sich die Gal3-Sekretion dramatisch. Dies könnte darauf hindeuten, dass die exosomale Sekretion von Gal3 der Hauptweg der UPS von Gal3 überhaupt sein könnte. Als Kontrolle dienten Wildtyp-MDCK-Zellen. (f) Eine Quantifizierung der Blots bestätigte diese Vermutung, da Gal3 in dem Medium der Vps4a^{E228Q}-eGFP-Zellen unter der Nachweisgrenze lag. Maßstäbe: a, b, 1 μ m.

Darüber hinaus wurde die Gal3-Akkumulation auf der MVB-Membran auch in der Lebendzellmikroskopie bestätigt (s. Abb. 3.15e). Dazu wurde die Vps4a^{E228Q}-eGFP-Zelllinie zusätzlich mit Gal3-mCherry stabil transfiziert. Es zeigten sich neben den perlschnurartigen Akkumulationen sogar filamentöse Gal3-Anreicherungen, die sehr flexibel und beweglich waren.

Die gewonnenen Erkenntnisse über die Gal3-Akkumulation in Folge der dominant-negativen Mutation von Vps4a stützen sich zudem auf eine ultrastrukturelle Analyse der MVBs mithilfe der GSDIM (s. Abb. 3.16a, b). Dadurch war es möglich, die großen Gal3-Akkumulationen auf der MVB-Oberfläche noch genauer zu betrachten. Es zeigte sich, dass Gal3 nicht mehr im Inneren der MVBs anzutreffen war. Einige Strukturen jedoch, die Kollokalisierungen von Gal3 und Hrs entsprangen, hatten eine große Ähnlichkeit zu den obengenannten Stufe-II Knospungsstadien und könnten demnach auf nicht-abgeschnürte ILVs hindeuten. Diese Invaginationen stammten ausschließlich von der begrenzenden MVB-Membran, da das Vorkommen von Hrs auf ebendieser Membran (und nicht im Lumen) mithilfe der 3D-GSDIM bestätigt werden konnte (s. Abb. 3.16c).

Abschließend wurde das Zellkulturmedium auf das Vorhandensein von Gal3 nach Mifepriston-Behandlung überprüft. Mittels Western Blot konnte nachgewiesen werden, dass die Sekretion von Gal3 nicht nur auf die ATPase-Aktivität von Vps4 und damit auf einen aktiven ESCRT-Komplex angewiesen war (s. Abb. 3.16d-f), sondern auch, dass die Sekretion mithilfe des ESCRT-Komplexes mutmaßlich den alleinigen Export-Mechanismus in MDCK-Zellen darstellt.

3.7 Ein hoch konserviertes PSAP-Tetrapeptid ist verantwortlich für die Interaktion mit Tsg101 und die exosomale Sekretion von Gal3

Anschließend sollte das Interaktionsmotiv aufgedeckt werden, das für die direkte Bindung an Tsg101 verantwortlich ist und dadurch die exosomale Sekretion von Gal3 initiiert. Damit könnte die zentrale Fragestellung dieser Arbeit, nämlich die Identifikation eines exosomal Sortiersignals, beantwortet werden.

Verschiedene Arbeiten konnten nachweisen, dass bestimmte Bereiche in der N-terminalen Domäne von Gal3 für die Sekretion benötigt werden (Gong *et al.*, 1999). Mehul und Hughes konnten sogar ein Oktapeptid-Motiv YPSAPGAY identifizieren, das essenziell, aber allein noch nicht ausreichend für die Sekretion von einer Membranverankerten Hamster Gal3-Chimäre war (Mehul & Hughes, 1997). Aus diesem Grund wurden die Gal3-Sequenzen aus 34 verschiedenen Wirbeltieren mit dem Programm ClustalOmega aligniert und verglichen (McWilliam *et al.*, 2013).

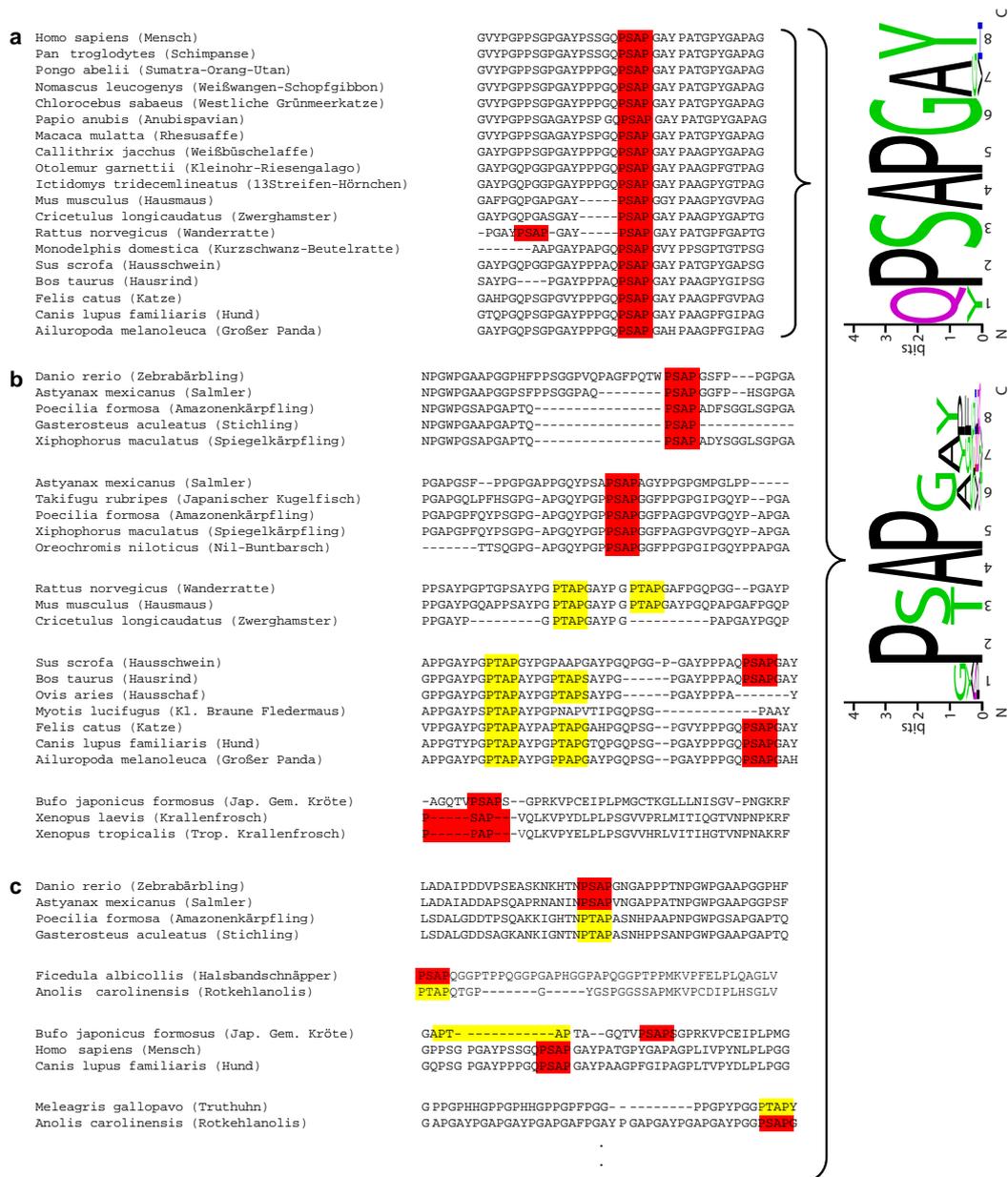


Abb. 3.17 Das P(S/T)AP-Tetrapeptid im N-Terminus von Gal3 ist hochkonserviert. (a) Die Sequenzen von Gal3 der angezeigten Säugetiere wurden aligniert und die PSAP-Motive rot markiert. Mithilfe des Programms WebLogo wurde das Oktapeptid (94)QPSAPGAY(101) als Konsensussequenz aller untersuchten Säugetiere dargestellt. (b) Durch die Verwendung von anderen, weiter entfernten Spezies wie Fischen, Vögeln, Amphibien und Reptilien konnte aufgezeigt werden, wie das Tetrapeptid in verschiedenen „Hotspot“-Regionen vorkam. In Fischen gibt es zwei solcher Hotspots, wobei beide im Amazonen- und Spiegelkärpfling sowie im Salmmler gleichzeitig vorkommen (beide obere Absätze). Dies konnte auch in Säugetieren beobachtet werden, wo die PSAP-Sequenzen in a noch zusätzlich um weitere PTAP-Sequenzen (gelb markiert) erweitert waren (beide mittlere Absätze). Der untere Absatz zeigt die Hotspot-Region in Amphibien, die im Gegensatz zu den anderen Spezies erst kurz vor der CRD angesiedelt sind. (c) Zusätzlich konnte eine redundante Entwicklung von PSAP- (rot) und PTAP-Sequenzen (gelb) in den Hotspot-Regionen verwandter (oberer Absatz) und nicht eng-verwandter Arten beobachtet werden. Der Vergleich der Sequenz aus der Japanischen Gemeinen Kröte und der Säugersequenz verdeutlicht diese redundante Entwicklung und könnte auf eine konvergente Evolution der Gal3-P(S/T)AP-Motive hindeuten. Schließlich wurde eine Konsensussequenz aus 34 Wirbeltieren generiert. Es zeigte sich, dass nur das Tetrapeptid P(S/T)AP hochkonserviert war.

Mit diesem Ansatz konnten stark konservierte Tetrapeptid-Domänen mit der Sequenz P(S/T)AP identifiziert werden, die je nach Spezies bzw. Gattung in verschiedenen „Hotspot“-Regionen des N-Terminus von Gal3 vorkamen (s. Abb. 3.17a-c). Anschließend wurde das bereits erwähnte Oktapeptid (94)QPSAPGAY(101) der

verschiedenen Sequenzen mit dem Programm WebLogo aufgetragen, um die Konsensussequenz darzustellen (Schneider & Stephens, 1990, Crooks *et al.*, 2004). Dabei fällt auf, dass Gattungs-übergreifend ausschließlich das innere Tetrapeptid, bestehend aus P(S/T)AP, hoch konserviert ist. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass ein solches P(S/T)AP-Motiv in verschiedenen ESCRT-Proteinen und auch in sog. *Late*-Domänen behüllter Viren eine direkte Interaktion mit Tsg101 induziert. Durch diese Interaktion erreichen Viren, wie z. B. das Ebola- und Marburg-Virus, aber auch HIV, die direkte, ESCRT-vermittelte Abknospung von der Plasmamembran infizierter Zellen (Martin-Serrano *et al.*, 2003b, Chen & Lamb, 2008). Die Existenz einer solchen PSAP-Domäne in der Gal3-Aminosäuresequenz dieser ganz unterschiedlichen Arten stellt somit einen Hinweis für eine mögliche ESCRT-vermittelte Sekretion dar. Das P(S/T)AP-Tetrapeptid in der Gal3-Sequenz scheint in der Familie der Galektine einzigartig zu sein, da kein anderer Vertreter ermittelt werden konnte, der ebenfalls über eine solches Motiv verfügt.

Darüber hinaus weisen einige Wirbeltiere umfangreiche Verdoppelungen des P(S/T)AP-Motivs auf, bis hin zu Vertretern der Gattung *Rattus norvegicus*, in der jeweils zwei PSAP- und zwei PTAP-Sequenzen vorkommen. Faszinierend ist zudem, dass immer wieder eine außergewöhnliche Redundanz zwischen einzelnen PSAP- und PTAP-Motiven beobachtet werden konnte (s. Abb. 3.19c). Dabei kommen zwischen den verschiedenen Arten in den jeweiligen „Hotspots“ wechselnd PSAP- oder PTAP-Sequenzen vor. Diese Redundanz kann auch bei Viren beobachtet werden und spricht im Zusammenhang mit dem Auftauchen in den markanten Sequenz-Bereichen unterschiedlicher Arten für eine erstaunliche konvergente Evolution dieses Motivs. Dies wird beim Vergleich der Sequenz aus *Bufo japonicus formosus* und dem Säuger-Gal3 deutlich, bei denen die redundante Entwicklung von PTAP und PSAP besonders evident ist (s. Abb. 3.19c zweitletzter Abschnitt). Ähnliches gilt für Gal3 aus *Meleagris gallopavo* und *Anolis carolinensis*.

Um eine etwaige direkte Interaktion der konservierten PSAP-Domäne in Gal3 mit Tsg101 zu determinieren und um zu klären, ob diese direkte Interaktion die exosomale Sekretion von Gal3 bedingt, wurden die beiden Proline des Tetrapeptid-Motivs in humanem Gal3 mutiert und jeweils durch Alanin ersetzt ((95)PSAP(98)→(95)ASAA(98)). Es ist bekannt, dass eine solche Mutation in der viralen *Late*-Domäne die Freisetzung des humanen T-lymphotropen Virus 1 (HTLV-1) und von Marburg-Virus-*like particles* blockiert (Bouamr *et al.*, 2003, Dolnik *et al.*, 2010). Um sicherzustellen, dass das rekombinant hergestellte Gal3-ASAA weder das Oligomerisierungs-Verhalten, noch die Zuckerbindung der CRD beeinflusste, wurden verschiedene Vorversuche durchgeführt. Dazu zählte ein Turbiditätsassay (Oligomerisierung; s. Abb. 3.18a und 2.12.3), sowie

eine Fluoreszenzpolarisations-Messung (Funktion der CRD, s. Abb. 3.18b und 2.12.2). Zusätzlich wurde mithilfe der CD-Spektroskopie eine Strukturanalyse unternommen, um die korrekte Faltung der ASAA-Mutanten zu überprüfen (s. Abb. 3.18c). Es konnten dahingehend keine wesentlichen Abweichungen festgestellt werden (s. Tabelle 3-1). Darüber hinaus wurde die Bindekapazität des direkten Bindepartners Tsg101 überprüft. Dazu wurde immobilisiertes, rekombinantes Tsg101 (rTsg101-GST) mit Zelllysat inkubiert und einem *in vivo Pull-down* unterzogen. Durch diesen Versuchsaufbau konnte Hrs als Positiv-Kontrolle erfolgreich präzipitiert werden, was die Funktionalität der UEV-Domäne bestätigte (s. Abb. 3.18d).

Tabelle 3-1 Geschätzter Anteil der Sekundär-Struktur [%].

	PSAP	ASAA
α -Helix	6.6	6.7
β -Antiparallel	20.7	19.4
β -Parallel	15.9	16.1
<i>Turn</i>	13.3	13.3
Andere	43.5	44.6

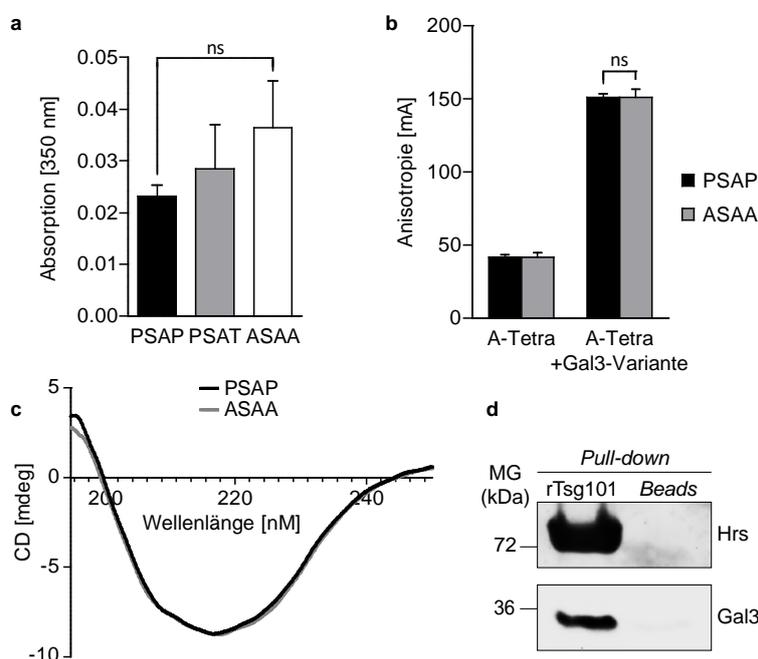


Abb. 3.18 Funktionalitätstest der rekombinant hergestellten Gal3-Varianten und Tsg101. (a, b) Die Gal3-ASAA-Mutante wurde in Hinblick auf unbeeinträchtigte Oligomerisation (a) und Zuckerbindung (b) untersucht. (a) Die Ausbildung von hochmolekularen Clustern wurde mithilfe eines Turbiditätsassays überprüft. Es zeigte sich zwischen rGal3-PSAP und rGal3-ASAA ((95)PSAP(98)→(95)ASAA(98)) kein signifikanter Unterschied in dem Oligomerisierungs-Verhalten. (b) Gal3-PSAP und Gal3-ASAA wurden mithilfe der Fluoreszenzpolarisierung auf ihre Bindekapazität an den einfach verzweigten Zucker A-Tetra untersucht. Auch hier zeigte sich kein Unterschied zwischen den Gal3-Varianten. (c) Das CD-Spektrum der ASAA-Mutante weist im Vergleich mit rGal3-PSAP keine signifikante Änderung der Sekundärstruktur auf. (d) Rekombinant hergestelltes, an Glutathion-Beads gebundenes Tsg101-GST wurde in einem *in vivo Pull-down* als stationäre Phase genutzt, um Hrs und Gal3 aus dem Zelllysat von MDCK-Zellen zu isolieren. Dies zeigt, dass rTsg101-GST korrekt gefaltet war und zu den Interaktionsstudien verwendet werden konnte.

Nach diesen Vorversuchen konnte nun analog ein *in vitro* Pull-down mit rTsg101-GST und rekombinant hergestelltem Gal3-PSAP bzw. Gal3-ASAA durchgeführt werden. Tatsächlich führte die ASAA-Mutation zu einer Aufhebung der direkten Interaktion zwischen Gal3 und Tsg101 (s. Abb. 3.19a, c). Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurde danach eine „inverse“ Ko-Immünpräzipitation *in vivo* mit den verschiedenen Gal3-Varianten Gal3-PSAP-V5, PSAT-V5 und -ASAA-V5 als stationäre Phase angeschlossen (s. Abb. 3.19b, d). Dabei präzipitierte Gal3-PSAP in der Tat gleichermaßen Tsg101, wohingegen Gal3-ASAA nur eine sehr geringe Menge an Tsg101 binden bzw. aufreinigen konnte. Die im Menschen vorkommende Variante Gal3-PSAT, die auf einem Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP; dbSNP:rs4652) beruht, der vor allem bei Eurasiern (meist heterozygot) zu finden ist, zeigte eine intermediäre Bindekapazität.

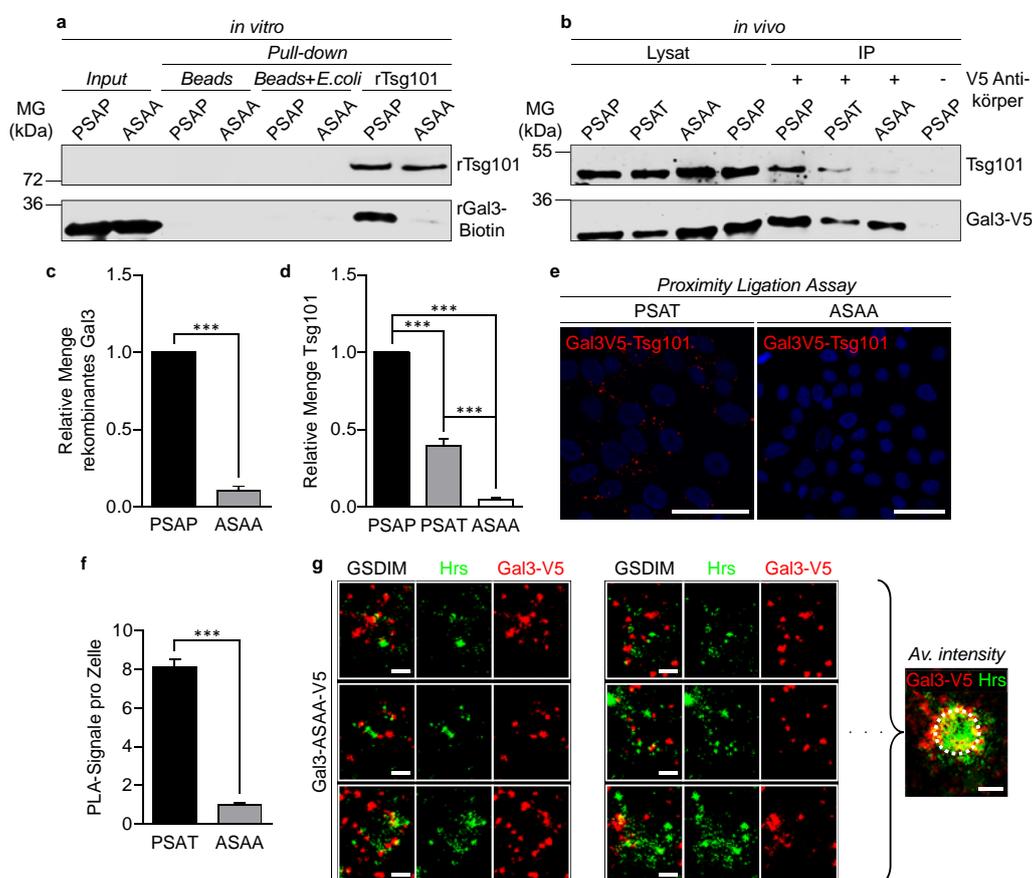


Abb. 3.19 Das PSAP-Tetrapeptidmotiv ist verantwortlich für die direkte Interaktion mit Tsg101. (a) *In vitro* Pull-down mit rTsg101-GST als stationäre Phase und den beiden Gal3-Varianten rGal3-PSAP und rGal3-ASAA (rGal3-Konzentration jeweils 10 nM). Neben der *Beads*-Kontrolle (*Beads* allein) wurden zusätzlich die eingesetzten Glutathion-Sepharose-*Beads* mit *E. coli*-Lysat behandelt, um eine unspezifische Bindung von rGal3 auszuschließen. (b) Ko-Immünpräzipitation mit V5-Antikörper-gekoppelten Sepharose-*Beads* in stabil exprimierenden Gal3-V5-MDCK-Zellen. (c) Quantifizierung der Experimente aus a. Die ASAA-Mutation unterband die direkte Interaktion zwischen rGal3 und rTsg101. (d) Quantifizierung der Experimente aus b. Auch im komplementären *in vivo*-Ansatz wurde die Interaktion zwischen Gal3-ASAA-V5 und Tsg101 gestört. (e) PLA-Assay in den Zelllinien aus b. (f) Quantifizierung der Experimente aus e. 15-20 Zellen pro Experiment. (g) GSDIM-Analyse in Gal3-ASAA-V5-Zellen. Gal3-V5 und Hrs wurden angefärbt. Schließlich wurde ein *Average Intensity Plot* (*Av. intensity*) aus 18 MVBs berechnet. Die gestrichelte Linie hat einen Durchmesser von 450 nm. Maßstäbe: e, 50 µm; g, 250 nm.

Um diese Erkenntnisse visuell darzustellen und zu verifizieren, wurde ein PLA-Assay in Gal3-PSAT bzw. -ASAA exprimierenden Zellen angefertigt (s. Abb. 3.19e). Die Anzahl

an PLA-Signalen war in Gal3-ASAA-Zellen, wie erwartet, signifikant kleiner als in Gal3-PSAT exprimierenden Zellen (s. Abb. 3.19f). Dies zeigt, dass die räumliche Nähe zwischen Gal3-Variante und Tsg101 durch die ASAA-Mutation verloren gegangen war. In einem nächsten Schritt sollte die Lokalisation der Gal3-Mutanten innerhalb der Zelle mithilfe der ultrahochauflösenden GSDIM visualisiert werden. Dabei sollte vor allem die Lokalisation von Gal3-ASAA an der MVB-Membran untersucht werden. Die GSDIM-Analyse offenbarte, dass die ASAA-Mutation keinen wesentlichen Einfluss auf Rekrutierung von Gal3 an die Membran des MVBs besaß (s. Abb. 3.19g). Allerdings konnten, vergleichbar zum Tsg101-*Knockdown* und der dominant-negativen Variante Vps4a^{E228Q}-eGFP, keine Stufe-II oder -III MVBs detektiert werden. Gal3-ASAA akkumulierte in diesen Zellen ausschließlich an der MVB-Membran und wies dementsprechend lediglich eine orbitale Verteilung auf. Dies wird besonders durch den *Average Intensity Plot* klar, der aus 18 Einzelbildern berechnet wurde. Man kann daraus schließen, dass die PSAP-Domäne hauptverantwortlich für die Inkorporation in ILVs ist, wobei es noch weitere Faktoren zu geben scheint, die für die initiale Rekrutierung von Gal3 an die MVB-Membran sorgen. In diesem Fall sollte man jedoch auch bedenken, dass noch funktionelles, canines Gal3 in den Zellen vorhanden war, das weiterhin eine PSAP-Domäne besitzt und mit dem die ASAA-Variante interagieren könnte. Nichtsdestotrotz verdeutlichen diese Ergebnisse zusammengefasst, dass das PSAP-Tetrapeptidmotiv essenziell für die Interaktion von Gal3 und Tsg101 zu sein scheint.

Um diese Schlussfolgerung biophysikalisch abzusichern und um die Dissoziationskonstanten der Gal3/Tsg101-Interaktion zu bestimmen, wurde anschließend eine *in vitro* MST (s. 2.10.8) durchgeführt (s. Abb. 3.20). In einer Titrationsreihe wurde rekombinantes, NT 647-markiertes Tsg101-UEV (UEV-Domäne, bestehend aus den Aminosäuren 1-145) in gleichbleibender Menge mit einer Verdünnungsreihe der jeweiligen Gal3-Variante vermischt und das Thermophoresesignal bestimmt. Durch das Auftragen dieses Signals gegen die Gal3-Konzentration erhält man schließlich eine Dosis-Wirkungs-Kurve, aus der letztendlich die Dissoziationskonstante abgeleitet werden kann (s. Tabelle 3-2).

Tabelle 3-2 Abgeleitete Dissoziationskonstanten der Gal3-V5-Mutanten und Gal3 der Ratte.

Tsg101+	K _d [µM]	s.d.	K _a [µM ⁻¹]	s.d.
Gal3 (PSAP)	8.848	0.851	0.11302	0.01087
Gal3 (ASAA)	45.792	4.658	0.021838	0.002221
Gal3 (Ratte)	0.307	0.057	3.257329	0.604781

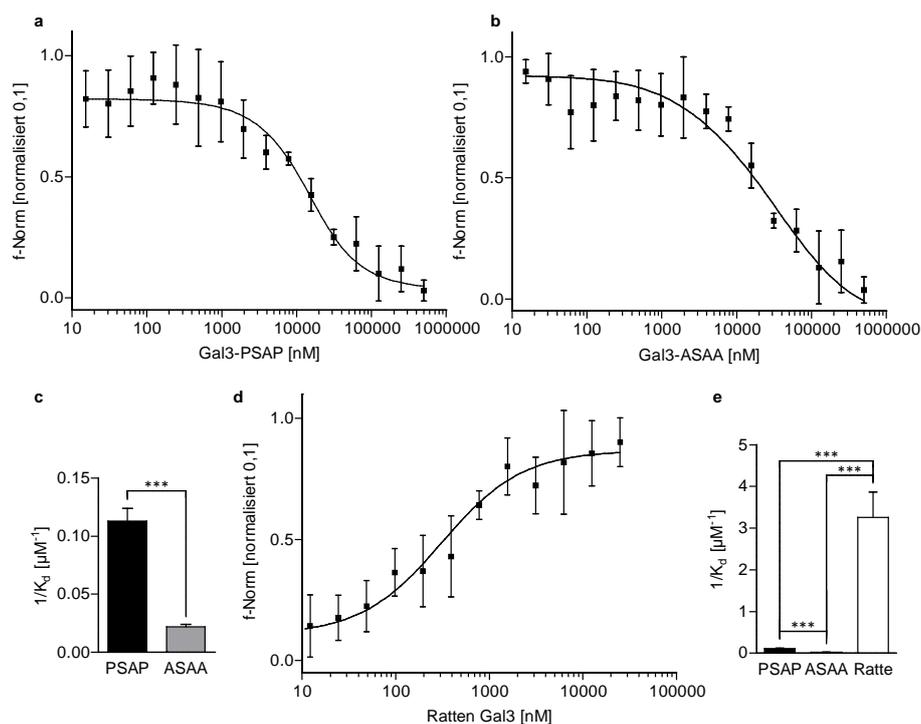


Abb. 3.20 MST-Bindungskurven und die abgeleiteten Dissoziationskonstanten. (a) MST-Bindungskurve von rGal3-PSAP und Fluoreszenz-markierten rTsg101 (Tsg101-UEV-Domäne, bestehend aus den Aminosäuren 1-145). rGal3-PSAP wurde in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe eingesetzt. Hier sind Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben, bei $n=9$ unabhängigen Experimenten. (b) Analoge Bindungskurve von rGal3-ASAA und dem Tsg101-UEV-Element. (c) Aus den Bindungskurven wurde die Dissoziationskonstante abgeleitet. Die Bindekapazität von rGal3-ASAA an rTsg101 war durch die Mutation sichtlich beeinträchtigt. (d) MST-Bindungskurve von rGal3 aus der Ratte und dem rTsg101-UEV-Element. Auch hier sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben, bei $n=9$ unabhängigen Experimenten. (e) Die daraus abgeleitete Dissoziationskonstante im Vergleich mit den humanen Gal3-Varianten. Aufgrund der vier P(S/T)AP-Domänen verfügte Gal3 aus der Ratte über die stärkste Bindung an rTsg101.

Die Dissoziationskonstante von rGal3-PSAP betrug $8,8 \pm 0,9 \mu\text{M}$ und stimmt damit sehr gut überein mit den Werten, die für die Interaktion des HIV-Proteins p6 und Tsg101 beschrieben worden sind (Garrus *et al.*, 2001). Für rGal3-ASAA hingegen ergab sich ein K_d -Wert von $45,8 \pm 4,7 \mu\text{M}$, was auf eine deutlich verminderte Affinität hindeutet. Diese Beobachtung deckt sich damit auf überzeugende Art und Weise mit den vorherigen *in vivo* und *in vitro* Daten. Um den Zusammenhang zwischen verfügbarer PSAP-Domäne und Tsg101-UEV-Interaktion weiter zu beleuchten, wurde nun die Bindekapazität von aus der Ratte stammendem Gal3 bestimmt (s. Abb. 3.20d, e). Dieses besitzt wie bereits erwähnt, insgesamt vier P(S/T)AP-Sequenzen. Tatsächlich erwies sich der K_d -Wert dieser Gal3-Variante mit $0,3 \pm 0,1 \mu\text{M}$ als ausgesprochen hoch, was für eine gegenüber humanem Gal3 gesteigerte Affinität spricht und eine kooperative Bindung vermuten lässt.

Schließlich sollte validiert werden, ob eine durch die PSAP-Deletion verursachte verminderte direkte Interaktion, ebenso eine verringerte exosomale Sekretion von Gal3 zur Folge hat. Dazu wurde die exosomale Fraktion von Gal3-PSAP-V5, -PSAT-V5 und ASAA-V5 exprimierenden Zellen isoliert und im Western Blot mit V5-Antikörpern analysiert (s. Abb. 3.21a). Es zeigte sich in der Tat, dass analog zu den

Interaktionsstudien, die exosomale Menge an Gal3-ASAA deutlich verringert war im Vergleich zu den beiden anderen Varianten (s. Abb. 3.21b). Auch hier verfügte Gal3-PSAT wieder über eine dazwischen liegende, mittlere Sekretionseffizienz. Die Exosomenpräparation wurde von Dr. Dominik Schneider durchgeführt (Schneider, 2011).

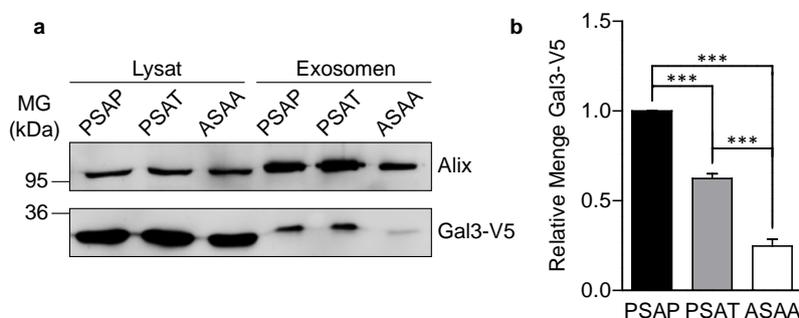


Abb. 3.21 Das PSAP-Tetrapeptidmotiv ist verantwortlich für die exosomale Sekretion von Gal3. (a) Das Zellkulturmedium der stabil transfizierten Gal3-V5-Mutanten (die jeweilige Tetrapeptid-Variante ist angezeigt) wurde über Nacht gesammelt und einer Exosomenpräparation unterzogen. Im Western Blot wurde deutlich, dass sehr viel weniger Gal3-ASAA in der exosomalen Fraktion auftauchte. (b) Quantifizierung der Experimente aus a. Durch die ASAA-Mutation wurde eine hoch signifikant geringere Menge an Gal3 exosomal sekretiert ($n=6$ unabhängige Experimente). Die PSAT-Variante zeigte eine mittlere Sekretionseffizienz. Aus Bänfer *et al.*, 2018.

Die letzte und entscheidende Frage, nämlich ob das PSAP-Motiv ein universelles Sortiersignal ist, das zwangsläufig eine exosomale Sekretion induziert, sollte mit der Übertragung dieses Signals auf ein neutrales, zytoplasmatisches Protein getestet werden. Dazu wurde eGFP als externes Protein gewählt (eGFP-PSAP), das im Western Blot einerseits leicht nachweisbar und andererseits relativ klein ist, um eine hohe Transfektionseffizienz zu garantieren. Um ein PSAP-Motiv mittels Dpnl-vermittelter Ortspezifischer Mutagenese einzufügen, wurde der im eGFP besonders leicht zugängliche C-Terminus gewählt (s. Abb. 3.22). Zusätzlich wurde die PSAP-Sequenz von den beiden Aminosäuren PG bzw. GP flankiert, um so die korrekte Faltung und Zugänglichkeit sicherzustellen.

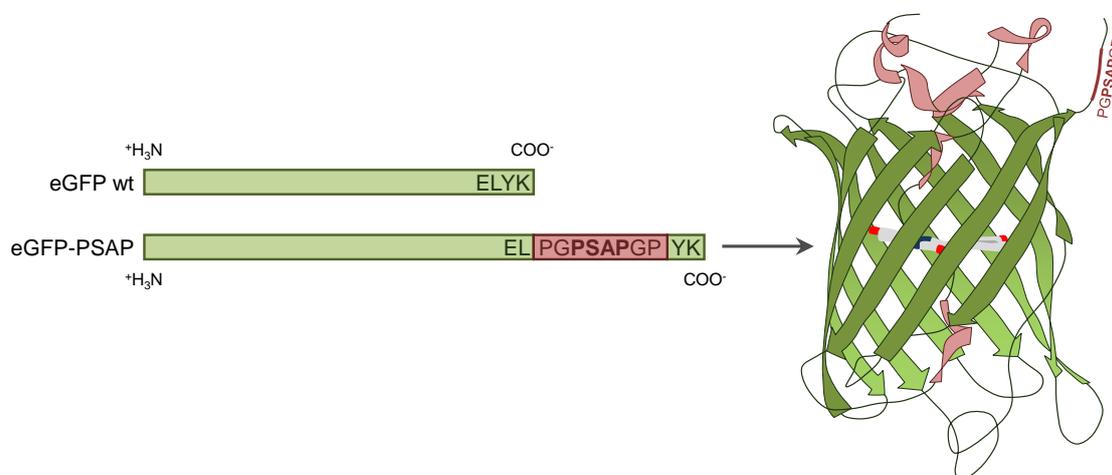


Abb. 3.22 Modell zur Übertragung des PSAP-Motivs auf eGFP.

Nach erfolgter transienter Transfektion des eGFP-PSAP-Konstrukts bzw. eGFP-Wildtyp als Kontrolle, wurde das Zellkulturmedium gesammelt und entweder direkt im Western Blot analysiert, oder einer Exosomenpräparation unterzogen (s. Abb. 3.23a).

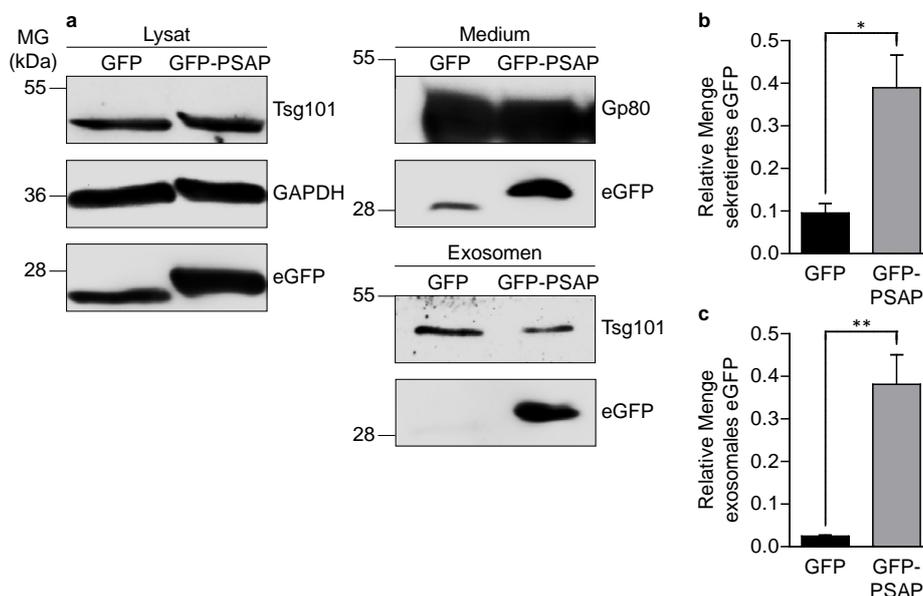


Abb. 3.23 Das PSAP-Motiv ist auf GFP übertragbar und löst dessen exosomale Sekretion aus. (a) MDCK-Zellen wurden transient entweder mit einem Plasmid für die Expression von eGFP oder für die Expression von eGFP mit einer C-terminal eingefügten PGPSAPGP-Sequenz (GFP-PSAP) transfiziert. Anschließend wurde das Medium über Nacht gesammelt und entweder direkt im Western Blot aufgetragen oder eine Exosomenpräparation durchgeführt. (b) Bezogen auf das Lysat wird eine signifikant größere Menge an GFP-PSAP von den Zellen in das Medium abgegeben. (c) Die Quantifizierung der exosomalen Fraktion offenbarte, dass GFP-PSAP, im Gegensatz zum Wildtyp-GFP tatsächlich in Exosomen verpackt worden war.

Faszinierenderweise konnte, bezogen auf die jeweilige Menge im Lysat, sowohl im Medium (s. Abb. 3.23b), als auch insbesondere in der exosomalen Fraktion (s. Abb. 3.23c) ein signifikant höherer Anteil von eGFP-PSAP als Wildtyp-eGFP verzeichnet werden. Dieses Ergebnis untermauert die These, dass das Tetrapeptidmotiv PSAP eigenständig die Bindung an Tsg101 herbeiführen kann, die schlussendlich in der Sortierung eines Polypeptids in ILVs resultiert und in der Sekretion via Exosomen gipfelt. Der biochemische Prozess der Gal3-Sortierung, der durch diese PSAP-Domäne ausgelöst wird und die exosomale Sekretion nach sich zieht, stellt somit die Blaupause dar, die von Viren **aus**genutzt und möglicherweise von weiteren zytoplasmatischen Proteinen **benutzt** werden kann.

3.8 Gal3 könnte eine funktionelle Rolle in der Exosomen-Biogenese spielen

Mithilfe der elektronenmikroskopischen Arbeiten konnte immer wieder die Lokalisation von Gal3 an der zytoplasmatischen Basis, d. h. in der sog. Hals-Region der ILV-Knospen aufgezeigt werden. Zusammen mit der Beobachtung, dass in Gal3-ASAA-Zellen eine geringere Menge an Alix in der exosomalen Fraktion auftauchte, entwickelte sich daraus die Hypothese, dass Gal3 möglicherweise eine funktionelle Rolle in der Exosomen-Biogenese einnehmen könnte.

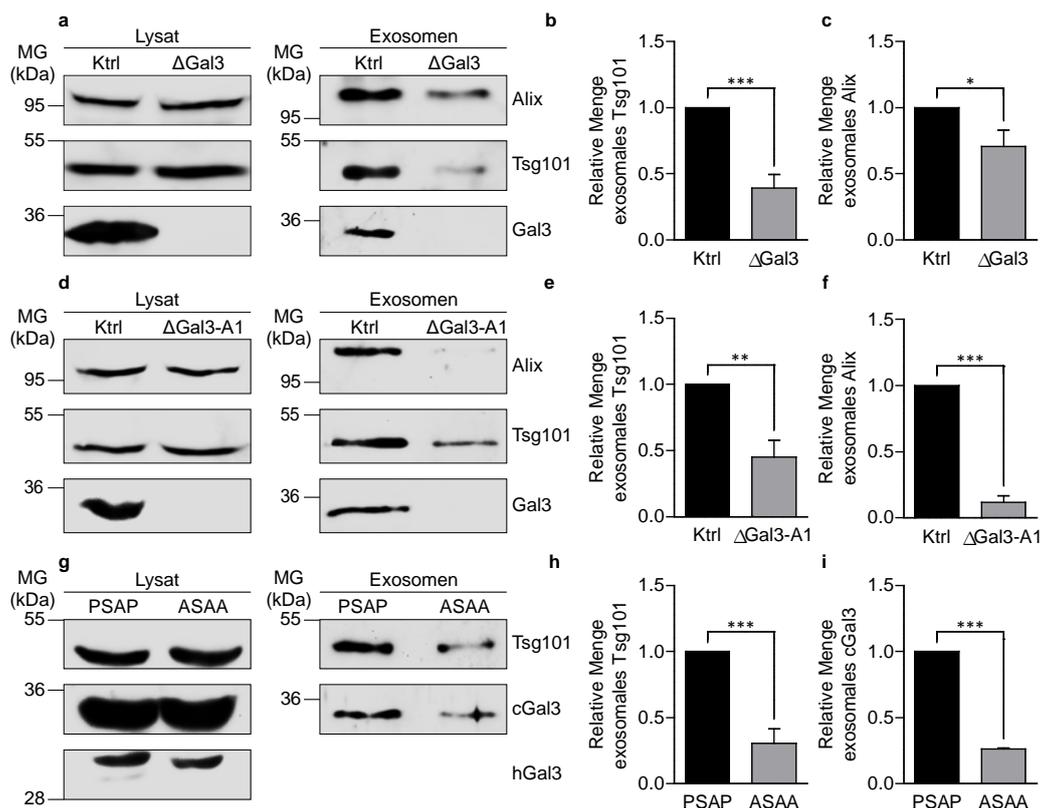


Abb. 3.24 Gal3 spielt womöglich eine funktionelle Rolle in der Exosomen-Biogenese. (a) Die exosomale Fraktion von Gal3-Knockout-Zellen (Δ Gal3) wurde auf die Anwesenheit von den beiden Markerproteinen Alix und Tsg101 hin untersucht. (b, c) Die Quantifizierung der Experimente aus a zeigte, dass die exosomale Sekretion beider Marker, Tsg101 (b) und Alix (c), in Δ Gal3-Zellen beeinträchtigt war. (d-f) Dasselbe galt auch für einen weiteren getesteten Gal3-Knockout-Klon (Δ Gal3-A1). (g) In einem analogen Ansatz wurde die exosomale Sekretion von Tsg101 und endogenem, caninem (cGal3) in den beiden angezeigten Gal3-V5-Mutanten untersucht. In stabil exprimierenden Gal3-ASAA-Zellen war die Menge an exosomalem Tsg101 und cGal3 deutlich herab gesetzt. (h, i) Die Quantifizierung der beiden Proteine zeigte, dass die Menge von Tsg101 und cGal3 in den Exosomen hoch signifikant verringert war. Dies deutet darauf hin, dass Gal3-ASAA möglicherweise ein dominant-negativer Regulator der Exosomen-Biogenese sein könnte.

Um diese etwaige funktionelle Beteiligung zu bestimmen, wurden zusammen mit der Master-Studentin Jenny Dewes die Exosomen-Fractionen von MDCK Δ Gal3-Zellen mit denen von Wildtyp-MDCK-Zellen verglichen. Interessanterweise war in zwei verschiedenen CRISPR-Cas9-Knockout-Klonen die exosomale Sekretion sowohl von Alix, als auch von Tsg101 signifikant verringert (s. Abb. 3.24a-f). Dies galt interessanterweise ebenso in direkter Analogie für die Gal3-V5-Mutanten: Auch in Gal3-ASAA exprimierenden Zellen war der exosomale Anteil von Tsg101 und endogenem, caninem Gal3 deutlich reduziert (s. Abb. 3.24g-i). Diese Studien legen nahe, angesichts des endogenen und damit funktionellem *Pool* an caninem Gal3, dass die ASAA-Mutation einen dominant-negativen Einfluss auf die Exosomen-Biogenese oder aber auf die exosomale Sortierung der Cargoproteine haben könnte.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass einige interessante Indizien auf eine funktionelle Beteiligung von Gal3 an dem exosomalen Sortier-Prozess hindeuten.

4 Diskussion

Obwohl Gal3 im extrazellulären Raum Aufgaben von fundamentaler Wichtigkeit ausübt, ist der genaue Mechanismus, der zur Sekretion und Freisetzung von Gal3 führt, nicht verstanden. Mehrere Studien konnten Gal3 in Exosomen nachweisen, jedoch gab es auch Anzeichen auf mögliche andere Transportrouten, wie die direkte Abschnürung von der Plasmamembran durch die Bildung sog. Mikrovesikel. Es war deshalb das Ziel dieser Arbeit, den Sortier- und Transportmechanismus der Gal3-Sekretion in MDCK-II-Zellen endlich zweifelsfrei zu identifizieren und den zugrundeliegenden biochemischen Prozess zu visualisieren, sowie benötigte Sortiersignale aufzuklären.

Gal3 konnte zunächst im Lumen apikal sekretierter Exosomen nachgewiesen werden, wobei eine Sekretion über Mikrovesikel zumindest in MDCK-II-Zellen ausgeschlossen werden konnte. Der Sortierprozess, der zur Rekrutierung und Verpackung von Gal3 in die ILVs der MVBs führte, konnte mithilfe von ultrahochauflösenden Mikroskopie-Techniken abgebildet werden. Im Verlauf dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das für die exosomale Sekretion von Gal3 verantwortliche Sortiersignal aus einem hoch konservierten Tetrapeptid P(S/T)AP besteht, das Gal3 zu einer direkten Interaktion mit der ESCRT-I-Komponente Tsg101 befähigte und so dessen Verpackung in ILVs induzierte. Dieser Prozess erinnert stark an die virale Freisetzung an der Plasmamembran, in der der zelluläre ESCRT-Apparat durch die Verwendung einer P(S/T)AP-Domäne rekrutiert und schließlich für die virale Knospung usurpiert wird. Durch die Verwendung spezifischer Inhibitoren, den *Knockdown* von Tsg101 oder die dominant-negative Expression von Vps4a^{E228Q}-eGFP konnte der Prozess der exosomalen Gal3-Sekretion unterbunden werden. Speziell die Daten aus dem Tsg101-*Knockdown* und der Vps4a^{E228Q}-eGFP-Expression lassen den Schluss zu, dass die Transportroute über MVBs, ILVs und Exosomen den exklusiven Weg der Gal3-Sekretion in MDCK-Zellen darstellt. Interessanterweise konnte das Sortiersignal sogar auf ein neutrales, exogenes Protein übertragen werden, das danach nunmehr exosomal sekretiert wurde.

Zusammenfassend lässt sich folgendes Modell für den molekularen Mechanismus der Gal3-Rekrutierung in Multivesikuläre Körperchen und die daraus resultierende polarisierte exosomale Sekretion formulieren: Gal3 wird durch Tsg101 und vermutlich noch durch weitere Proteine, z. B. Alix, an die begrenzende MVB-Membran rekrutiert. Anschließend bindet Gal3 mithilfe der PSAP-Domäne direkt an Tsg101 und wird dadurch in knospende ILVs einsortiert. Nach der Abschnürung befindet sich Gal3 im Lumen der ILVs, die letztendlich nach der Fusion des MVBs mit der Plasmamembran als Exosomen in das extrazelluläre Milieu freigesetzt werden.

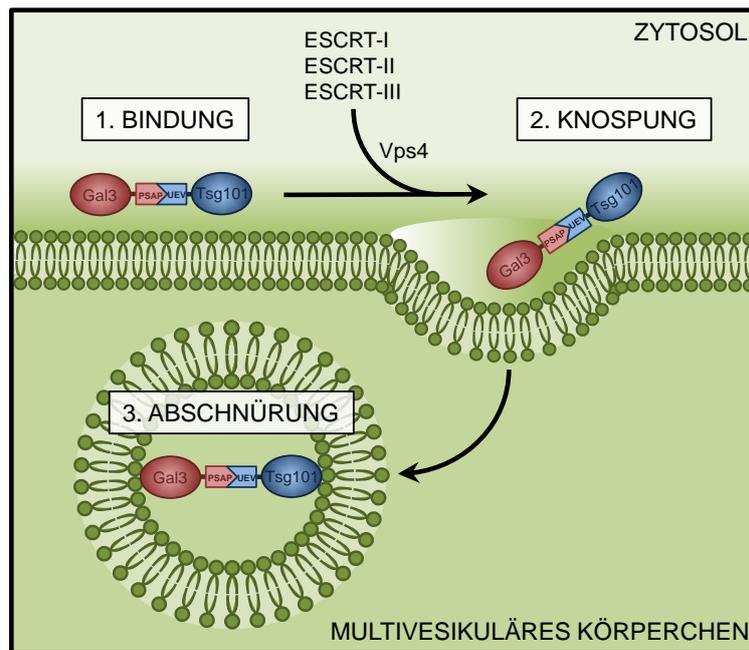


Abb. 4.1 Modell der unkonventionellen Sekretion von Gal3 durch Inkorporation in ILVs.

4.1 Die exosomale Sekretion von Gal3

Aufgrund der Tatsache, dass Gal3 in unterschiedlichen Vesikelpopulationen bzw. auch frei im extrazellulären Raum nachgewiesen wurde und eben auch angesichts der Vielzahl an denkbaren Transportrouten der unkonventionellen Sekretion (s. unten), wurden die unterschiedlichsten Mechanismen für die Sekretion von Gal3 diskutiert. Es konnten jedoch nie die involvierten Transporter oder Sortierrezeptoren identifiziert und dementsprechend auch kein biochemischer Prozess beschrieben werden, der die Sekretion von Gal3 und die Anwesenheit im Extrazellularraum erklären könnte. Die Daten dieser Arbeit belegen jedoch die zentrale Rolle des ESCRT-Superkomplexes im Sekretionsprozess von Gal3. Zum ersten Mal konnte die Interaktion zwischen Gal3 und Tsg101 beschrieben werden, die zur exosomalen Sekretion von Gal3 führte. Damit konnte auch zum ersten Mal die funktionelle Beteiligung des ESCRT-Apparates an der Rekrutierung zum MVB und der Verpackung in ILVs eines endogenen, zytoplasmatischen Proteins nachgewiesen werden, das nicht zum ESCRT-Komplex selbst bzw. zu akzessorischen Proteinen gehörte. Letztlich könnte Gal3 somit zu einer neuen Klasse von unkonventionell sekretierten Proteinen gehören (bzw. diese begründen), die durch die PSAP-Domäne für die Verpackung am MVB und den nachfolgenden exosomalen Export markiert werden (s. 4.5).

Die exosomale Sekretion wurde beispielsweise auch für Interleukin-1 β vorgeschlagen, das als ein klassisches Beispiel für ein unkonventionell sekretiertes Protein gilt (Qu *et al.*, 2007). Der zugrundeliegende biochemische Sortiermechanismus konnte jedoch nicht aufgeklärt werden und ist bis heute unbekannt.

Dass Gal3 durch die unkonventionelle Sekretion oder UPS den Extrazellarraum erreichen muss, belegen zahlreiche Studien, die den klassischen, sekretorischen Weg ausschalteten (Lindstedt *et al.*, 1993, Sato *et al.*, 1993, Cho & Cummings, 1995a). Basierend auf der Einteilung der Transportrouten der UPS (Rabouille *et al.*, 2012) waren für die Sekretion von Gal3 mehrere Wege vorstellbar oder aber bereits diskutiert worden. Der nachfolgende Abschnitt soll einen Überblick über diese Arbeiten geben und diese in Hinblick auf die Ergebnisse dieser Arbeit einordnen.

Es gibt bisher keine Evidenz für eine direkte Translokation von Gal3 über die Plasmamembran, entweder durch eine induzierte Porenbildung (UPS Typ-I) oder aber einen Transporter (UPS Typ-II), die auch den großen Anteil an freiem Gal3 auf den ersten Blick (s. 4.3) erklären könnte (Hughes, 1999, Nickel & Rabouille, 2009). Interessanterweise wurde jedoch für Gal1 eine solche Route der direkten Translokation diskutiert (Schäfer *et al.*, 2004). *In vitro* Studien belegen nämlich, dass Gal1 und FGF-2 in das Lumen sog. Plasmamembran-*Inside-out*-Vesikel translozieren konnten. Tatsächlich nutzt FGF-2 für seine Sekretion eine durch Oligomerisation selbst-induzierte Pore, die direkt über die Plasmamembran führt (Nickel, 2011). Für den essenziellen Schritt der Rekrutierung und Akkumulation von FGF-2 an der Plasmamembran wird das Phosphatidylinositol PtdIns(4,5)P2 benötigt (Steringer *et al.*, 2012, Steringer *et al.*, 2017). Ein solcher Interaktionspartner in der Membran wurde jedoch noch nicht für Gal1 beschrieben und es ist auch noch kein Mechanismus bekannt, durch den Gal1 eine vergleichbare Pore ausbilden könnte. Allerdings scheint Gal1 unterhalb der Plasmamembran zu akkumulieren bevor es sekretiert wird (Cooper & Barondes, 1990, Harrison & Wilson, 1992), was eine unbedingte Voraussetzung für eine direkte Translokation über die Plasmamembran darstellt (oder aber auch für die Sekretion via Mikrovesikel; s. unten). Ein solches Verhalten wurde aber auch für Gal3 diskutiert (Mehul & Hughes, 1997). Interessanterweise konnte eine Studie in diesem Zusammenhang sowohl die Interaktion von Gal3 mit Membranlipiden beobachten, als auch die direkte, spontane Translokation über die Membran von Liposomen. Da es sich dabei um ein *in vitro* Experiment mit artifiziellen Liposomen handelte und dementsprechend keine zellulären Komponenten diesen Prozess induzieren konnten, liegt der Schluss nahe, von einer Typ-I UPS auszugehen. Leider existieren keine weiteren Studien, die einen solchen Translokations-Prozess für Gal3 nachweisen konnten. Daneben konnte auch die Membraninteraktion durch die Arbeiten von Dr. Tobias von Mach nicht nachgewiesen werden, wohl aber eine Bindung an Glykolipide (von Mach, 2013). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die Gal1-Sekretion auf eine Bindung an Glykolipide oder glykosylierte Proteine, sog. „*Counter*-Rezeptoren“, in der Membran angewiesen zu sein scheint (Seelenmeyer *et al.*, 2005). Es wurde dahingehend sogar postuliert, dass Gal1

nur aufgrund der Wechselwirkung mit diesen *Counter*-Rezeptoren (dann Export-Rezeptoren) von dem inneren Blatt der Plasmamembran auf das Äußere und dementsprechend in den Extrazellularraum gelangen kann. Dies ist jedoch angesichts der Membranpolarität und der Tatsache, dass Glykolipide bzw. Zuckerreste ausschließlich auf dem äußeren Blatt vorkommen, relativ unwahrscheinlich. Zudem konnte auch für Gal3 eine solche Translokation in Abhängigkeit einer N-Glykosylierung ausgeschlossen werden (Stewart *et al.*, 2017). Tatsächlich sekretieren Glykosylierungsdefiziente CHO-Zellen (sog. Lec8 CHO-Zellen; s. dazu Deutscher & Hirschberg, 1986) trotz alledem Gal1 (Cho & Cummings, 1995b). Dies scheint hingegen im direkten Widerspruch zu den Daten von Seelenmeyer und Kollegen zu stehen, die in sog. Klon 13 CHO-Zellen eine stark verminderte Gal1-Sekretion beobachtet haben (Seelenmeyer *et al.*, 2005). Lec8- und Klon 13-CHO-Zellen besitzen nämlich beide den gleichen Glykosylierungs-Defekt, der auf einer Unterbrechung der UDP-Galaktose-Translokation in das Golgi-Lumen beruht (Deutscher & Hirschberg, 1986). Bei genauerer Betrachtung fällt jedoch auf, dass auch in den Arbeiten von Cho & Cummings weniger Gal1 von den Lec8-Zellen sekretiert wird (Cho & Cummings, 1995b), sowie, dass eine, wenn auch geringe, basale UDP-Galaktose-Translokation erhalten bleibt (Deutscher & Hirschberg, 1986). Nichtsdestotrotz ist die Beobachtung, dass die Sekretion von Gal1 (aber nicht von Gal3! (Stewart *et al.*, 2017)) die Funktionalität der CRD erfordert (Seelenmeyer *et al.*, 2005), überaus interessant (s. 4.5).

Neben der Unabhängigkeit von einer N-Glykosylierung einerseits, sowie von der Funktionalität der CRD andererseits, postulierten Stewart und Kollegen für die Gal3-Sekretion ebenfalls, dass diese nicht auf Membran-umhüllten Vesikeln beruhen könnte (Stewart *et al.*, 2017). Als Begründung für diese These wurde zum einen angeführt, dass Gal3 zum überwiegenden Teil frei löslich im Medium vorliegt und zum anderen, dass noch kein Prozess beschrieben wurde, durch den Gal3 aus solchen Vesikeln befreit werden könnte. Dies schließt eine ursprüngliche Sekretion via Vesikel allerdings nicht aus und angesichts der zahlreichen Publikationen, die Gal3 in extrazellulären Vesikeln nachweisen konnten, Stewart und Kollegen übrigens eingeschlossen, scheint diese Schlussfolgerung jedoch zu kurz zu greifen. Überdies wurde eine solche Freisetzung aus Vesikeln schon sehr früh beschrieben und diskutiert (Mehul & Hughes, 1997, Hughes, 1999) und erscheint unter Bezugnahme der Ergebnisse dieser Arbeit durchaus plausibel (s. 4.3). Ein Mechanismus für eine direkte Translokation von Gal3 oder für eine andere UPS-Transportroute, der unabhängig von extrazellulären Vesikeln das frei lösliche Gal3 direkt erklären könnte, wurde von Stewart und Kollegen denn auch nicht beschrieben oder diskutiert.

Wie bereits erwähnt und in 1.4.1 dargestellt, konnte Gal3 wiederholt als Komponente von extrazellulären Vesikeln identifiziert werden, was einem Sekretionsmechanismus nach UPS Typ-III entsprechen würde. Kontrovers wurde jedoch die Natur der Vesikel diskutiert, da es einerseits Hinweise auf direkt von der Plasmamembran abknospende Mikrovesikel und andererseits auf MVBs-basierenden Exosomen als Gal3-Exporteure gibt. Vor allem frühere Arbeiten deuteten auf einen Export von Gal1 (Cooper & Barondes, 1990) und Gal3 (Mehul & Hughes, 1997) via Mikrovesikel hin. Neuere Studien konnten jedoch mithilfe von Membran-*Blebbing*-Inhibitoren belegen, dass sowohl Gal1 (Seelenmeyer *et al.*, 2008) als auch Gal3 (Schneider, 2011) nicht über eine Knospung der Plasmamembran sekretiert werden können. Dies ist zudem konsistent mit den Erkenntnissen dieser Arbeit, dass Gal3 in der mikrovesikulären Fraktion von MDCK-Zellen nicht vorkommt. Darüber hinaus zeigt sich auch bei genauerer Analyse der von Mehul & Hughes gewonnenen Daten, dass diese zur Aufreinigung der Mikrovesikel-Population 90.000 g verwendet haben, sodass diese Fraktion durchaus auch als exosomale Fraktion gedeutet werden könnte. Interessanterweise wurde außerdem eine Gal3-Chimäre verwendet, die über ein angefügtes Lck-Segment verfügte und dementsprechend direkt an das zytoplasmatische Blatt der Plasmamembran dirigiert wurde. Das Lck-Segment besteht aus den ersten zehn Aminosäuren der p56^{lck} Tyrosinkinase, die am Glycin an Position 2 myristoyliert bzw. an den Cysteinen an Position 3 und 5 palmitoyliert wird (Koegl *et al.*, 1994). Durch die Ausstattung einer Chimäre mit diesen posttranslationalen Modifikationen ist es möglich, Gal3 und die zytoplasmatische Chloramphenicol Acetyl-Transferase (CAT) effektiv an die Plasmamembran zu lotsen (Zlatkine *et al.*, 1997). Das Lck-Segment ist jedoch allein nicht ausreichend, um die Sekretion auszulösen, da eine Chimäre aus CRD und Lck nicht sekretiert wird (Mehul & Hughes, 1997). Vielmehr wurde auch der N-Terminus von Gal3 für eine effektive Sekretion benötigt (s. dazu 4.2). Ein weiterer interessanter Aspekt ist die Größe und die Form der von der Plasmamembran abgeschnürten Vesikel: Diese erscheinen homogen rund, allerdings bei einem Durchmesser von ~500 nm, und erinnern damit eher an zu große Exosomen als an Mikrovesikel (Hughes, 1999). Zusammengenommen erscheint deshalb eine Sekretion von Gal3 mithilfe von Mikrovesikeln als eher unwahrscheinlich.

In Anbetracht der zahlreichen Studien, die gleichermaßen die Lokalisation von Gal3 in exosomalen Strukturen aufklären konnten (Thery *et al.*, 2001, Fei *et al.*, 2015, Lazar *et al.*, 2015, Xu *et al.*, 2015, Welton *et al.*, 2010, Mathivanan *et al.*, 2010, Liang *et al.*, 2013, Madrigal-Matute *et al.*, 2014, Gonzales *et al.*, 2009, Raj *et al.*, 2012, Ogawa *et al.*, 2008, Gonzalez-Begne *et al.*, 2009), sowie mit den Daten dieser Arbeit und der Visualisierung des Sortierprozesses in knospende ILVs, kann dementsprechend dieser

Exportmechanismus für die unkonventionelle Sekretion von Gal3 als gesichert angesehen werden. Überdies konnte durch die Verwendung der dominant-negativen Vps4a-Mutante und durch den *Knockdown* von Tsg101 nicht nur die exosomale Sekretion, sondern auch die allgemeine Menge an Gal3 im Medium drastisch gesenkt werden. Dies deutet darauf hin, dass die unkonventionelle Sekretion von Gal3, zumindest in MDCK-Zellen, exklusiv via Exosomen verwirklicht wird. In gewisser Weise wird dies zusätzlich durch den Befund dieser Arbeit gestützt, dass Gal3 ausschließlich in apikalen Exosomen vorkommt. Es ist dahingehend schon lange bekannt, dass die unkonventionelle Sekretion von Gal3 polarisiert ist und zuvörderst nach apikal verläuft (Lindstedt *et al.*, 1993, Sato *et al.*, 1993). Trotzdem können auch andere (Typ-III)-Routen, wie z. B. über die Autophagie (s. dazu Schneider, 2011) oder via sekretorische Autophagosomen bzw. sog. *Compartments for UPS* (CUPS) nicht gänzlich ausgeschlossen werden (Rabouille *et al.*, 2012).

Mit der Identifizierung der Exosomen als *Carrier* für die Sekretion von Gal3 ergeben sich weitere Fragen, z. B. wie die Freisetzung der Gal3-beladenen Exosomen reguliert wird. Die in dieser Arbeit generierten Daten sprechen in diesem Zusammenhang eher für eine konstitutive exosomale Gal3-Sekretion in der verwendeten MDCK-Zelllinie. Interessanterweise wurden in früheren Arbeiten Calcium-Ionophore dazu verwendet, die unkonventionelle Sekretion von Gal3 in MDCK- und in *Baby Hamster Kidney*-Zellen drastisch zu erhöhen (Lindstedt *et al.*, 1993, Sato *et al.*, 1993). Diese Ionophore induzieren einen Ca^{2+} -Influx ins Zytosol, der bekanntlich auch die Freisetzung von Exosomen erhöht (Savina *et al.*, 2003, Krämer-Albers *et al.*, 2007). Dieser Zusammenhang ist konsistent mit den DMA-Experimenten dieser Arbeit, in der die DMA-induzierte Reduktion der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration eine drastisch verringerte exosomale Gal3-Sekretion zur Folge hatte. Weiterhin scheint auch Serum-freies Medium die Sekretion von Gal3 zu verringern (Sato *et al.*, 1993). Im Gegensatz dazu erhöht eine Behandlung mit Fetuin den Gal3-Export in einer Brustkrebs-Zelllinie und kann den Effekt des Serum-freien Mediums kompensieren (Zhu & Ochieng, 2001). Eine erhöhte Gal3-Sekretion wird aber auch in Stress-, sowie Entzündungs-Reaktionen beobachtet und mit einer systemischen Insulin-Resistenz in Verbindung gebracht (Li *et al.*, 2016; vgl. auch Madrigal-Matute *et al.*, 2014, van Kimmenade & Januzzi, 2012). Inwieweit dies jedoch mit einer verstärkten Exosomen-Freisetzung korreliert, lässt sich nur schwer bewerten. Jedoch ist bekannt, dass beispielsweise bei einem absinkenden extrazellulären pH-Wert (Parolini *et al.*, 2009), sowie generell in der zellulären Stressantwort (Lehmann *et al.*, 2008, Beer *et al.*, 2015, King *et al.*, 2012, Kanemoto *et al.*, 2016) vermehrt Exosomen freigesetzt werden. Interessanterweise konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass es in der humanen Monozyten-Zelllinie THP-1,

sowohl im Medium als auch korrelierend in den Exosomen, zu einer verstärkten Sekretion von Gal3 kommt, wenn die Zellen mit der Substanz Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) behandelt wurden (Madrigal-Matute *et al.*, 2014). PMA ist ein Aktivator der Proteinkinase C und induziert zudem NADPH-Oxidase-Aktivität, die letztendlich zur Entstehung von Superoxid-Radikalen beiträgt (Zalba *et al.*, 2007).

4.2 Das PSAP-Motiv als Sortiersignal für die exosomale Sekretion von Gal3

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal die funktionelle Rolle der ESCRT-I-Komponente Tsg101 in der unkonventionellen Sekretion von Gal3 nachgewiesen werden. Tsg101 trägt dazu im N-Terminus eine UEV-Domäne, die spezifisch an P(S/T)AP-Tetrapeptide bindet (Pornillos *et al.*, 2002). Die hier vorgestellten Ergebnisse belegen, dass ein solches Tetrapeptidmotiv in Gal3 über Artgrenzen hinweg hoch konserviert ist und dass Gal3 mit ebendieser N-terminalen P(S/T)AP-Domäne eine direkte Interaktion mit der UEV-Domäne von Tsg101 eingehen kann. Diese Rekrutierung durch den ESCRT-Komplex ist schließlich essenziell für die Verpackung von Gal3 in ILVs und dementsprechend in der Folge für die exosomale Sekretion. Für ein endogenes Protein, das nicht zum ESCRT-Komplex gehört und auch kein akzessorisches Protein darstellt, ist eine solche PSAP-vermittelte Interaktion an der MVB-Membran, die zudem die Sekretion zur Folge hat, bisher noch nicht beschrieben worden. Interessanterweise erinnert dieser Prozess, bestehend aus inverser Membrankrümmung und -Abknospung, topologisch und mechanistisch an die virale Freisetzung behüllter Viren an der Plasmamembran. Dabei sind Viren gleichfalls auf die identische zelluläre Maschinerie in Form eines funktionellen ESCRT-Komplexes angewiesen. Tatsächlich benutzen virale Proteine ebenso eine P(S/T)AP-Sequenz, um über die UEV-Domäne Tsg101 direkt zu binden und dadurch den ESCRT-Komplex an die Plasmamembran zu rekrutieren (Martin-Serrano *et al.*, 2003b, Chen & Lamb, 2008).

Der in dieser Arbeit aufgedeckte PSAP-vermittelte Sekretionsprozess von Gal3 am MVB könnte somit die Blaupause für die virale Sekretion an der Plasmamembran darstellen (VerPlank *et al.*, 2001, Garrus *et al.*, 2001). Auf der anderen Seite ist es natürlich auch denkbar, dass es sich bei der PSAP-Domäne bzw. bei Teilen des N-Terminus von Gal3 um alte virale Einschübe handeln könnte (z. B. Transposons etc.; s. Sinzelle *et al.*, 2009). Bei den meisten chimären Proteinen, für die solche Prozesse beschrieben worden sind, handelt es sich jedoch um eingefügte DNA-Bindedomänen, sodass eine solche Überlegung in dieser Arbeit rein spekulativ bleiben muss. Darüber hinaus würde diese nicht die konvergente Entwicklung der PSAP- bzw. PTAP-Motive erklären, die Art-übergreifend in den verschiedenen *Hotspots* stattgefunden haben muss.

Dass der Bereich der PSAP-Domäne von herausragender Bedeutung für die unkonventionelle Sekretion von Gal3 ist, konnte bereits relativ früh in Cos-Zellen aufgeklärt werden (Menon & Hughes, 1999). Interessanterweise konnte mit der zu dieser Arbeit analogen Punktmutation der beiden Proline P90 und P93 in der YPSAPGAY-Sequenz in Hamster Gal3 die Sekretion von Gal3 unterbunden werden. Diese Entdeckung ist konsistent mit den Daten zur ASAA-Mutation in MDCK-Zellen. Da in der Arbeit von Menon & Hughes das gesamte Zellkulturmedium untersucht wurde, ist dies ein weiterer Hinweis darauf, dass die exosomale Sekretion von Gal3 den exklusiven Transportmechanismus darstellt. Darüber hinaus belegen diese Daten, dass die für die Sekretion als wichtig erachteten ersten zwölf Aminosäuren des N-Terminus keine Rolle in der Steuerung der Sekretion spielen (Gong *et al.*, 1999). Tatsächlich wurde in diesen Arbeiten jedoch Serum-freies Medium verwendet, das *per se* die Sekretion von Gal3 verringert.

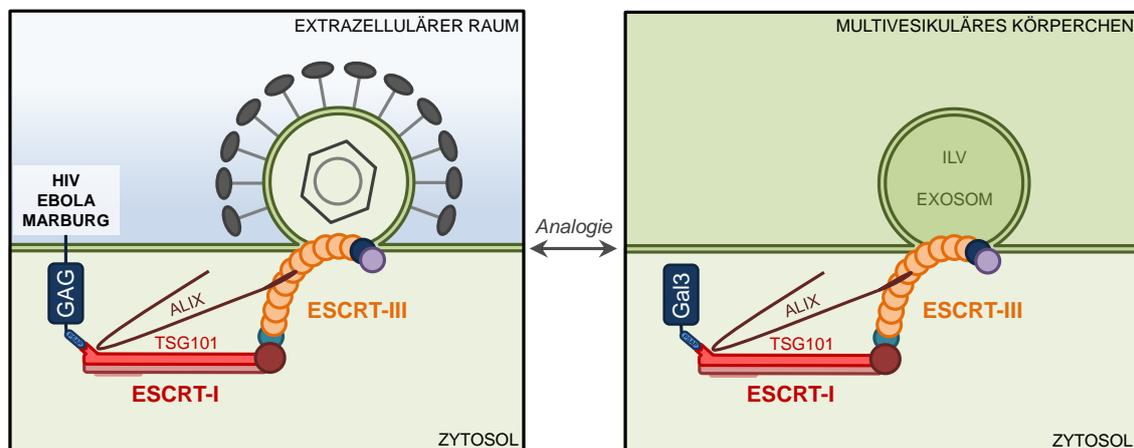


Abb. 4.2 Analogie zwischen der viralen Freisetzung und der exosomalen Gal3-Sekretion.

Ein bemerkenswerter Aspekt dieser Arbeit war die Übertragbarkeit des identifizierten PSAP-Motivs auf das neutrale, exogene Protein eGFP, was schließlich in der exosomalen Sekretion von eGFP-PSAP resultierte und auch den Anteil im Medium signifikant erhöhte. Dies deckt sich im Übrigen mit den Experimenten von Menon & Hughes, die die N-terminale Domäne von Gal3 auf die zytoplasmatische CAT (s. 4.1) übertragen und dadurch die Sekretion auslösen konnten (Menon & Hughes, 1999). Allerdings reichte die Übertragung des Oktapeptids YPSAPGAY allein nicht aus, um die Sekretion der CAT zu induzieren. Eine denkbare Erklärung für diese Beobachtung könnte sein, dass die Faltung dieses Konstrukts beeinträchtigt war oder aber auch die Zugänglichkeit der PSAP-Domäne nicht mehr gegeben war.

Der Prozess der PSAP-vermittelten Sekretion konnte auch für ein endogenes, Viren-unabhängiges Protein an der Plasmamembran beschrieben werden. So enthält das in der Plasmamembran ansässige *Arrestin Domain-containing Protein 1* (ARRDC1) ebenfalls eine hoch konservierte PSAP-Domäne und rekrutiert, ebenso durch eine

direkte Bindung an Tsg101, den ESCRT-Komplex an die Plasmamembran (Nabhan *et al.*, 2012). Die Interaktion zwischen ARRDC1 und Tsg101 wurde auch schon früher beschrieben (Rauch & Martin-Serrano, 2011). Außerdem konnte durch die Mutation der PSAP-Domäne die Bindung von ARRDC1 an Tsg101 unterbunden werden (Nabhan *et al.*, 2012). Eine weitere frappierende Analogie zu dem hier entdeckten Mechanismus ist die Tatsache, dass die PSAP-Domäne dazu ausreicht, um für die Verpackung des Proteins und die Abknospung von Vesikeln zu sorgen, nur eben als Mikrovesikel von der Plasmamembran. Die direkt abgeschnürten Vesikel ähneln auch in ihrer Form und Größe den Exosomen. Zudem wird für diesen Prozess auch die Aktivität von Vps4 benötigt, wobei die dominant-negative Mutante E228Q den Prozess fast komplett stoppte. Für den erfolgreichen Export von ARRDC1 ist die Lokalisation an der Plasmamembran unabdingbar, da Mutationen in der an die Plasmamembran dirigierenden Arrestin-Domäne die PSAP-vermittelte Sekretion des Proteins aufheben. Die Studien von Nabhan und Kollegen sind ebenfalls beim Vergleich mit der korrespondierenden Untersuchung der Membran-verankerten Lck-Gal3-Chimäre (s. 4.1) überaus aufschlussreich (Mehul & Hughes, 1997). Tatsächlich kongruieren beide Beobachtungen stark und könnte erklären, warum Gal3 bzw. die N-terminale Domäne von Gal3 bei einer Verankerung in der Plasmamembran in Mikrovesikel verpackt wird. Diese These wird zudem noch untermauert von der Tatsache, dass Mehul & Hughes die Vesikel bei 90.000 g pelletiert und aufgereinigt haben. Lediglich die beobachtete Größe der Mikrovesikel in den Studien von Hughes stimmt nicht ganz mit der Größe der ARRDC1-Mikrovesikel überein (vgl. Hughes, 1999). Es wäre in diesem Zusammenhang sehr interessant herauszufinden, ob das Membran-verankerte Lck-Gal3-Fusionsprotein mithilfe von Tsg101 und dem ESCRT-Komplex in die Mikrovesikel verpackt wird. Damit könnte auch die kontroverse Debatte um eine mögliche Sekretion von Gal3 via Mikrovesikel entkräftet werden, da die Studie von Mehul & Hughes das „Leitpapier“ zur mikrovesikulären Sekretion darstellt.

Interessanterweise hat die PSAP-Domäne keinen Einfluss auf die Lokalisation des mutierten ARRDC1 (Nabhan *et al.*, 2012). Dies erlaubt die spekulative Annahme, dass ebenso Gal3 nicht durch die PSAP-Domäne an die MVB-Membran rekrutiert wird, sondern durch die Interaktion mit weiteren Bindepartnern. Dies deckt sich auch mit den Ergebnissen, die mithilfe der Gal3-ASAA-Mutanten generiert werden konnten. Der wahrscheinlichste Bindepartner ist in dieser Hinsicht Alix, das auch im GFP-*Pull-down* nachgewiesen werden konnte. Die Interaktion zwischen Gal3 und Alix ist dahingehend in der Literatur sehr gut dokumentiert (Chen *et al.*, 2009, Liu *et al.*, 2012). Angesichts der Ergebnisse dieser Arbeit und dem Nachweis der direkten Bindung von Tsg101 und Gal3 sollte jedoch auch bedacht werden, dass die berichteten Interaktionen zwischen Alix und

Gal3 auch indirekter Natur sein könnten, d. h. über die Wechselwirkung mit Tsg101. Dies kann jedoch weitgehend ausgeschlossen werden, da Chen und Kollegen neben einer Immunpräzipitation auch einen *Yeast-two-Hybrid-Assay* zur Auffindung der Proteininteraktion verwendeten. Bemerkenswert ist bezüglich der Gal3-Alix-Interaktion zudem, dass Gal3, durch die Rekrutierung von Alix, die Freisetzung von HIV an der Plasmamembran erheblich steigern kann (Wang *et al.*, 2014). Erstaunlicherweise zeigte sich, dass eine Überexpression von Alix die virale Freisetzung von PTAP-Mutanten komplett ausgleichen konnte, die normalerweise auf die Interaktion zwischen der viralen PTAP-Domäne und Tsg101 essenziell angewiesen sind (Usami *et al.*, 2007). Während die Bindestellen für Tsg101 und weitere bekannte Proteine in Alix verzichtbar erscheinen, führte die Deletion der C-terminalen Region in der prolinreichen Domäne wiederum zu einer verringerten Virus-Freisetzung und stoppte folglich den Ausgleich durch die Überexpression. Daraus wurde gefolgert, dass ein noch nicht identifizierter Bindepartner für die Alix-vermittelte Virus-Freisetzung benötigt wird, der an dieser Stelle mit Alix interagiert (Usami *et al.*, 2007, Fujii *et al.*, 2007). Tatsächlich scheint genau diese prolinreiche Domäne für die Wechselwirkung zwischen Gal3 und Alix verantwortlich zu sein (Wang *et al.*, 2014), sodass vorstellbar wäre, dass Gal3 durch die Rekrutierung von Alix die essenzielle PSAP-Domäne für die Freisetzung der Viren liefern könnte. Es wäre deshalb von großem Interesse herauszufinden, ob die Interaktion zwischen Alix und Gal3 die Rekrutierung von Tsg101 an die Plasmamembran induziert und so die virale Freisetzung ermöglicht. Wang und Kollegen konnten allerdings im Gegensatz zu dieser Arbeit neben Alix keine Interaktion zwischen Gal3 und Tsg101 in ihrer Ko-Immunpräzipitation ausmachen (Wang *et al.*, 2014). Für diese Interaktionsstudie verwendeten Wang und Kollegen HEK293T-Zellen, die transient mit Gal3-FLAG transfiziert worden waren, sodass Gal3-FLAG als stationäre Phase dienen konnte. Bei genauerer Analyse kann man sich jedoch das negative Resultat für Tsg101 erklären, da die benutzten Antikörper gegen Tsg101 im Vergleich z. B. zu denen, die gegen Alix gerichtet waren, deutlich schwächer erscheinen. Vor allem aber könnte die schwere Kette der Antikörper-Kontamination, aufgrund des sehr ähnlichen Molekulargewichts zu Tsg101, eine möglicherweise positive Tsg101-Bande maskieren. Tatsächlich sind die Banden der schweren Kette derart dominant im Vergleich mit Tsg101 im *Input*, dass eine positive Tsg101-Bande vor diesem Hintergrund sehr unwahrscheinlich ist. Dies wird besonders klar, wenn man die Signalintensitäten der positiven Präzipitation von Alix und Gal3 vergleicht, die im Vergleich zum *Input* deutlich schwächer erscheinen. Bezogen auf die schwachen Banden von Tsg101, wäre selbst bei einer positiven Präzipitation von Tsg101 kein Signal zu erwarten. Im Übrigen sollte sich, angesichts der sehr guten Ko-Präzipitation von Alix, *per se* ein positives Signal für Tsg101 ergeben, da zwischen

beiden Proteinen eine PSAP-vermittelte Interaktion besteht. Nichtsdestotrotz sollte infolge dieses negativen Ergebnisses in Zukunft überprüft werden, ob die Interaktion zwischen Gal3 und Tsg101 auch in anderen humanen Zelllinien bestätigt werden kann. Hier werden jedoch auch die Vorteile der *Nanobody*-Immunpräzipitation offenbar, die neben der hohen Affinität in keinem Fall das positive Tsg101-Signal durch eine Antikörper-Kontamination maskieren könnte.

Ein weiterer wichtiger Gesichtspunkt ist der SNP (rs4652, PSAP→PSAT), der in der humanen PSAP-Domäne von Gal3 beschrieben wurde. Tatsächlich ist die PSAP-Version, d. h. das Allel C, die Urform des humanen Gal3. Aus diesem Grund ist das Allel A bzw. Gal3-PSAT praktisch kaum in der Sub-Sahara Population des Menschen anzutreffen. In Eurasiern ist jedoch das Allel A, d. h. Gal3-PSAT, häufiger als Gal3-PSAP vertreten. Es stellt sich die Frage, inwieweit dieser SNP einen Einfluss auf die exosomale Sekretion von Gal3 hat. Die Ergebnisse, die in dieser Arbeit gewonnen werden konnten, suggerieren, dass die Interaktion zwischen Gal3 und Tsg101 zwar abgeschwächt, aber dennoch erhalten bleibt. Auch die exosomale Sekretion von Gal3-PSAT konnte beobachtet werden. Dass der SNP einen Einfluss auf die Gal3-Sekretion und folglich auf den Serumlevel haben könnte, zeigt eine Genomweite Assoziationsstudie (de Boer *et al.*, 2012). Dabei scheint der SNP rs4652 stark mit der Gal3-Konzentration im Plasma assoziiert zu sein. Interessanterweise konnte festgestellt werden, dass der Genotyp CA/AA ein signifikant erhöhtes Risiko hat, an einem Magenkarzinom zu erkranken (Shi *et al.*, 2017). Leider wurden dabei keine Serum- bzw. Plasma-Konzentrationen von Gal3 bestimmt, sodass eine Einordnung in Hinblick auf eine gesteigerte oder verminderte Sekretion schwierig ist. In Hinblick auf die pathologischen Eigenschaften des Magenkarzinoms, wie z. B. Tumorgroße, Invasionstiefe und Metastasierung, auf die extrazelluläres Gal3 (und dessen Konzentration) typischerweise einen großen Einfluss hat (s. 4.4), konnten jedoch keine Einflüsse des SNPs nachgewiesen werden. Eine weitere Studie bezüglich des SNPs lieferte zudem widersprüchliche Daten in Hinblick auf die Ergebnisse dieser Arbeit (Hu *et al.*, 2011). Hu und Kollegen untersuchten, welche Gal3-Variante bzw. welches Allel mit einer erhöhten Gal3-Konzentration im Serum von Patienten mit rheumatoider Arthritis assoziiert ist. Frühere Studien konnten nämlich zeigen, dass eine erhöhte Gal3-Konzentration im Plasma mit der Progression dieser Krankheit korreliert (Shou *et al.*, 2006). Tatsächlich scheint die Serumkonzentration von Gal3 in Patienten mit AC/CC-Genotyp niedriger zu sein, als in dem Serum von Patienten mit AA-Genotyp (Hu *et al.*, 2011). Bezogen auf unsere Daten würde dies bedeuten, dass Gal3-PSAT besser sekretiert werden sollte als Gal3-PSAP. Gleichwohl sollte man hier bedenken, dass diese Bestimmung in Patientengruppen mit rheumatoider Arthritis stattgefunden hat, in der noch unzählige andere Faktoren eine Rolle in der Gal3-

Sekretion spielen könnten. Leider wurden in gesunden Individuen keine Messungen der Gal3-Konzentration vorgenommen, die einen direkten Vergleich und eine Einordnung ermöglicht hätten. Interessanterweise konnte die Studie aber weiterhin feststellen, dass das C-Allel signifikant häufiger in Patienten mit rheumatoider Arthritis vorkommt, d. h. Menschen mit C-Allel haben eine höhere Wahrscheinlichkeit an rheumatoider Arthritis zu erkranken. Da bekannt ist, dass rheumatoide Arthritis mit einer erhöhten Gal3-Konzentration zusammenhängt, würde diese Erkenntnis eher zu den Ergebnissen passen, dass Gal3-PSAT mit einer etwas geringeren exosomalenen Gal3-Sekretion einhergeht. Zusammengenommen sind Schlussfolgerungen in Hinsicht auf diese Arbeit, auch aufgrund der derzeit noch schwachen Datenlage bezüglich des SNPs, relativ schwierig. Es wäre sicherlich interessant in zukünftigen Studien die Rolle des SNPs, bezogen auf die Sekretion von Gal3, näher zu beleuchten. Des Weiteren stellt sich die Frage, ob noch weitere Krankheiten des Menschen mit dem SN-Polymorphismus assoziiert sind.

Daneben konnten keine weiteren Spezies gefunden werden, die eine solche Variation der PSAP-Domäne aufweisen. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang jedoch, dass einige Pilz-Galektine eine PSIT-Sequenz beherbergen und ebenfalls unkonventionell sekretiert werden (Boulianne *et al.*, 2000). Allerdings ist die Sekretion von CGL-2, ein Vertreter dieser Pilz-Galektine, auf die Zuckerbindekapazität der CRD angewiesen (Seelenmeyer *et al.*, 2005), sodass eine PSAP-vermittelte Sekretion eher unwahrscheinlich erscheint. Zudem verdeutlicht die genauere Analyse der PSAP-UEV-Interaktion (die hauptsächlich im viralen Kontext stattfand), dass das zweite Prolin der PSAP-Domäne, neben dem Alanin, essenziell für eine effektive Bindung ist (Schlundt *et al.*, 2009). Vor diesem Hintergrund erscheint die Abnahme der Bindungseffizienz von Gal3-PSAT plausibel zu sein. Alanin und das zweite Prolin werden in eine tiefe Tasche der UEV-Domäne rekrutiert, die besonders wichtig für die PSAP-UEV-Interaktion ist (Pornillos *et al.*, 2002). Diese Tasche hat eine strukturelle Ähnlichkeit zu SH3-Domänen, sodass es nicht verwunderlich ist, dass die PSAP-Domäne eine linksgängige Polyprolin-II-Helix vorweist. Interessanterweise kann ein unmittelbar auf die PSAP-Domäne folgendes Prolin diese Helix stabilisieren (Schlundt *et al.*, 2009), sodass sich für die PTAP-Sequenz in HIV, die über ein solches C-terminal angefügtes Prolin verfügt, eine deutlich höhere Affinität ergibt, als die von dem endogenen Hrs, bei dem ein Valin auf die PSAP-Sequenz folgt (Pornillos *et al.*, 2003). Die in diesen Arbeiten und auch in anderen Studien ermittelten Dissoziationskonstanten für die PSAP-UEV-Interaktion sind etwas größer (Garrus *et al.*, 2001), als die hier ermittelten Werte für die Bindung von Gal3 an Tsg101. Dies könnte zum einen methodisch bedingt sein, da z. B. im Gegensatz zu dieser Arbeit in beiden Studien immobilisierte Fusionspeptide verwendet wurden, zum

anderen aber auch mit Gal3 zusammenhängen, da dieses im MST-Versuchsaufbau evtl. auch unspezifische Wechselwirkungen eingegangen sein könnte. Dies ist in Hinblick auf den im Vergleich mit Garrus und Kollegen geringeren Abfall bei einer mutierten PSAP-Domäne durchaus denkbar. Die hier beobachtete, spezieübergreifende Konvergenz des PSAP- bzw. PTAP-Motivs in Gal3 erklärt sich ebenfalls durch diese Studien. So waren die beiden Aminosäuren Serin und Threonin gegeneinander austauschbar, ohne die Affinität signifikant zu verändern (Schlundt *et al.*, 2009; vgl. auch Pornillos *et al.*, 2003), was folglich einerseits die Wichtigkeit dieser Domäne für die Funktion von Gal3 und andererseits die Analogie zur viralen *Late*-Domäne unterstreicht. Bemerkenswert ist zudem, dass das erste Prolin für eine effektive Interaktion mit der UEV-Domäne nicht essenziell ist. Schlundt und Kollegen konnten dahingehend nachweisen, dass Peptide im Phagen-Display mit einer ASAP-Sequenz ebenso mit der UEV interagieren konnten. Darüber hinaus konnten auch in einem *Pull-down*-Experiment zelluläre Proteine identifiziert werden, wie z. B. das *Ataxin-2-like*-Protein oder Caprin-1, die über die ASAP-Domäne an Tsg101 binden konnten.

Erstaunlicherweise weist der hier aufgedeckte Prozess der PSAP-vermittelten Verpackung in ILVs bedeutende Parallelen mit der Syntenin-Sortierung am MVB auf, die schließlich ebenfalls in der exosomalen Sekretion von Syntenin kulminiert (Baietti *et al.*, 2012). Dabei interagiert Syntenin über drei YPX_nL-Motive direkt mit Alix, und imitiert damit die zweite Klasse an *Late*-Domänen, die in der viralen Knospung beschrieben worden sind (Strack *et al.*, 2003). Da Syntenin über PDZ-Domänen einerseits mit der Membran und andererseits mit Syndecanen interagiert (Grootjans *et al.*, 1997, Grootjans *et al.*, 2000, Zimmermann *et al.*, 2002), kommt es zusammen mit Alix zur Ausbildung von dreigliedrigen Komplexen (Baietti *et al.*, 2012), die schließlich zur Akkumulation und Abschnürung von ILVs führen. Die Syndecane werden damit durch die Rekrutierung von Syntenin und, wiederum über dessen direkte Bindung an Alix, in Exosomen verpackt. Als weiteres Cargoprotein von Syntenin konnte die zytoplasmatische Lysyl-tRNA-Synthetase identifiziert werden (Kim *et al.*, 2017). Der Syndecan-Syntenin-Alix-Komplex spielt ebenfalls eine funktionelle Rolle in der ILV-Biogenese (vgl. 4.5). So konnte nachgewiesen werden, dass Syntenin in der humanen Brustkrebs-Zelllinie MCF-7 vor allem einen Einfluss auf die Bildung der Exosomen hat, d. h. mehr die Anzahl bestimmt als deren Beladung (Baietti *et al.*, 2012). Syntenin reguliert folglich vor allem die Biogenese von Exosomen, die mit CD63 und Hsp70 beladen sind. Flotillin-1-haltige Exosomen scheinen davon ausgenommen zu sein. Bemerkenswert ist darüber hinaus, dass dieser Prozess nicht auf Vps4 angewiesen zu sein scheint, da die Expression der dominant-negativen Variante keinen Einfluss auf die Biogenese von Syntenin-Exosomen hatte, wohl aber ein siRNA-vermittelter *Knockdown* (Baietti *et al.*, 2012). Dies könnte

darauf hinweisen, dass das Vps4-vermittelte Recycling der ESCRT-III-Filamente, also die ATPase-Wirkung, für Syntenin-Exosomen nicht benötigt wird, aber eine (andere) Rolle von Vps4 in der Membran-Abschnürung möglicherweise zwingend erforderlich ist (Friand *et al.*, 2015). In diese Richtung weisen zumindest einige Arbeiten, in denen Vps4 neben dem Recycling der ESCRT-III-Komponenten, ebenfalls eine direkte Rolle in der ILV-Abschnürung und der Membranmodulation einnimmt (Henne *et al.*, 2011, Jouvenet *et al.*, 2011). Neuere Arbeiten zeigen jedoch, dass die Abschnürung von ILVs auf ein sehr dynamisches Zusammenspiel von ESCRT-III und Vps4 (inklusive ATPase-Funktion) angewiesen ist (Adell *et al.*, 2017, Mierzwa *et al.*, 2017), sodass eine Einordnung der kontroversen Wirkung von Vps4 auf die Syntenin-vermittelte Sekretion von Exosomen in den Studien von Baietti und Kollegen schwierig erscheint. Gleichzeitig gilt es zu bedenken, dass die Expression der dominant-negativen Mutante einen erheblichen Einfluss auf die Zellviabilität hat und Kontaminationen mit apoptotischen Vesikeln nicht ausgeschlossen werden können.

Ein weiterer, interessanter Aspekt ist in dieser Hinsicht jedoch, dass die Syntenin-vermittelte Exosomen-Biogenese noch auf einer anderen Abschnürungs-Maschinerie basieren könnte. Tatsächlich existiert möglicherweise eine zweite Achse der ILV-Biogenese, die unabhängig vom ESCRT-Superkomplex auf der Wirkung des Sphingolipids Ceramid und der Aktivität der Sphingomyelinase-2 basiert. Erste Hinweise lieferten dahingehend Arbeiten, die feststellten, dass in einer Oligodendrozyten-Zelllinie der Maus die exosomale Sortierung des Proteolipid-Proteins PLP nicht vom ESCRT-Komplex abhängt, sondern von Ceramiden (Trajkovic *et al.*, 2008). Ceramide haben eine kegelartige Struktur, die Lipid-Kurvaturen induziert. Dadurch könnten diese für die ILV-Biogenese und die Rekrutierung von Ceramid-assoziierten Molekülen sorgen (Friand *et al.*, 2015). Die neutrale Sphingomyelinase-2 (nSMase2), die für die Generierung von Ceramiden in der Zelle zuständig ist, ist zudem an der exosomalen Sekretion von miRNAs beteiligt (Kosaka *et al.*, 2010). Passenderweise verringert ein *Knockdown* der nSMase2 die Sekretion von Syntenin-Exosomen (Baietti *et al.*, 2012). Trotzdem ist die Syntenin-vermittelte Exosomen-Biogenese nicht gänzlich unabhängig vom ESCRT. Das zeigen die RNA_i-Experimente gegen ESCRT-II-Komponenten. Daneben scheint auch die kleine GTPase ARF6 eine Rolle bei der Syntenin-vermittelten Exosomen-Biogenese zu spielen (Ghossoub *et al.*, 2014).

Konsistent mit der Annahme, dass der Mechanismus über Syntenin/Alix bzw. Ceramid/nSMase2 eine zweite Achse zur exosomalen Biogenese bildet, konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass Gal3 höchstwahrscheinlich nicht mit Syntenin interagiert. Darüber hinaus konnte in Gal3 auch kein adäquates Interaktionsmotiv identifiziert werden, wie z. B. eine PDZ-Domäne, das eine solche Interaktion erklären

könnte. Dies deckte sich zudem mit den Arbeiten von Dr. Dominik Schneider, der mithilfe des nSMase-Inhibitors GW4869 zeigen konnte, dass die exosomale Sekretion von Gal3 Ceramid-unabhängig ist (unveröffentlichte Daten). Unterstrichen wird dieser Gegensatz zudem durch die Verwendung einer alternativen, zweiten *Late*-Domänensequenz in Syntenin, die im Gegensatz zu Gal3 nicht Tsg101, sondern Alix rekrutiert. Zusammengenommen lässt sich deshalb feststellen, dass diese alternative Route äußerst interessante Parallelen mit der exosomalen Sekretion von Gal3 aufweist, die zudem in Hinblick auf eine etwaige funktionelle Rolle (s. 4.5) in Zukunft noch erweitert werden könnten. Des Weiteren zeigt der Syntenin-vermittelte Prozess, dass es mehrere Mechanismen in der Zelle geben könnte, die nebeneinander die Sortierung von Cargoproteinen und die Biogenese von ILVs bewältigen und dabei auf einer, aus der viralen Knospung bekannten, *Late*-Domäne beruhen.

4.3 Die Freisetzung von exosomalem Gal3

Wie wird Gal3 aus dem Lumen der membranumschlossenen Exosomen im Extrazellularraum wieder freigesetzt? Dies stellt für diese Arbeit eine besonders wichtige Frage dar, ist allerdings gleichzeitig am wenigsten erforscht. So gibt es in der Literatur nur sehr wenige Arbeiten, die die Freisetzung eines exosomalen Proteins in den extrazellulären Raum untersucht haben. Im Hinblick auf Gal3 wäre ein solcher Freisetzungsmechanismus allerdings die Grundvoraussetzung, um zu erklären, wie Gal3 sowohl seinen vielfältigen Aufgaben als frei lösliches Protein im extrazellulären Raum, als auch als Sortierrezeptor im endosomalen Kompartiment nachgehen kann.

Die Stabilität der Exosomen ist in PBS (Schneider, 2011) und auch im humanen Plasma sehr hoch (Kalra *et al.*, 2013), sodass ein spontanes Auseinanderbrechen der exosomalen Membran kaum vorstellbar ist. Kalra und Kollegen konnten zeigen, dass die Exosomen über einen Zeitraum von 90 Tagen ihre Integrität erhalten haben. Allerdings wurden diese Experimente, anders als in der Dissertation von Dr. Dominik Schneider, nicht mithilfe eines Proteinase-Sensitivitätstests abgesichert. Nichtsdestotrotz konnten Kalra und Kollegen zeigen, dass die Exosomen, auch nach dieser langen Lagerung bei unterschiedlichen Temperaturen, ihr physiologisches Potenzial zur Fusion mit der Plasmamembran nicht verloren hatten. Eine Verringerung des pH-Wertes scheint ebenfalls kaum einen Einfluss auf die exosomale Stabilität zu haben (Schneider, 2011), obwohl dies für Mikrovesikel bereits diskutiert wurde (Taraboletti *et al.*, 2006). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei der Freisetzung exosomaler Proteine höchstwahrscheinlich zelluläre Faktoren aktiv beteiligt sind. Dies sollte, angesichts der großen Bedeutung für das gesamte Feld der exosomalen Sekretion, in zukünftigen Arbeiten überprüft werden (s. dazu 4.5). Der zugrundeliegende Mechanismus für eine solche aktive Freisetzung aus den Exosomen ist bislang aber noch unbekannt und auch kaum untersucht. Nur für Hsp60 wurde die direkte Freisetzung aus Exosomen bereits

analysiert und diskutiert, aber es konnte ebenfalls nicht erklärt werden, wie Hsp60 die Exosomen schlussendlich verlassen könnte (Malik *et al.*, 2013).

Drei verschiedene Mechanismen sind denkbar für die Freisetzung von exosomalem Gal3: 1. Die direkte Translokation über die exosomale Membran. Ein solch unmittelbarer Übertritt erscheint die einfachste Erklärung für die Freisetzung eines exosomalen Proteins zu sein, gleichzeitig aber auch die biochemisch komplizierteste, da dazu eine Pore, ein Transporter (s. 1.4 und 4.1) oder aber auch ein noch komplexerer Vorgang benötigt werden würde. Interessanterweise existiert in dieser Hinsicht die Studie von Lukyanov und Kollegen, in der Gal3 *in vitro* ohne die Zugabe von exogenen Faktoren in einem Energie-unabhängigen Prozess die artifizielle Membran von Liposomen überqueren konnte (Lukyanov *et al.*, 2005). Ein möglicherweise ähnlicher Mechanismus wurde auch in Bezug auf mikrovesikuläres Gal3 beschrieben, das die Membran ebenfalls überwinden konnte (Mehul & Hughes, 1997). Dabei wurden Sensitivitätstests auf einen Proteinabbau angewandt und Gal3-Abbauprodukte mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Darüber hinaus hatten diese Experimente, im Gegensatz zu den Daten von Lukyanov und Kollegen, einen zellulären Hintergrund, d. h. *in situ* (vgl. auch 4.2). Neben der spontanen Auflösung der Exosomenmembran wurde darin auch die Möglichkeit eines Mechanismus mithilfe eines Chaperons diskutiert, wie z. B. Hsp70 (vgl. z. B. Craig, 2018). 2. Die zelluläre Internalisierung von Gal3-beladenen Exosomen in das endosomale Kompartiment, das schließlich im Lysosom aufgeht. Daraufhin könnte die Membran der internalisierten Exosomen im späten Endosom/Lysosom durch Lipasen abgebaut und der Inhalt freigegeben werden. Gal3 könnte daraufhin recycelt werden und dadurch zurück in das endosomale Kompartiment bzw. den Extrazellularraum gelangen. Interessanterweise konnte nachgewiesen werden, dass Gal3 mit den *Lysosome-associated Membrane* Proteinen LAMP-1 und LAMP-2 interagiert (Inohara & Raz, 1994, Dong & Hughes, 1997). Daraus ergibt sich zudem eine weitere Möglichkeit des Gal3-Recyclings: Durch die Interaktion mit diesen Proteinen könnte Gal3 an die Zelloberfläche gelangen, da beide Proteine in der zellulären Membranreparatur durch eine sog. lysosomale Exozytose direkt in die Plasmamembran transloziert werden (Reddy *et al.*, 2001). Durch die Wechselwirkung mit diesen stark glykosylierten Proteinen könnte Gal3 ebenfalls vor dem Abbau durch lysosomale Proteasen geschützt werden. Tatsächlich konnte Gal3 durch proteomische Analysen in sekretorischen Lysosomen und Melanosomen nachgewiesen werden (Schmidt *et al.*, 2011, Basrur *et al.*, 2003). 3. Die Auflösung der Lysosomen im extrazellulären Raum durch sekretierte Lipasen. Dieser Mechanismus wäre folglich vergleichbar mit dem zweiten Punkt, jedoch mit dem Unterschied, dass die Exosomen direkt an Ort und Stelle im Extrazellularraum aufgebrochen würden, um ihren Inhalt freizugeben. Dies hätte auch den Vorteil, dass

der exosomale Cargo, z. B. bei einer Inflammation, direkt am Wirkungsort befreit werden könnte, um seine Wirkung voll entfalten zu können. Ein solcher Prozess wurde beispielsweise bereits für IL-1 β diskutiert (Qu *et al.*, 2007). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass noch einige Studien benötigt werden, um die physiologische Relevanz der Freisetzung von exosomalem Gal3 abschließend bewerten zu können. Da jedoch in dieser Arbeit und auch in unabhängigen Studien der Gal3-Gehalt des Mediums mit dem in der exosomalen Fraktion korrelierte, kann dies als ein Hinweis betrachtet werden, dass das freie Gal3 möglicherweise aus dem exosomalen Pool hervorgegangen ist (Madrigal-Matute *et al.*, 2014).

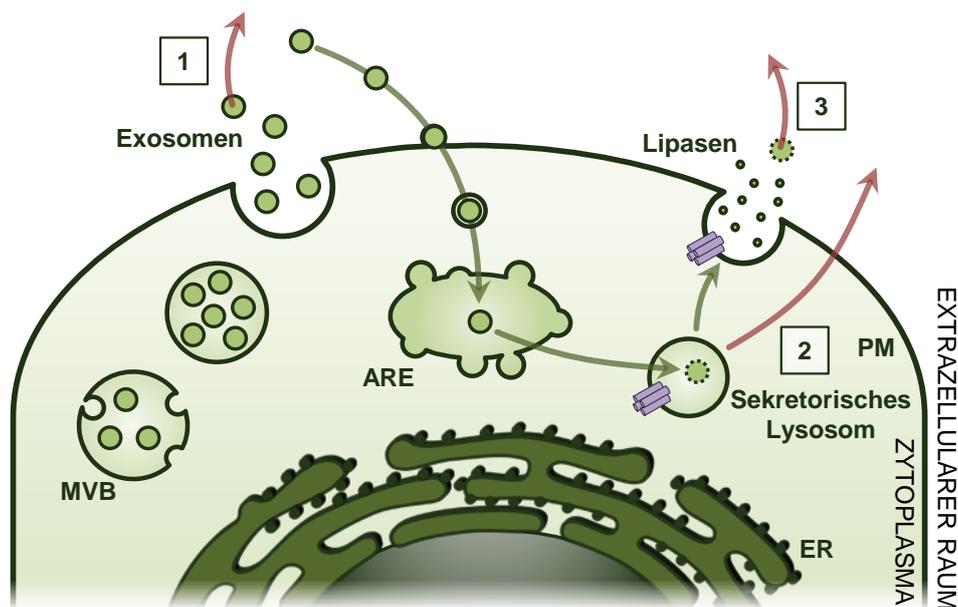


Abb. 4.3 Mögliche Mechanismen zur Freisetzung von exosomalem Gal3. (1) Gal3 könnte direkt über die exosomale Membran hinweg das Lumen verlassen. (2) Denkbar wäre auch, dass die Gal3-beladenen Exosomen nach der Endozytose und dem Transit durch das endosomale Kompartiment im Lysosom abgebaut werden, sodass Gal3 befreit wird. Daraufhin könnte das nunmehr freie Gal3 durch das Endosom zum Extrazellulärraum recycelt werden. Alternativ könnte Gal3 mithilfe von sekretorischen Lysosomen direkt in den extrazellulären Raum gelangen. (3) Gal3 enthaltene Exosomen könnten auch direkt im Extrazellulärraum aufgelöst werden. Dies könnte mithilfe von freigesetzten Lipasen geschehen.

Zumal allerdings noch nicht sicher ist, ob und wie exosomales Gal3 freigesetzt werden kann, soll an dieser Stelle betont werden, dass die Gal3-beladenen Exosomen durchaus auch als *Carrier* zwischen Zellen in unmittelbarer Nähe, aber auch unter Einfluss des Blutkreislaufs mit weiter entfernten Zellen ausgetauscht werden könnten. Durch die Fusion mit der Plasmamembran könnten die Exosomen anderer Zellen aufgenommen werden, sodass Gal3 auf die vielen bekannten intrazellulären Signalwege einwirken könnte. Dazu zählen z. B. die Apoptose (Yang *et al.*, 1996), verschiedene Signaltransduktionswege und die Genexpression (Funasaka *et al.*, 2014). Die Bedeutung der interzellulären Kommunikation durch die Übertragung von exosomalen Proteinen ist durch zahlreiche Publikationen belegt und spielt besonders in der Tumorprogression und Metastasierung eine wichtige Rolle (Parolini *et al.*, 2009, Skog *et al.*, 2008). Der genaue Aufnahme-Mechanismus der Exosomen wird in der Literatur

jedoch sehr kontrovers diskutiert (s. Abb. 4.4). Es wurden dahingehend z. B. die Clathrin-abhängige Endozytose (Escrevente *et al.*, 2011), die Phagozytose (Feng *et al.*, 2010), die Makropinozytose (Fitzner *et al.*, 2011), und die Fusion mit der Plasma- bzw. der endosomalen Membran beschrieben (Montecalvo *et al.*, 2012).

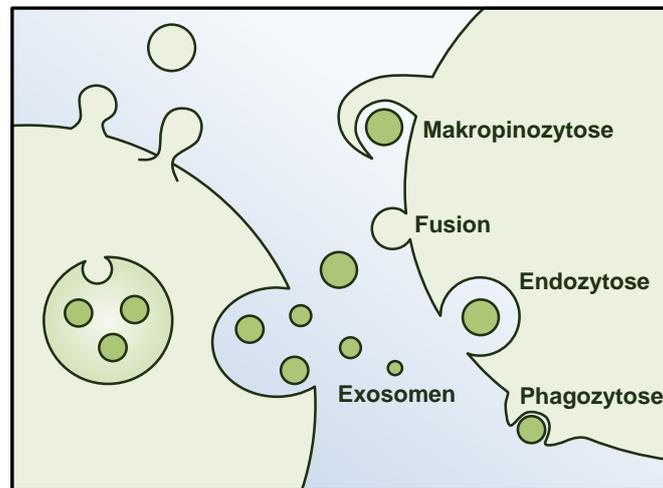


Abb. 4.4 Die diskutierten Mechanismen der Exosomen-Internalisierung.

4.4 Freies Gal3 im extrazellulären Raum

Frei lösliches Gal3 spielt in vielerlei Hinsicht eine wichtige Rolle im Extrazellulärraum (und im endosomalen Kompartiment). Dabei ist im extrazellulären Raum die Zucker-abhängige Quervernetzung von Proteinen zu hochmolekularen Clustern das Hauptwirkungsmotiv von Gal3. Dieses Protein-Crosslinking betrifft neben der apikalen Proteinsortierung (s. 1.2.2) vor allem die drei Hauptwirkungsorte von extrazellulärem Gal3: Die Immunantwort, die Tumorgenese und die Zell-Zell-Interaktionen. Gal3 kann dabei direkt in die Signaltransduktion eingreifen. Dieser Eingriff beruht im Grunde auf zwei Prinzipien: 1. Die Beeinflussung des Signal-Thresholds (T-Zellrezeptor; TCR). 2. Die Beeinflussung des Rezeptor-Turnovers (EGFR).

Um die Entstehung von Autoimmunkrankheiten zu verhindern, ist die Erkennung von körpereigenen Selbst-Antigenen essenziell. Aus diesem Grund werden im jugendlichen Thymus autoreaktive T-Zellen ausgeschlossen. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von negativer Selektion. Gal1 ist ein potenter Modulator des Gleichgewichts hin zur negativen Selektion, indem es die Signaltransduktion des TCRs erhöht (Vespa *et al.*, 1999, Liu *et al.*, 2008). Dies spiegelt sich auch in Gal1-Knockout-Mäusen wider, die folglich eine erhöhte Neigung zu Autoimmunkrankheiten aufweisen (Toscano *et al.*, 2007). Gal3 scheint ebenfalls in diesen Prozess eingebunden zu sein, was mithilfe des Mgat5-Knockout-Mausmodells belegt werden konnte. Das Gen Mgat5 codiert für die GlcNAc Transferase V, die als sog. *Branching*-Enzym für die Verzweigung von N-Glykan-Intermediaten und den Einbau von Polylaktosamin-Sequenzen verantwortlich ist. Gal3 bindet bevorzugt an diese stark verzweigten N-Glykane, die von Mgat5 modifiziert wurden (Hirabayashi *et al.*, 2002, Dennis & Brewer, 2013). Der Mgat5-

Knockout resultiert im Mausmodell in einer verringerten Assoziation von Gal3 und dem TCR, was die Signalkaskade *downstream* verändert, wie z. B. den Calcium-Influx (Demetriou *et al.*, 2001, Chen *et al.*, 2007). Des Weiteren verfügen *Mgat5-Knockout*-Mäuse ebenfalls über eine gesteigerte Anfälligkeit gegenüber Autoimmunkrankheiten (Demetriou *et al.*, 2001). Anhand dessen geht man davon aus, dass neben Gal1 auch Gal3 für die Quervernetzung des TCRs mit Agonist-Antigen-Komplexen sorgt, die in der Immunantwort die Signaltransduktion verstärkt und mithilfe der negativen Selektion den Schutz vor Autoimmunkrankheiten garantiert.

Dagegen spielt die Wechselwirkung von Gal3-Clustern mit dem EGFR in der Tumorgenese eine entscheidende Rolle. Es konnte z. B. nachgewiesen werden, dass die Kolokalisation von Gal3 und EGFR in *Mgat5-Knockout*-Zellen aufgehoben ist, was ebenfalls in einer verminderten Sensitivität gegenüber EGF resultiert (Partridge *et al.*, 2004). Es konnte dahingehend ein Modell erstellt werden, nach dem der EGFR durch die Gal3 induzierte Quervernetzung in hochmolekularen Clustern an der Plasmamembran festgehalten und dementsprechend die Endozytose des Rezeptors unterdrückt wird. Tatsächlich führte die Auflösung dieser Cluster durch eine Laktose-Behandlung zu einer verringerten EGF-Antwort und einer erhöhten Kolokalisation des EGFRs mit endosomalen Strukturen, was die Regulation durch Gal3 bestätigt (vgl. auch Lajoie *et al.*, 2007). Die Regulation des TGF β - und VEGF-Rezeptors verläuft interessanterweise nach demselben Prinzip, sodass Gal3 auch die Angiogenese und Tumorgenese beeinflussen kann (Partridge *et al.*, 2004, Markowska *et al.*, 2011).

Gal3 greift gleichermaßen mechanistisch in die Zelladhäsion ein. Auch hier erfolgt die Wirkung über die Quervernetzung von Glykoproteinen und Glykolipiden zu Clustern. So wird z. B. die *Focal Adhesion Kinase* (FAK) durch Gal3/ α 5 β 3- und α 3 β 1-Integrin-Cluster stabilisiert und aktiviert (Goetz *et al.*, 2008). Die FAK ist ein zentraler Regulator der Zellmotilität, wobei deren Aktivierung in einem Abbau von fokalen Adhäsionen und damit zur gesteigerten Tumorzellmigration führt. Der Umbau der extrazellulären Matrix zur Infiltration von Tumorzellen in gesundes Gewebe wird analog durch Cluster mit α 5 β 1-Integrin verstärkt (Lagana *et al.*, 2006). Tatsächlich korrelieren die Aggressivität und die Metastasierung eines Tumors stark mit der Expression von Gal3 (Takenaka *et al.*, 2002). Neben der Zell-Matrix-Interaktion wird ebenfalls die Stabilität von Zell-Zell-Kontakten durch Gal3 manipuliert (Nieminen *et al.*, 2007). Dabei wird beispielsweise durch die direkte Interaktion von Gal3-Clustern mit N-Cadherin dessen Homodimerisierung inhibiert und dadurch Zell-Zell-Kontakte geschwächt (Boscher *et al.*, 2012). Darüber hinaus wurden Interaktionen von extrazellulärem Gal3 mit den Matrixkomponenten Hensin (Hikita *et al.*, 2000), Laminin (Zhou & Cummings, 1990) und Fibronectin (Sato & Hughes, 1992) beschrieben.

4.5 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte der molekulare Mechanismus aufgedeckt werden, der die Rekrutierung und die Verpackung des Lektins Gal3 in ILVs induziert und in der Folge die polarisierte, exosomale Sekretion dieses Polypeptids ermöglicht. Zum ersten Mal konnte gezeigt werden, dass dieser Prozess auf einem hoch konservierten Tetrapeptidmotiv basiert, das die direkte Interaktion mit dem ESCRT-I-Protein Tsg101 mediiert.

Neben dieser Exportfunktion konnte erstaunlicherweise auch eine funktionelle Rolle von Gal3 in der ILV-Biogenese und der Sortierung von exosomalen Marker-Proteinen beobachtet werden. Hier sollten zukünftige Studien ansetzen, um die mögliche Beteiligung von Gal3 zu validieren und näher zu charakterisieren. Wie ist z. B. die dominant-negative Wirkung der Gal3-ASAA-Mutante zu erklären? Dies wäre insbesondere in Hinblick auf die Freisetzung von Viren interessant, wo bereits eine funktionelle Beteiligung durch eine Gal3-Alix-Interaktion beschrieben worden ist (Wang *et al.*, 2014). Könnte hier Gal3 als „Brücke“ fungieren und praktisch als bifunktionaler Vernetzer Tsg101 und den ESCRT-Komplex an die Plasmamembran dirigieren? Erste Vorversuche mit *Virus-like Particles* und sogar echten Marburg-Viren in Δ Gal3-Zellen konnten bereits vielversprechende Anzeichen eines Einflusses auf die virale Verpackung anzeigen. Für die weitergehende Analyse müsste zunächst auch die genaue Bindedomäne identifiziert werden, mit der Gal3 an Alix bindet. Denkbar wären außerdem weiterführende Experimente, in denen diese Alix-Bindedomäne von Gal3 auf GFP-PSAP übertragen und in Δ Gal3-Zellen exprimiert wird. Auf diese Weise könnte man überprüfen, ob die Brückenfunktion von Gal3 bzw. in diesem Fall von GFP-PSAP ausreicht, um die exosomale Sekretion der Markerproteine wiederherzustellen. Zudem sollte noch überprüft werden, ob die Gal3-ASAA-Mutante mit Alix interagiert. Sollte dies nicht der Fall sein, so wäre die berichtete Interaktion zwischen Gal3 und Alix nur indirekter Natur und würde auf Tsg101 beruhen.

Auf welchem Prinzip könnte, abgesehen von der Brückenbildung, diese funktionelle Rolle am MVB und an der Plasmamembran noch basieren? Tatsächlich scheint die Oligomerisation von Cargoproteinen auch für die exosomale Sortierung von großer Bedeutung zu sein. Dies gilt beispielsweise für den Transferrin-Rezeptor (Vidal *et al.*, 1997), den *Major Histocompatibility Complex* (MHC) Klasse II (Muntasell *et al.*, 2007) und auch für HIV Gag (Fang *et al.*, 2007). Gal3, als allseits bekannter Sortierrezeptor im endosomalen Kompartiment und im Extrazellularraum, scheint als Quervernetzer für eine solche Aktivität geradezu prädestiniert. Daneben wurde Gal3 mit komplexen Membranmodulationen an der endosomalen und an der Plasmamembran in Verbindung gebracht (Lakshminarayan *et al.*, 2014, Paz *et al.*, 2010). Vielleicht könnte

die Oligomerisierung von Gal3 zu hochmolekularen Clustern auch in diesem (reversen) Fall die Membran-Abknospung unterstützen.

Offene Fragen ergeben sich vor allem auch in Hinblick auf eine mögliche Freisetzung des exosomalen Gal3. Da diese Frage angesichts fehlender Studien in der Literatur gänzlich unbeantwortet bleiben muss, sollte der Schwerpunkt zukünftiger Arbeiten auf der Untersuchung der möglichen Freisetzungsmechanismen liegen. Dies wäre auch für das gesamte Feld von herausragender Bedeutung. Konkret sollte zunächst geklärt werden, ob die Freisetzung im Medium oder aber erst nach erfolgter Internalisierung der Exosomen erfolgt. Anschließend könnte die etwaige Freisetzung mithilfe eines Laktose-Pull-downs (positiv, wenn Gal3 die Exosomen verlassen hat) überprüft werden. Dazu müsste die Inkubation von aufgereinigten Gal3-beladenen Exosomen in Δ Gal3-Zellen stattfinden. Zusätzlich könnten verschiedene Inhibitoren eingesetzt werden, wie z. B. Bafilomycin A, das durch die Inhibition der V-ATPase die Ansäuerung des Endosoms bzw. Lysosoms verhindert. Damit könnte die Beteiligung dieser Zellorganellen an der exosomalen Freisetzung von Gal3 bestätigt werden.

Mehrere Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die exosomale Sekretion von Gal3 den exklusiven Weg der unkonventionellen Sekretion in MDCK-Zellen darstellt. Dies sollte in zukünftigen Arbeiten auch in humanen Zelllinien validiert werden. Dabei könnte auch der Einfluss des SNPs näher untersucht werden, da humane Zelllinien im Gegensatz zur caninen Variante in MDCK-Zellen (zwei PTAP- und eine PSAP-Sequenz) nur über eine einzelne PSAT- bzw. PSAP-Sequenz verfügen. Darüber hinaus sollte mit der Gal3-mCherry/Vps4a^{E228Q}-eGFP-Zelllinie die Akkumulation von Gal3 am MVB noch genauer analysiert werden. Hier könnte z. B. eine *Fluorescence Recovery after Photobleaching* (FRAP) Analyse ein besseres Verständnis über diesen dynamischen Prozess ermöglichen. Insbesondere ist nicht klar, wie die filamentösen Akkumulationen von Gal3 aus der Lebendzellmikroskopie zu erklären sind. Vorstellbar wäre in diesem Zusammenhang, dass aufgrund der dominant-negativen Mutation die ESCRT-III-Filamente nicht mehr abgebaut werden können und Gal3 an diesen Strukturen akkumuliert, evtl. durch die Interaktion mit Alix. Hier sollte in jedem Fall die Elektronenmikroskopie weitere Erkenntnisse ermöglichen, auch in Hinblick auf eine mögliche imperfekte Knospung an der MVB-Membran.

Darüber hinaus ergibt sich die Frage, wie die anderen Vertreter der Galektin-Familie in Exosomen gelangen, wo doch die hochkonservierte PSAP-Domäne ausschließlich Gal3 vorbehalten zu sein scheint. Es wäre vorstellbar, dass insbesondere Gal1 über eine Wechselwirkung mit Gal3 in die Exosomen rekrutiert werden könnte. Als Modell für einen solchen Mechanismus könnte die exosomale Sekretion von Syndecan und der Lysyl-tRNA-Synthetase dienen, die durch die Interaktion von Syntenin/Alix

sortiert und verpackt werden (Baietti *et al.*, 2012, Kim *et al.*, 2017). Tatsächlich gibt es Hinweise auf eine Interaktion der beiden Lektine (unveröffentlichte Daten). In einem Zusammenhang könnten dazu auch die Erkenntnisse stehen, dass Gal1 trotz fehlender Glykosylierung in CHO-Zellen sekretiert wird (Cho & Cummings, 1995b), d. h. die Sekretion von Gal1 zwar Glykosylierungs-unabhängig ist, aber gleichzeitig sehr wohl auf die Funktion der CRD angewiesen ist (Seelenmeyer *et al.*, 2005). Vor dem Hintergrund, dass Gal1 als prototypisches Galektin über die CRD oligomerisiert, erscheint eine exosomale Sekretion über Heterooligomere mit Gal3 durchaus plausibel. Diese Hypothese könnte in zukünftigen Studien mithilfe der Δ Gal3-Zelllinie relativ unkompliziert untermauert werden. Weiterführende Experimente sollten zunächst die direkte Wechselwirkung der beiden Lektine validieren und durch Studien mit verschiedenen Galektin-Mutanten erweitert werden, wie z. B. hinsichtlich der Gal1-Sekretion in Gal3-ASAA-Zellen. Allerdings müsste als Basis die Δ Gal3-Zelllinie (stabil) transfiziert werden, um Einflüsse des endogenen, caninen Gal3 der MDCK-Zellen ausschließen zu können. Eine solche Δ cGal3-hGal3-ASAA-Zelle hätte auch viele Vorteile für die Untersuchung des Sekretionsprozesses an sich und die Interaktion mit Alix.

Eine weitere offene Frage ergibt sich bezüglich des funktionellen Grundes für die UPS von Gal3. Mit den beiden Hypothesen einer möglichen Inaktivierung oder einer „zu frühen“ Quervernetzung von Liganden (s. 1.4), vielleicht aber auch mit sich selbst, existieren zwei mögliche Erklärungen, weshalb der Export von Gal3 bzw. der anderen Galektin-Vertreter auf einer unkonventionellen Sekretion beruht. Erstaunlicherweise gibt es aber interessante Ausnahmen von Galektinen, die eben doch über eine Signal-Sequenz verfügen. Das Galektin GCLT1, das in dem Schwamm *Geodia cydonium* vorkommt, besitzt tatsächlich eine Signal-Sequenz, mit einer Schnittstelle zwischen Aminosäure 16 und 17, was *in silico* mit den beiden Programmen SignalP und Phobius bestätigt werden kann. Interessanterweise scheint GCLT1 mit prototypischen Galektinen verwandt zu sein, aber die Zuckerbindespezifität der Gal3-CRD aufzuweisen (Stalz *et al.*, 2006). Darüber hinaus wird GCLT1 glykosyliert und kann mit sich selbst zu Trimeren oligomerisieren (Müller *et al.*, 1983). Auch in *Caenorhabditis elegans* kommt mit Lec-5 ein Galektin mit Signal-Sequenz vor (Wagner-Hülsmann *et al.*, 1996). Interessanterweise wurde Lec-5 gleichzeitig als N-glykosidisch modifiziertes Glykoprotein identifiziert (Kaji *et al.*, 2003, Fan *et al.*, 2005). Bemerkenswert daran ist zusätzlich, dass Fan und Kollegen eine Glykosylierung an Asparagin110 nachweisen konnten. Die Glykosylierung liegt damit in direkter Nachbarschaft zum Tryptophan111, das innerhalb der CRD essenziell für die Zuckerbindung ist (Di Lella *et al.*, 2011). So verwundert es nicht, dass Lec-5 nicht mehr an Asialofetuin binden kann (Ideo *et al.*, 2009). Vor diesem Hintergrund wird klar, dass die Hypothese einer Inaktivierung sehr

gut auf die Familie der Galektine zutreffen kann, vor allem wenn man bedenkt, dass die Vielfalt an Glykosylierungen im Laufe der Evolution potenziell immer komplexer geworden ist (Stichwort Zuckercode).

Eine letzte Frage ist für diese Arbeit von fundamentaler Bedeutung: Gibt es noch andere PSAP-markierte Proteine, die die Route der unkonventionellen Sekretion über Exosomen wählen? Tatsächlich ergibt die systematische Suche allein nach PSAP-Motiven in SwissProt (PTAP und ASAP nicht mitgerechnet) eine unüberschaubare Anzahl (4103 Treffer) an möglichen Kandidaten. Bemerkenswerterweise sind viele von diesen Kandidaten tatsächlich in Exosomen lokalisiert. Tabelle 4-1 gibt einen kleinen Überblick über eine erste, zufällige Zusammenstellung dieser Proteine. Darunter sind sogar besonders wichtige Kandidaten, wie z. B. das Angiotensin *Converting Enzyme* (ACE).

Tabelle 4-1 Beliebige Zusammenstellung von Proteinen mit (P/A)(S/T)AP-Domäne und exosomaler Sekretion.

Protein	Wirkung	Late-Domäne	Publikation Exosom
Rab14	Protein- bzw. Membran <i>Trafficking</i>	¹⁹⁴ PSAP ¹⁹⁷	(Pisitkun <i>et al.</i> , 2004)
Ataxin-1	DNA-Bindeprotein	⁸⁹ PSAP ⁹²	(Chase & Vemuri, 2012)
ACE	Wasser-Elektrolyt-Haushalt	⁸⁹⁹ PSAP ⁹⁰²	(Pisitkun <i>et al.</i> , 2004)
FAT4	Cadherin	⁴⁶⁰⁶ PSAP ⁴⁶⁰⁹	(Kharaziha <i>et al.</i> , 2015)
CADH9	Cadherin	⁷²⁷ PSAP ⁷³⁰	(He <i>et al.</i> , 2015)
TMBIM1	Protein <i>Lifeguard 3</i> (reguliert u. a. MMP9)	⁴ PSAP ⁷	(Gonzales <i>et al.</i> , 2009)
CR2	Komplement Rezeptor Typ 2	⁴⁰¹ PSAP ⁴⁰⁴	(Buschow <i>et al.</i> , 2010)
NCAM1	Zell-Adhäsion Neurone	⁶¹² PSAP ⁶¹⁵	(Liang <i>et al.</i> , 2013)
BAG6	Chaperon	⁴⁷² PSAP ⁴⁷⁵ ⁴⁹⁶ PTAP ⁴⁹⁹	(Liang <i>et al.</i> , 2013)
NFKB2	Transkriptionsfaktor	⁴²³ PSAP ⁴²⁶	(Liang <i>et al.</i> , 2013)
Caprin-1	mRNA Regulation	²⁶³ ASAP ²⁶⁶	(Kharaziha <i>et al.</i> , 2015)

Interessanterweise bestätigen die Arbeiten von Schlundt und Kollegen die Interaktion von BAG6, NFKB2 und Caprin-1 mit Tsg101 (Schlundt *et al.*, 2009). Zukünftige Studien könnten u. a. mithilfe der Bioinformatik diese exosomalen Kandidaten identifizieren und danach die Abhängigkeit von der PSAP-Domäne biochemisch verifizieren. Zusammen mit Gal3 könnten diese Proteine eine neue Klasse an Proteinen definieren, die nach dem Mechanismus der PSAP-vermittelten, exosomalen Sekretion exportiert werden. Die Übertragbarkeit der PSAP-Domäne könnte überdies ganz neue Möglichkeiten für die Biomedizin eröffnen, um Proteine gezielt in Exosomen verpacken zu lassen.

5 Literaturverzeichnis

- ABAZA, N. A., LEIGHTON, J. & SCHULTZ, S. G. 1974. Effects of ouabain on the function and structure of a cell line (MDCK) derived from canine kidney. I. Light microscopic observations of monolayer growth. *In Vitro*, 10, 72-183.
- ABBE, E. 1873. Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Archiv für mikroskopische Anatomie*, 9, 413-418.
- ADELL, M. A. Y., MIGLIANO, S. M., UPADHYAYULA, S., BYKOV, Y. S., SPRENGER, S., PAKDEL, M., VOGEL, G. F., JIH, G., SKILLERN, W., BEHROUZI, R., BABST, M., SCHMIDT, O., HESS, M. W., BRIGGS, J. A. G., KIRCHHAUSEN, T. & TEIS, D. 2017. Recruitment dynamics of ESCRT-III and Vps4 to endosomes and implications for reverse membrane budding. *eLife*, 6, e31652.
- AHMAD, N., GABIUS, H. J., ANDRE, S., KALTNER, H., SABESAN, S., ROY, R., LIU, B., MACALUSO, F. & BREWER, C. F. 2004. Galectin-3 precipitates as a pentamer with synthetic multivalent carbohydrates and forms heterogeneous cross-linked complexes. *J.Biol.Chem.*, 279, 10841-10847.
- AHMED, S. N., BROWN, D. A. & LONDON, E. 1997. On the origin of sphingolipid/cholesterol-rich detergent-insoluble cell membranes: physiological concentrations of cholesterol and sphingolipid induce formation of a detergent-insoluble, liquid-ordered lipid phase in model membranes. *Biochemistry*, 36, 10944-10953.
- AKAHANI, S., NANGIA-MAKKER, P., INOHARA, H., KIM, H.-R. C. & RAZ, A. 1997. Galectin-3: A Novel Antiapoptotic Molecule with A Functional BH1 (NWGR) Domain of Bcl-2 Family. *Cancer Research*, 57, 5272-5276.
- ALFALAH, M., JACOB, R. & NAIM, H. Y. 2002. Intestinal Dipeptidyl Peptidase IV Is Efficiently Sorted to the Apical Membrane through the Concerted Action of N- and O-Glycans as Well as Association with Lipid Microdomains. *J.Biol.Chem.*, 277, 10683-10690.
- AMIT, I., YAKIR, L., KATZ, M., ZWANG, Y., MARMOR, M. D., CITRI, A., SHTIEGMAN, K., ALROY, I., TUVIA, S., REISS, Y., ROUBINI, E., COHEN, M., WIDES, R., BACHARACH, E., SCHUBERT, U. & YARDEN, Y. 2004. Tal, a Tsg101-specific E3 ubiquitin ligase, regulates receptor endocytosis and retrovirus budding. *Genes & Development*, 18, 1737-1752.
- ANDREI, C., DAZZI, C., LOTTI, L., TORRISI, M. R., CHIMINI, G. & RUBARTELLI, A. 1999. The secretory route of the leaderless protein interleukin 1beta involves exocytosis of endolysosome-related vesicles. *Mol Biol Cell*, 10, 1463-75.
- BAASKE, P., WIENKEN, C. J., REINECK, P., DUHR, S. & BRAUN, D. 2010. Optical Thermophoresis for Quantifying the Buffer Dependence of Aptamer Binding. *Angewandte Chemie International Edition*, 49, 2238-2241.
- BABST, M., KATZMANN, D. J., ESTEPA-SABAL, E. J., MEERLOO, T. & EMR, S. D. 2002a. Escrt-III: An endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. *Developmental Cell*, 3, 271-282.
- BABST, M., KATZMANN, D. J., SNYDER, W. B., WENDLAND, B. & EMR, S. D. 2002b. Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. *Dev Cell*, 3, 283-9.
- BABST, M., SATO, T. K., BANTA, L. M. & EMR, S. D. 1997. Endosomal transport function in yeast requires a novel AAA-type ATPase, Vps4p. *Embo j*, 16, 1820-31.
- BABST, M., WENDLAND, B., ESTEPA, E. J. & EMR, S. D. 1998. The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. *Embo j*, 17, 2982-93.
- BACALLAO, R., ANTONY, C., DOTTI, C., KARSENTI, E., STELZER, E. H. & SIMONS, K. 1989. The subcellular organization of Madin-Darby canine kidney cells during the formation of a polarized epithelium. *J.Cell Biol.*, 109, 2817-2832.
- BACHE, K. G., SLAGSVOLD, T., CABEZAS, A., ROSENDAL, K. R., RAIBORG, C. & STENMARK, H. 2004. The Growth-Regulatory Protein HCRP1/hVps37A Is a

- Subunit of Mammalian ESCRT-I and Mediates Receptor Down-Regulation. *Molecular Biology of the Cell*, 15, 4337-4346.
- BAIETTI, M. F., ZHANG, Z., MORTIER, E., MELCHIOR, A., DEGEEST, G., GEERAERTS, A., IVARSSON, Y., DEPOORTERE, F., COOMANS, C., VERMEIREN, E., ZIMMERMANN, P. & DAVID, G. 2012. Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat Cell Biol*, 14, 677-85.
- BALCAROVA-STÄNDER, J., PFEIFFER, S. E., FULLER, S. D. & SIMONS, K. 1984. Development of cell surface polarity in the epithelial Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell line. *The EMBO Journal*, 3, 2687-2694.
- BÄNFER, S., SCHNEIDER, D., DEWES, J., STRAUSS, M. T., FREIBERT, S.-A., HEIMERL, T., MAIER, U. G., ELSÄSSER, H.-P., JUNGSMANN, R. & JACOB, R. 2018. Molecular mechanism to recruit galectin-3 into multivesicular bodies for polarized exosomal secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115, E4396-E4405.
- BÄNFER, S. 2012. *Darstellung endosomaler Kompartimente*. Philipps-Universität Marburg
- BANTERLE, N., BUI, K. H., LEMKE, E. A. & BECK, M. 2013. Fourier ring correlation as a resolution criterion for super-resolution microscopy. *Journal of Structural Biology*, 183, 363-367.
- BARBONI, E. A., BAWUMIA, S., HENRICK, K. & HUGHES, R. C. 2000. Molecular modeling and mutagenesis studies of the N-terminal domains of galectin-3: evidence for participation with the C-terminal carbohydrate recognition domain in oligosaccharide binding. *Glycobiology*, 10, 1201-8.
- BARKER, G. & SIMMONS, N. L. 1981. Identification of two strains of cultured canine renal epithelial cells (MDCK cells) which display entirely different physiological properties. *Q J Exp Physiol*, 66, 61-72.
- BARONDES, S. H., COOPER, D. N., GITT, M. A. & LEFFLER, H. 1994. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J. Biol. Chem.*, 269, 20807-20810.
- BASRUR, V., YANG, F., KUSHIMOTO, T., HIGASHIMOTO, Y., YASUMOTO, K., VALENCIA, J., MULLER, J., VIEIRA, W. D., WATABE, H., SHABANOWITZ, J., HEARING, V. J., HUNT, D. F. & APPELLA, E. 2003. Proteomic analysis of early melanosomes: identification of novel melanosomal proteins. *J Proteome Res*, 2, 69-79.
- BEER, L., ZIMMERMANN, M., MITTERBAUER, A., ELLINGER, A., GRUBER, F., NARZT, M.-S., ZELLNER, M., GYÖNGYÖSI, M., MADLENER, S., SIMADER, E., GABRIEL, C., MILDNER, M. & ANKERSMIT, H. J. 2015. Analysis of the Secretome of Apoptotic Peripheral Blood Mononuclear Cells: Impact of Released Proteins and Exosomes for Tissue Regeneration. *Scientific Reports*, 5, 16662.
- BENTING, J. H., RIETVELD, A. G. & SIMONS, K. 1999. N-Glycans mediate the apical sorting of a GPI-anchored, raft-associated protein in Madin-Darby canine kidney cells. *J. Cell Biol.*, 146, 313-320.
- BILODEAU, P. S., URBANOWSKI, J. L., WINISTORFER, S. C. & PIPER, R. C. 2002. The Vps27p-Hse1p complex binds ubiquitin and mediates endosomal protein sorting. *Nature Cell Biology*, 4, 534.
- BILODEAU, P. S., WINISTORFER, S. C., KEARNEY, W. R., ROBERTSON, A. D. & PIPER, R. C. 2003. Vps27-Hse1 and ESCRT-I complexes cooperate to increase efficiency of sorting ubiquitinated proteins at the endosome. *The Journal of Cell Biology*, 163, 237-243.
- BIRDSALL, B., FEENEY, J., BURDETT, I. D., BAWUMIA, S., BARBONI, E. A. & HUGHES, R. C. 2001. NMR solution studies of hamster galectin-3 and electron microscopic visualization of surface-adsorbed complexes: evidence for interactions between the N- and C-terminal domains. *Biochemistry*, 40, 4859-4866.
- BIRNBOIM, H. C. & DOLY, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 7, 1513-23.

- BISHOP, N. & WOODMAN, P. 2000. ATPase-defective mammalian VPS4 localizes to aberrant endosomes and impairs cholesterol trafficking. *Mol.Biol.Cell*, 11, 227-239.
- BISHOP, N. & WOODMAN, P. 2001. TSG101/Mammalian VPS23 and Mammalian VPS28 Interact Directly and Are Recruited to VPS4-induced Endosomes. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 11735-11742.
- BLOTT, E. J. & GRIFFITHS, G. M. 2002. Secretory lysosomes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3, 122.
- BOBRIE, A., COLOMBO, M., KRUMEICH, S., RAPOSO, G. & THÉRY, C. 2012. Diverse subpopulations of vesicles secreted by different intracellular mechanisms are present in exosome preparations obtained by differential ultracentrifugation. *Journal of Extracellular Vesicles*, 1, 18397.
- BOBRIE, A., COLOMBO, M., RAPOSO, G. & THERY, C. 2011. Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses. *Traffic*, 12, 1659-68.
- BOSCHER, C., ZHENG, Y. Z., LAKSHMINARAYAN, R., JOHANNES, L., DENNIS, J. W., FOSTER, L. J. & NABI, I. R. 2012. Galectin-3 Protein Regulates Mobility of N-cadherin and GM1 Ganglioside at Cell-Cell Junctions of Mammary Carcinoma Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 287, 32940-32952.
- BOUAMR, F., MELILLO, J. A., WANG, M. Q., NAGASHIMA, K., DE LOS SANTOS, M., REIN, A. & GOFF, S. P. 2003. PPPYVEPTAP motif is the late domain of human T-cell leukemia virus type 1 Gag and mediates its functional interaction with cellular proteins Nedd4 and Tsg101 [corrected]. *J Virol*, 77, 11882-95.
- BOULIANNE, R. P., LIU, Y., AEBI, M., LU, B. C. & KÜES, U. 2000. Fruiting body development in *Coprinus cinereus*: regulated expression of two galectins secreted by a non-classical pathway. *Microbiology*, 146, 1841-1853.
- BOWERS, K., PIPER, S. C., EDELING, M. A., GRAY, S. R., OWEN, D. J., LEHNER, P. J. & LUZIO, J. P. 2006. Degradation of Endocytosed Epidermal Growth Factor and Virally Ubiquitinated Major Histocompatibility Complex Class I Is Independent of Mammalian ESCRTII. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 5094-5105.
- BRACCIA, A., VILLANI, M., IMMERSDAL, L., NIELS-CHRISTIANSEN, L. L., NYSTROM, B. T., HANSEN, G. H. & DANIELSEN, E. M. 2003. Microvillar membrane microdomains exist at physiological temperature. Role of galectin-4 as lipid raft stabilizer revealed by "superrafts". *J.Biol.Chem.*, 278, 15679-15684.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.*, 72, 248-254.
- BRÉ, M. H., PEPPERKOK, R., HILL, A. M., LEVILLIERS, N., ANSORGE, W., STELZER, E. H. & KARSENTI, E. 1990. Regulation of microtubule dynamics and nucleation during polarization in MDCK II cells. *The Journal of Cell Biology*, 111, 3013-3021.
- BREWER, C. B. & ROTH, M. G. 1991. A single amino acid change in the cytoplasmic domain alters the polarized delivery of influenza virus hemagglutinin. *J.Cell Biol.*, 114, 413-421.
- BROWN, D. A. & ROSE, J. K. 1992. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell*, 68, 533-544.
- BURD, C. G. & EMR, S. D. 1998. Phosphatidylinositol(3)-phosphate signaling mediated by specific binding to RING FYVE domains. *Mol Cell*, 2, 157-62.
- BUSCHOW, S. I., NOLTE-T HOEN, E. N., VAN NIEL, G., POLS, M. S., TEN BROEKE, T., LAUWEN, M., OSSENDORP, F., MELIEF, C. J., RAPOSO, G., WUBBOLTS, R., WAUBEN, M. H. & STOORVOGEL, W. 2009. MHC II in dendritic cells is targeted to lysosomes or T cell-induced exosomes via distinct multivesicular body pathways. *Traffic*, 10, 1528-42.
- BUSCHOW, S. I., VAN BALKOM, B. W., AALBERTS, M., HECK, A. J., WAUBEN, M. & STOORVOGEL, W. 2010. MHC class II-associated proteins in B-cell exosomes

- and potential functional implications for exosome biogenesis. *Immunol Cell Biol*, 88, 851-6.
- CAO, X., SURMA, M. A. & SIMONS, K. 2012. Polarized sorting and trafficking in epithelial cells. *Cell Research*, 22, 793.
- CARLSON, L. A. & HURLEY, J. H. 2012. In vitro reconstitution of the ordered assembly of the endosomal sorting complex required for transport at membrane-bound HIV-1 Gag clusters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 16928-33.
- CARLSSON, S., CARLSSON, M. C. & LEFFLER, H. 2007. Intracellular sorting of galectin-8 based on carbohydrate fine specificity. *Glycobiology*, 17, 906-912.
- CARLTON, J. G. & MARTIN-SERRANO, J. 2007. Parallels Between Cytokinesis and Retroviral Budding: A Role for the ESCRT Machinery. *Science*, 316, 1908-1912.
- CASANOVA, J. E., APODACA, G. & MOSTOV, K. E. 1991. An autonomous signal for basolateral sorting in the cytoplasmic domain of the polymeric immunoglobulin receptor. *Cell*, 66, 65-75.
- CERRA, R. F., GITT, M. A. & BARONDES, S. H. 1985. Three soluble rat beta-galactoside-binding lectins. *Journal of Biological Chemistry*, 260, 10474-10477.
- CHASE, L. G. & VEMURI, M. C. 2012. *Mesenchymal Stem Cell Therapy*, Humana Press.
- CHEN, B. J. & LAMB, R. A. 2008. Mechanisms for enveloped virus budding: can some viruses do without an ESCRT? *Virology*, 372, 221-232.
- CHEN, H.-Y., FERMIN, A., VARDHANA, S., WENG, I.-C., LO, K. F. R., CHANG, E.-Y., MAVERAKIS, E., YANG, R.-Y., HSU, D. K., DUSTIN, M. L. & LIU, F.-T. 2009. Galectin-3 negatively regulates TCR-mediated CD4+ T-cell activation at the immunological synapse. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 14496-14501.
- CHEN, I. J., CHEN, H. L. & DEMETRIOU, M. 2007. Lateral compartmentalization of T cell receptor versus CD45 by galectin-N-glycan binding and microfilaments coordinate basal and activation signaling. *J Biol Chem*, 282, 35361-72.
- CHIARUTTINI, N., REDONDO-MORATA, L., COLOM, A., HUMBERT, F., LENZ, M., SCHEURING, S. & ROUX, A. 2015. Relaxation of Loaded ESCRT-III Spiral Springs Drives Membrane Deformation. *Cell*, 163, 866-79.
- CHO, M. & CUMMINGS, R. D. 1995a. Galectin-1, a beta-galactoside-binding lectin in Chinese hamster ovary cells. I. Physical and chemical characterization. *J.Biol.Chem.*, 270, 5198-5206.
- CHO, M. & CUMMINGS, R. D. 1995b. Galectin-1, a β -Galactoside-binding Lectin in Chinese Hamster Ovary Cells: II. LOCALIZATION AND BIOSYNTHESIS. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 5207-5212.
- CHOI, D. S., LEE, J. M., PARK, G. W., LIM, H. W., BANG, J. Y., KIM, Y. K., KWON, K. H., KWON, H. J., KIM, K. P. & GHO, Y. S. 2007. Proteomic analysis of microvesicles derived from human colorectal cancer cells. *J Proteome Res*, 6, 4646-55.
- CHRISTENSEN, P. U., DAVEY, J. & NIELSEN, O. 1997. The Schizosaccharomyces pombe mam1 gene encodes an ABC transporter mediating secretion of M-factor. *Mol Gen Genet*, 255, 226-36.
- CHU, T., SUN, J., SAKSENA, S. & EMR, S. D. 2006. New component of ESCRT-I regulates endosomal sorting complex assembly. *The Journal of Cell Biology*, 175, 815-823.
- CHUANG, J. Z. & SUNG, C. H. 1998. The cytoplasmic tail of rhodopsin acts as a novel apical sorting signal in polarized MDCK cells. *J.Cell Biol.*, 142, 1245-1256.
- CLEVES, A. E., COOPER, D. N., BARONDES, S. H. & KELLY, R. B. 1996. A new pathway for protein export in Saccharomyces cerevisiae. *The Journal of Cell Biology*, 133, 1017-1026.
- COLOMBO, M., RAPOSO, G. & THERY, C. 2014. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 30, 255-89.

- CONOS, S. A., LAWLOR, K. E., VAUX, D. L., VINCE, J. E. & LINDQVIST, L. M. 2016. Cell death is not essential for caspase-1-mediated interleukin-1 β activation and secretion. *Cell Death And Differentiation*, 23, 1827.
- COOPER, D. N. & BARONDES, S. H. 1990. Evidence for export of a muscle lectin from cytosol to extracellular matrix and for a novel secretory mechanism. *The Journal of Cell Biology*, 110, 1681-1691.
- COOPER, D. N. W., BOULIANNE, R. P., CHARLTON, S., FARRELL, E. M., SUCHER, A. & LU, B. C. 1997. Fungal Galectins, Sequence and Specificity of Two Isolectins from *Coprinus cinereus*. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 1514-1521.
- COWLES, E. A., AGRWAL, N., ANDERSON, R. L. & WANG, J. L. 1990. Carbohydrate-binding protein 35. Isoelectric points of the polypeptide and a phosphorylated derivative. *Journal of Biological Chemistry*, 265, 17706-12.
- CRAIG, E. A. 2018. Hsp70 at the membrane: driving protein translocation. *BMC Biol*, 16, 11.
- CRAMM-BEHRENS, C. I., DIENST, M. & JACOB, R. 2008. Apical Cargo Traverses Endosomal Compartments on the Passage to the Cell Surface. *Traffic.*, 9, 2206-2220.
- CROOKS, G. E., HON, G., CHANDONIA, J.-M. & BRENNER, S. E. 2004. WebLogo: A Sequence Logo Generator. *Genome Research*, 14, 1188-1190.
- DAM, T. K., GABIUS, H.-J., ANDRÉ, S., KALTNER, H., LENSCH, M. & BREWER, C. F. 2005. Galectins Bind to the Multivalent Glycoprotein Asialofetuin with Enhanced Affinities and a Gradient of Decreasing Binding Constants. *Biochemistry*, 44, 12564-12571.
- DE BOER, R. A., VERWEIJ, N., VAN VELDHUISEN, D. J., WESTRA, H. J., BAKKER, S. J., GANSEVOORT, R. T., MULLER KOBOLD, A. C., VAN GILST, W. H., FRANKE, L., MATEO LEACH, I. & VAN DER HARST, P. 2012. A genome-wide association study of circulating galectin-3. *PLoS One*, 7, e47385.
- DE WAARD, A., HICKMAN, S. & KORNFELD, S. 1976. Isolation and properties of beta-galactoside binding lectins of calf heart and lung. *Journal of Biological Chemistry*, 251, 7581-7587.
- DEBORDE, S., PERRET, E., GRAVOTTA, D., DEORA, A., SALVAREZZA, S., SCHREINER, R. & RODRIGUEZ-BOULAN, E. 2008. Clathrin is a key regulator of basolateral polarity. *Nature*, 452, 719-723.
- DELACOUR, D., CRAMM-BEHRENS, C. I., DROBECQ, H., LE BIVIC, A., NAIM, H. Y. & JACOB, R. 2006. Requirement for galectin-3 in apical protein sorting. *Curr.Biol.*, 16, 408-414.
- DELACOUR, D., GOUYER, V., ZANETTA, J. P., DROBECQ, H., LETEURTRE, E., GRARD, G., MOREAU-HANNEDOUCHE, O., MAES, E., PONS, A., ANDRE, S., LE BIVIC, A., GABIUS, H. J., MANNINEN, A., SIMONS, K. & HUET, G. 2005. Galectin-4 and sulfatides in apical membrane trafficking in enterocyte-like cells. *J.Cell Biol.*, 169, 491-501.
- DELACOUR, D., GREB, C., KOCH, A., SALOMONSSON, E., LEFFLER, H., LE BIVIC, A. & JACOB, R. 2007. Apical Sorting by Galectin-3-Dependent Glycoprotein Clustering. *Traffic.*, 8, 379-388.
- DELACOUR, D., KOCH, A., ACKERMANN, W., EUDE-LE PARCO, I., ELSASSER, H. P., POIRIER, F. & JACOB, R. 2008. Loss of galectin-3 impairs membrane polarisation of mouse enterocytes *in vivo*. *J.Cell Sci.*, 121, 458-465.
- DEMETRIOU, M., GRANOVSKY, M., QUAGGIN, S. & DENNIS, J. W. 2001. Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation. *Nature*, 409, 733-9.
- DENAI, C. M., GILBERT, R. M., ISERMANN, P., MCGREGOR, A. L., TE LINDERT, M., WEIGELIN, B., DAVIDSON, P. M., FRIEDL, P., WOLF, K. & LAMMERDING, J. 2016. Nuclear envelope rupture and repair during cancer cell migration. *Science*, 352, 353-358.

- DENNIS, J. W. & BREWER, C. F. 2013. Density-dependent lectin-glycan interactions as a paradigm for conditional regulation by posttranslational modifications. *Mol Cell Proteomics*, 12, 913-20.
- DENZER, K., KLEIJMEER, M. J., HEIJNEN, H. F., STOOORVOGEL, W. & GEUZE, H. J. 2000. Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *Journal of Cell Science*, 113, 3365-3374.
- DEUTSCHER, S. L. & HIRSCHBERG, C. B. 1986. Mechanism of galactosylation in the Golgi apparatus. A Chinese hamster ovary cell mutant deficient in translocation of UDP-galactose across Golgi vesicle membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 261, 96-100.
- DI LELLA, S., SUNDBLAD, V., CERLIANI, J. P., GUARDIA, C. M., ESTRIN, D. A., VASTA, G. R. & RABINOVICH, G. A. 2011. When galectins recognize glycans: from biochemistry to physiology and back again. *Biochemistry*, 50, 7842-57.
- DIVANGAHI, M., CHEN, M., GAN, H., DESJARDINS, D., HICKMAN, T. T., LEE, D. M., FORTUNE, S., BEHAR, S. M. & REMOLD, H. G. 2009. Mycobacterium tuberculosis evades macrophage defenses by inhibiting plasma membrane repair. *Nature Immunology*, 10, 899.
- DOLNIK, O., KOLESNIKOVA, L., STEVERMANN, L. & BECKER, S. 2010. Tsg101 is recruited by a late domain of the nucleocapsid protein to support budding of Marburg virus-like particles. *J Virol*, 84, 7847-56.
- DONG, S. & HUGHES, R. C. 1997. Macrophage surface glycoproteins binding to galectin-3 (Mac-2-antigen). *Glycoconj J*, 14, 267-74.
- DOYOTTE, A., MIRONOV, A., MCKENZIE, E. & WOODMAN, P. 2008. The Bro1-related protein HD-PTP/PTPN23 is required for endosomal cargo sorting and multivesicular body morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 6308-13.
- DOYOTTE, A., RUSSELL, M. R. G., HOPKINS, C. R. & WOODMAN, P. G. 2005. Depletion of TSG101 forms a mammalian 'Class E' compartment: a multicisternal early endosome with multiple sorting defects. *Journal of Cell Science*, 118, 3003-3017.
- DUHR, S. & BRAUN, D. 2006. Why molecules move along a temperature gradient. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 19678-19682.
- DUPONT, N., JIANG, S., PILLI, M., ORNATOWSKI, W., BHATTACHARYA, D. & DERETIC, V. 2011. Autophagy-based unconventional secretory pathway for extracellular delivery of IL-1 β . *The EMBO Journal*, 30, 4701-4711.
- DURAN, J. M., ANJARD, C., STEFAN, C., LOOMIS, W. F. & MALHOTRA, V. 2010. Unconventional secretion of Acb1 is mediated by autophagosomes. *J Cell Biol*, 188, 527-36.
- DYLEWSKI, D. P. & KEENAN, T. W. 1984. Centrioles in the mammary epithelium of the rat. *Journal of Cell Science*, 72, 185-193.
- ENDESFELDER, U., MALKUSCH, S., FRICKE, F. & HEILEMANN, M. 2014. A simple method to estimate the average localization precision of a single-molecule localization microscopy experiment. *Histochem Cell Biol*, 141, 629-38.
- ESCREVENTE, C., KELLER, S., ALTEVOGT, P. & COSTA, J. 2011. Interaction and uptake of exosomes by ovarian cancer cells. *BMC Cancer*, 11, 108.
- ESTEP, T. N., MOUNTCASTLE, D. B., BARENHOLZ, Y., BILTONEN, R. L. & THOMPSON, T. E. 1979. Thermal behavior of synthetic sphingomyelin-cholesterol dispersions. *Biochemistry*, 18, 2112-2117.
- FAN, X., SHE, Y.-M., BAGSHAW, R. D., CALLAHAN, J. W., SCHACHTER, H. & MAHURAN, D. J. 2005. Identification of the hydrophobic glycoproteins of *Caenorhabditis elegans*. *Glycobiology*, 15, 952-964.
- FANG, Y., WU, N., GAN, X., YAN, W., MORRELL, J. C. & GOULD, S. J. 2007. Higher-order oligomerization targets plasma membrane proteins and HIV gag to exosomes. *PLoS Biol*, 5, e158.
- FEI, F., JOO, E. J., TARIGHAT, S. S., SCHIFFER, I., PAZ, H., FABBRI, M., ABDEL-AZIM, H., GROFFEN, J. & HEISTERKAMP, N. 2015. B-cell precursor acute

- lymphoblastic leukemia and stromal cells communicate through Galectin-3. *Oncotarget*, 6, 11378-94.
- FELDMAN, JESSICA L. & PRIESS, JAMES R. 2012. A Role for the Centrosome and PAR-3 in the Hand-Off of MTOC Function during Epithelial Polarization. *Current Biology*, 22, 575-582.
- FENG, D., ZHAO, W. L., YE, Y. Y., BAI, X. C., LIU, R. Q., CHANG, L. F., ZHOU, Q. & SUI, S. F. 2010. Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *Traffic*, 11, 675-87.
- FIRE, A., XU, S., MONTGOMERY, M. K., KOSTAS, S. A., DRIVER, S. E. & MELLO, C. C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391, 806.
- FISHER, R. D., CHUNG, H. Y., ZHAI, Q., ROBINSON, H., SUNDQUIST, W. I. & HILL, C. P. 2007. Structural and biochemical studies of ALIX/AIP1 and its role in retrovirus budding. *Cell*, 128, 841-52.
- FITZNER, D., SCHNAARS, M., VAN ROSSUM, D., KRISHNAMOORTHY, G., DIBAJ, P., BAKHTI, M., REGEN, T., HANISCH, U. K. & SIMONS, M. 2011. Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis. *J Cell Sci*, 124, 447-58.
- FÖLLING, J., BOSSI, M., BOCK, H., MEDDA, R., WURM, C. A., HEIN, B., JAKOBS, S., EGGELING, C. & HELL, S. W. 2008. Fluorescence nanoscopy by ground-state depletion and single-molecule return. *Nature Methods*, 5, 943.
- FOLSCH, H., OHNO, H., BONIFACINO, J. S. & MELLMAN, I. 1999. A novel clathrin adaptor complex mediates basolateral targeting in polarized epithelial cells. *Cell*, 99, 189-198.
- FRIAND, V., DAVID, G. & ZIMMERMANN, P. 2015. Syntenin and syndecan in the biogenesis of exosomes. *Biology of the Cell*, 107, 331-341.
- FUJII, K., HURLEY, J. H. & FREED, E. O. 2007. Beyond Tsg101: the role of Alix in 'ESCRTing' HIV-1. *Nat Rev Microbiol*, 5, 912-6.
- FUJITA, H., YAMANAKA, M., IMAMURA, K., TANAKA, Y., NARA, A., YOSHIMORI, T., YOKOTA, S. & HIMENO, M. 2003. A dominant negative form of the AAA ATPase SKD1/VPS4 impairs membrane trafficking out of endosomal/lysosomal compartments: class E vps phenotype in mammalian cells. *J Cell Sci*, 116, 401-14.
- FUNASAKA, T., RAZ, A. & NANGIA-MAKKER, P. 2014. Galectin-3 in angiogenesis and metastasis. *Glycobiology*, 24, 886-891.
- GABIUS, H.-J. 1997. Animal Lectins. *European Journal of Biochemistry*, 243, 543-576.
- GARRUS, J. E., VON SCHWEDLER, U. K., PORNILLOS, O. W., MORHAM, S. G., ZAVITZ, K. H., WANG, H. E., WETTSTEIN, D. A., STRAY, K. M., COTE, M., RICH, R. L., MYSZKA, D. G. & SUNDQUIST, W. I. 2001. Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell*, 107, 55-65.
- GASIUNAS, G., BARRANGOU, R., HORVATH, P. & SIKSNYS, V. 2012. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, E2579-E2586.
- GAUSH, C. R., HARD, W. L. & SMITH, T. F. 1966. Characterization of an established line of canine kidney cells (MDCK). *Proc Soc Exp Biol Med*, 122, 931-5.
- GEE, H. Y., NOH, S. H., TANG, B. L., KIM, K. H. & LEE, M. G. 2011. Rescue of DeltaF508-CFTR trafficking via a GRASP-dependent unconventional secretion pathway. *Cell*, 146, 746-60.
- GEORGE-HYSLOP, P. H. S. & MOBLEY, W. C. 2010. *Intracellular Traffic and Neurodegenerative Disorders*, Springer Berlin Heidelberg.
- GHAZI-TABATABAI, S., SAKSENA, S., SHORT, J. M., POBBATI, A. V., VEPRINTSEV, D. B., CROWTHER, R. A., EMR, S. D., EGELMAN, E. H. & WILLIAMS, R. L. 2008. Structure and disassembly of filaments formed by the ESCRT-III subunit Vps24. *Structure*, 16, 1345-56.

- GHOSSOUB, R., LEMBO, F., RUBIO, A., GAILLARD, C. B., BOUCHET, J., VITALE, N., SLAVIK, J., MACHALA, M. & ZIMMERMANN, P. 2014. Syntenin-ALIX exosome biogenesis and budding into multivesicular bodies are controlled by ARF6 and PLD2. *Nat Commun*, 5, 3477.
- GILL, D. J., TEO, H., SUN, J., PERISIC, O., VEPRINTSEV, D. B., EMR, S. D. & WILLIAMS, R. L. 2007. Structural insight into the ESCRT-I/II link and its role in MVB trafficking. *The EMBO Journal*, 26, 600-612.
- GOETZ, J. G., JOSHI, B., LAJOIE, P., STRUGNELL, S. S., SCUDAMORE, T., KOJIC, L. D. & NABI, I. R. 2008. Concerted regulation of focal adhesion dynamics by galectin-3 and tyrosine-phosphorylated caveolin-1. *J. Cell Biol.*, 180, 1261-1275.
- GOLDENRING, J. R. 2013. A central role for vesicle trafficking in epithelial neoplasia: intracellular highways to carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*, 13, 813-20.
- GONG, H. C., HONJO, Y., NANGIA-MAKKER, P., HOGAN, V., MAZURAK, N., BRESALIER, R. S. & RAZ, A. 1999. The NH2 terminus of galectin-3 governs cellular compartmentalization and functions in cancer cells. *Cancer Res.*, 59, 6239-6245.
- GONZALES, P. A., PISITKUN, T., HOFFERT, J. D., TCHAPYJNIKOV, D., STAR, R. A., KLETA, R., WANG, N. S. & KNEPPER, M. A. 2009. Large-scale proteomics and phosphoproteomics of urinary exosomes. *J Am Soc Nephrol*, 20, 363-79.
- GONZALEZ-BEGNE, M., LU, B., HAN, X., HAGEN, F. K., HAND, A. R., MELVIN, J. E. & YATES, J. R. 2009. Proteomic Analysis of Human Parotid Gland Exosomes by Multidimensional Protein Identification Technology (MudPIT). *Journal of Proteome Research*, 8, 1304-1314.
- GRIEVE, A. G. & RABOUILLE, C. 2011. Golgi Bypass: Skirting Around the Heart of Classical Secretion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3.
- GROOTJANS, J. J., REEKMANS, G., CEULEMANS, H. & DAVID, G. 2000. Syntenin-Syndecan Binding Requires Syndecan-Syntenin and the Co-operation of Both PDZ Domains of Syntenin. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 19933-19941.
- GROOTJANS, J. J., ZIMMERMANN, P., REEKMANS, G., SMETS, A., DEGEEST, G., DÜRR, J. & DAVID, G. 1997. Syntenin, a PDZ protein that binds syndecan cytoplasmic domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94, 13683-13688.
- GRUENBERG, J. & STENMARK, H. 2004. The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5, 317-323.
- GSTRAUNTHALER, G., PFALLER, W. & KOTANKO, P. 1985. Biochemical characterization of renal epithelial cell cultures (LLC-PK1 and MDCK). *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 248, F536-F544.
- HANADA, M., AIMÉ-SEMPÉ, C., SATO, T. & REED, J. C. 1995. Structure-Function Analysis of Bcl-2 Protein: IDENTIFICATION OF CONSERVED DOMAINS IMPORTANT FOR HOMODIMERIZATION WITH Bcl-2 AND HETERODIMERIZATION WITH Bax. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 11962-11969.
- HANNAN, L. A., LISANTI, M. P., RODRIGUEZ-BOULAN, E. & EDIDIN, M. 1993. Correctly sorted molecules of a GPI-anchored protein are clustered and immobile when they arrive at the apical surface of MDCK cells. *J. Cell Biol.*, 120, 353-358.
- HANSON, P. I., ROTH, R., LIN, Y. & HEUSER, J. E. 2008. Plasma membrane deformation by circular arrays of ESCRT-III protein filaments. *J Cell Biol*, 180, 389-402.
- HARRIS, J., HARTMAN, M., ROCHE, C., ZENG, S. G., O'SHEA, A., SHARP, F. A., LAMBE, E. M., CREAGH, E. M., GOLENBOCK, D. T., TSCHOPP, J., KORNFELD, H., FITZGERALD, K. A. & LAVELLE, E. C. 2011. Autophagy Controls IL-1 β Secretion by Targeting Pro-IL-1 β for Degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 286, 9587-9597.

- HARRISON, F. L. & WILSON, T. J. 1992. The 14 kDa beta-galactoside binding lectin in myoblast and myotube cultures: localization by confocal microscopy. *Journal of Cell Science*, 101, 635-646.
- HE, M., QIN, H., POON, T. C., SZE, S. C., DING, X., CO, N. N., NGAI, S. M., CHAN, T. F. & WONG, N. 2015. Hepatocellular carcinoma-derived exosomes promote motility of immortalized hepatocyte through transfer of oncogenic proteins and RNAs. *Carcinogenesis*, 36, 1008-18.
- HEILEMANN, M., VAN DE LINDE, S., MUKHERJEE, A. & SAUER, M. 2009. Super-resolution imaging with small organic fluorophores. *Angew Chem Int Ed Engl*, 48, 6903-8.
- HENNE, W. M., BUCHKOVICH, N. J. & EMR, S. D. 2011. The ESCRT pathway. *Dev Cell*, 21, 77-91.
- HENNE, W. M., BUCHKOVICH, N. J., ZHAO, Y. & EMR, S. D. 2012. The endosomal sorting complex ESCRT-II mediates the assembly and architecture of ESCRT-III helices. *Cell*, 151, 356-71.
- HERRMANN, J., TURCK, C. W., ATCHISON, R. E., HUFLEJT, M. E., POULTER, L., GITT, M. A., BURLINGAME, A. L., BARONDES, S. H. & LEFFLER, H. 1993. Primary structure of the soluble lactose binding lectin L-29 from rat and dog and interaction of its non-collagenous proline-, glycine-, tyrosine-rich sequence with bacterial and tissue collagenase. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 26704-26711.
- HICKE, L., SCHUBERT, H. L. & HILL, C. P. 2005. Ubiquitin-binding domains. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6, 610.
- HIERRO, A., SUN, J., RUSNAK, A. S., KIM, J., PRAG, G., EMR, S. D. & HURLEY, J. H. 2004. Structure of the ESCRT-II endosomal trafficking complex. *Nature*, 431, 221.
- HIKITA, C., VIJAYAKUMAR, S., TAKITO, J., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TEMPST, P. & AL AWQATI, Q. 2000. Induction of terminal differentiation in epithelial cells requires polymerization of hensin by galectin 3. *J. Cell Biol.*, 151, 1235-1246.
- HIRABAYASHI, J., HASHIDATE, T., ARATA, Y., NISHI, N., NAKAMURA, T., HIRASHIMA, M., URASHIMA, T., OKA, T., FUTAI, M., MULLER, W. E., YAGI, F. & KASAI, K. 2002. Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. *Biochim. Biophys. Acta*, 1572, 232-254.
- HIRABAYASHI, J. & KASAI, K. 1993. The family of metazoan metal-independent beta-galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution. *Glycobiology*, 3, 297-304.
- HO, M. K. & SPRINGER, T. A. 1982. Mac-2, a novel 32,000 Mr mouse macrophage subpopulation-specific antigen defined by monoclonal antibodies. *The Journal of Immunology*, 128, 1221-1228.
- HOFF, F., GREB, C., HOLLMANN, C., HONIG, E. & JACOB, R. 2014. The Large GTPase Mx1 Is Involved in Apical Transport in MDCK Cells. *Traffic*.
- HOOPER, N. M. 1999. Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol-rich membrane domains, lipid rafts and caveolae (review). *Mol. Membr. Biol.*, 16, 145-156.
- HORLACHER, T., OBERLI, M. A., WERZ, D. B., KROCK, L., BUFALI, S., MISHRA, R., SOBEK, J., SIMONS, K., HIRASHIMA, M., NIKI, T. & SEEBERGER, P. H. 2010. Determination of carbohydrate-binding preferences of human galectins with carbohydrate microarrays. *ChemBiochem*, 11, 1563-73.
- HORSTER, M. F. & STOPP, M. 1986. Transport and metabolic functions in cultured renal tubule cells. *Kidney International*, 29, 46-53.
- HOUZELSTEIN, D., GONCALVES, I. R., FADDEN, A. J., SIDHU, S. S., COOPER, D. N., DRICKAMER, K., LEFFLER, H. & POIRIER, F. 2004. Phylogenetic analysis of the vertebrate galectin family. *Mol Biol Evol*, 21, 1177-87.
- HSU, D. K., ZUBERI, R. I. & LIU, F. T. 1992. Biochemical and biophysical characterization of human recombinant IgE-binding protein, an S-type animal lectin. *J. Biol. Chem.*, 267, 14167-14174.

- HU, C.-Y., CHANG, S.-K., WU, C.-S., TSAI, W.-I. & HSU, P.-N. 2011. Galectin-3 gene (LGALS3) +292C allele is a genetic predisposition factor for rheumatoid arthritis in Taiwan. *Clinical Rheumatology*, 30, 1227-1233.
- HUA, W., SHEFF, D., TOOMRE, D. & MELLMAN, I. 2006. Vectorial insertion of apical and basolateral membrane proteins in polarized epithelial cells revealed by quantitative 3D live cell imaging. *J. Cell Biol.*, 172, 1035-1044.
- HUFLEJT, M. E., TURCK, C. W., LINDSTEDT, R., BARONDES, S. H. & LEFFLER, H. 1993. L-29, a soluble lactose-binding lectin, is phosphorylated on serine 6 and serine 12 in vivo and by casein kinase I. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 26712-26718.
- HUGHES, R. C. 1999. Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1473, 172-185.
- HUNG, M. C. & LINK, W. 2011. Protein localization in disease and therapy. *J Cell Sci*, 124, 3381-92.
- HUNZIKER, W., HARTEK, C., MATTER, K. & MELLMAN, I. 1991. Basolateral sorting in MDCK cells requires a distinct cytoplasmic domain determinant. *Cell*, 66, 907-920.
- IDEO, H., FUKUSHIMA, K., GENGYO-ANDO, K., MITANI, S., DEJIMA, K., NOMURA, K. & YAMASHITA, K. 2009. A Caenorhabditis elegans Glycolipid-binding Galectin Functions in Host Defense against Bacterial Infection. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 26493-26501.
- INOHARA, H. & RAZ, A. 1994. Identification of Human Melanoma Cellular and Secreted Ligands for Galectin-3. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 201, 1366-1375.
- JACOB, R., ALFALAH, M., GRUNBERG, J., OBENDORF, M. & NAIM, H. Y. 2000. Structural determinants required for apical sorting of an intestinal brush-border membrane protein. *J. Biol. Chem.*, 275, 6566-6572.
- JACOB, R. & NAIM, H. Y. 2001. Apical membrane proteins are transported in distinct vesicular carriers. *Curr. Biol.*, 11, 1444-1450.
- JACOB, R., PREUSS, U., PANZER, P., ALFALAH, M., QUACK, S., ROTH, M. G., NAIM, H. & NAIM, H. Y. 1999. Hierarchy of sorting signals in chimeras of intestinal lactase-phlorizin hydrolase and the influenza virus hemagglutinin. *J. Biol. Chem.*, 274, 8061-8067.
- JAISWAL, J. K., ANDREWS, N. W. & SIMON, S. M. 2002. Membrane proximal lysosomes are the major vesicles responsible for calcium-dependent exocytosis in nonsecretory cells. *The Journal of Cell Biology*, 159, 625-635.
- JIANG, S., LI, Y., ZHANG, X., BU, G., XU, H. & ZHANG, Y. W. 2014. Trafficking regulation of proteins in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*, 9, 6.
- JIMENEZ, A. J., MAIURI, P., LAFAURIE-JANVORE, J., DIVOUX, S., PIEL, M. & PEREZ, F. 2014. ESCRT Machinery Is Required for Plasma Membrane Repair. *Science*, 343.
- JINEK, M., CHYLINSKI, K., FONFARA, I., HAUER, M., DOUDNA, J. A. & CHARPENTIER, E. 2012. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*, 337, 816-821.
- JOUVENET, N., ZHADINA, M., BIENIASZ, P. D. & SIMON, S. M. 2011. Dynamics of ESCRT protein recruitment during retroviral assembly. *Nature Cell Biology*, 13, 394.
- JUNG, J., KIM, J., ROH, S. H., JUN, I., SAMPSON, R. D., GEE, H. Y., CHOI, J. Y. & LEE, M. G. 2016. The HSP70 co-chaperone DNAJC14 targets misfolded pendrin for unconventional protein secretion. *Nature Communications*, 7, 11386.
- KAJI, H., SAITO, H., YAMAUCHI, Y., SHINKAWA, T., TAOKA, M., HIRABAYASHI, J., KASAI, K.-I., TAKAHASHI, N. & ISOBE, T. 2003. Lectin affinity capture, isotope-coded tagging and mass spectrometry to identify N-linked glycoproteins. *Nature Biotechnology*, 21, 667.

- KALRA, H., ADDA, C. G., LIEM, M., ANG, C.-S., MECHLER, A., SIMPSON, R. J., HULETT, M. D. & MATHIVANAN, S. 2013. Comparative proteomics evaluation of plasma exosome isolation techniques and assessment of the stability of exosomes in normal human blood plasma. *PROTEOMICS*, 13, 3354-3364.
- KANEMOTO, S., NITANI, R., MURAKAMI, T., KANEKO, M., ASADA, R., MATSUHISA, K., SAITO, A. & IMAIZUMI, K. 2016. Multivesicular body formation enhancement and exosome release during endoplasmic reticulum stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 480, 166-172.
- KATZMANN, D. J., BABST, M. & EMR, S. D. 2001. Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell*, 106, 145-55.
- KATZMANN, D. J., ODORIZZI, G. & EMR, S. D. 2002. Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3, 893.
- KATZMANN, D. J., STEFAN, C. J., BABST, M. & EMR, S. D. 2003. Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting. *J Cell Biol*, 162, 413-23.
- KHARAZIHA, P., CHIOUREAS, D., RUTISHAUSER, D., BALTATZIS, G., LENNARTSSON, L., FONSECA, P., AZIMI, A., HULTENBY, K., ZUBAREV, R., ULLEN, A., YACHNIN, J., NILSSON, S. & PANARETAKIS, T. 2015. Molecular profiling of prostate cancer derived exosomes may reveal a predictive signature for response to docetaxel. *Oncotarget*, 6, 21740-54.
- KIKONYOGO, A., BOUAMR, F., VANA, M. L., XIANG, Y., AIYAR, A., CARTER, C. & LEIS, J. 2001. Proteins related to the Nedd4 family of ubiquitin protein ligases interact with the L domain of Rous sarcoma virus and are required for gag budding from cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, 11199-11204.
- KIM, S. B., KIM, H. R., PARK, M. C., CHO, S., GOUGHNOUR, P. C., HAN, D., YOON, I., KIM, Y., KANG, T., SONG, E., KIM, P., CHOI, H., MUN, J. Y., SONG, C., LEE, S., JUNG, H. S. & KIM, S. 2017. Caspase-8 controls the secretion of inflammatory lysyl-tRNA synthetase in exosomes from cancer cells. *The Journal of Cell Biology*, 216, 2201-2216.
- KING, H. W., MICHAEL, M. Z. & GLEADLE, J. M. 2012. Hypoxic enhancement of exosome release by breast cancer cells. *BMC Cancer*, 12, 421.
- KINSETH, M. A., ANJARD, C., FULLER, D., GUIZZUNTI, G., LOOMIS, W. F. & MALHOTRA, V. 2007. The Golgi-Associated Protein GRASP Is Required for Unconventional Protein Secretion during Development. *Cell*, 130, 524-534.
- KNIBBS, R. N., AGRWAL, N., WANG, J. L. & GOLDSTEIN, I. J. 1993. Carbohydrate-binding protein 35. II. Analysis of the interaction of the recombinant polypeptide with saccharides. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 14940-14947.
- KOEGEL, M., ZLATKINE, P., LEY, S. C., COURTNEIDGE, S. A. & MAGEE, A. I. 1994. Palmitoylation of multiple Src-family kinases at a homologous N-terminal motif. *Biochem J*, 303 (Pt 3), 749-53.
- KOSAKA, N., IGUCHI, H., YOSHIOKA, Y., TAKESHITA, F., MATSUKI, Y. & OCHIYA, T. 2010. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem*, 285, 17442-52.
- KOSTELANSKY, M. S., SCHLUTER, C., TAM, Y. Y. C., LEE, S., GHIRLANDO, R., BEACH, B., CONIBEAR, E. & HURLEY, J. H. 2007. Molecular Architecture and Functional Model of the Complete Yeast ESCRT-I Heterotetramer. *Cell*, 129, 485-498.
- KOWAL, J., ARRAS, G., COLOMBO, M., JOUVE, M., MORATH, J. P., PRIMDAL-BENGTSON, B., DINGLI, F., LOEW, D., TKACH, M. & THÉRY, C. 2016. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113, E968-E977.
- KRÄMER-ALBERS, E. M., BRETZ, N., TENZER, S., WINTERSTEIN, C., MÖBIUS, W., BERGER, H., NAVE, K. A., SCHILD, H. & TROTTER, J. 2007. Oligodendrocytes secrete exosomes containing major myelin and stress-

- protective proteins: Trophic support for axons? *PROTEOMICS – Clinical Applications*, 1, 1446-1461.
- KUKLINSKI, S. & PROBSTMEIER, R. 1998. Homophilic binding properties of galectin-3: involvement of the carbohydrate recognition domain. *J Neurochem*, 70, 814-23.
- KUNDU, A., AVALOS, R. T., SANDERSON, C. M. & NAYAK, D. P. 1996. Transmembrane domain of influenza virus neuraminidase, a type II protein, possesses an apical sorting signal in polarized MDCK cells. *J. Virol.*, 70, 6508-6515.
- KYHSE-ANDERSEN, J. 1984. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods*, 10, 203-9.
- LA VENUTA, G., ZEITLER, M., STERINGER, J. P., MÜLLER, H.-M. & NICKEL, W. 2015. The Startling Properties of Fibroblast Growth Factor 2: How to Exit Mammalian Cells without a Signal Peptide at Hand. *Journal of Biological Chemistry*, 290, 27015-27020.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- LAGANA, A., GOETZ, J. G., CHEUNG, P., RAZ, A., DENNIS, J. W. & NABI, I. R. 2006. Galectin binding to Mgat5-modified N-glycans regulates fibronectin matrix remodeling in tumor cells. *Mol Cell Biol*, 26, 3181-93.
- LAJOIE, P., PARTRIDGE, E. A., GUAY, G., GOETZ, J. G., PAWLING, J., LAGANA, A., JOSHI, B., DENNIS, J. W. & NABI, I. R. 2007. Plasma membrane domain organization regulates EGFR signaling in tumor cells. *J. Cell Biol.*, 179, 341-356.
- LAKSHMINARAYAN, R., WUNDER, C., BECKEN, U., HOWES, M. T., BENZING, C., ARUMUGAM, S., SALES, S., ARIOTTI, N., CHAMBON, V., LAMAZE, C., LOEW, D., SHEVCHENKO, A., GAUS, K., PARTON, R. G. & JOHANNES, L. 2014. Galectin-3 drives glycosphingolipid-dependent biogenesis of clathrin-independent carriers. *Nat Cell Biol*, 16, 595-606.
- LANDSBERG, M. J., VAJJHALA, P. R., ROTHNAGEL, R., MUNN, A. L. & HANKAMER, B. 2009. Three-dimensional structure of AAA ATPase Vps4: advancing structural insights into the mechanisms of endosomal sorting and enveloped virus budding. *Structure*, 17, 427-37.
- LANGELIER, C., VON SCHWEDLER, U. K., FISHER, R. D., DE DOMENICO, I., WHITE, P. L., HILL, C. P., KAPLAN, J., WARD, D. & SUNDQUIST, W. I. 2006. Human ESCRT-II Complex and Its Role in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Release. *Journal of Virology*, 80, 9465-9480.
- LATA, S., SCHOEHN, G., JAIN, A., PIRES, R., PIEHLER, J., GÖTTLINGER, H. G. & WEISSENHORN, W. 2008. Helical Structures of ESCRT-III Are Disassembled by VPS4. *Science*, 321, 1354-1357.
- LAZAR, I., CLEMENT, E., DUCOUX-PETIT, M., DENAT, L., SOLDAN, V., DAUVILLIER, S., BALOR, S., BURLET-SCHILTZ, O., LARUE, L., MULLER, C. & NIETO, L. 2015. Proteome characterization of melanoma exosomes reveals a specific signature for metastatic cell lines. *Pigment Cell Melanoma Res*, 28, 464-75.
- LE BIVIC, A., GARCIA, M. & RODRIGUEZ-BOULAN, E. 1993. Ricin-resistant Madin-Darby canine kidney cells missort a major endogenous apical sialoglycoprotein. *J. Biol. Chem.*, 268, 6909-6916.
- LE BIVIC, A., SAMBUY, Y., PATZAK, A., PATIL, N., CHAO, M. & RODRIGUEZ-BOULAN, E. 1991. An internal deletion in the cytoplasmic tail reverses the apical localization of human NGF receptor in transfected MDCK cells. *J. Cell Biol.*, 115, 607-618.
- LEFFLER, H. & BARONDES, S. H. 1986. Specificity of binding of three soluble rat lung lectins to substituted and unsubstituted mammalian beta-galactosides. *J Biol Chem*, 261, 10119-26.

- LEFFLER, H., CARLSSON, S., HEDLUND, M., QIAN, Y. & POIRIER, F. 2004. Introduction to galectins. *Glycoconj.J.*, 19, 433-440.
- LEGLER, G., MÜLLER-PLATZ, C. M., MENTGES-HETTKAMP, M., PFLIEGER, G. & JÜLICH, E. 1985. On the chemical basis of the Lowry protein determination. *Analytical Biochemistry*, 150, 278-287.
- LEHMANN, B. D., PAINE, M. S., BROOKS, A. M., MCCUBREY, J. A., RENEGAR, R. H., WANG, R. & TERRIAN, D. M. 2008. Senescence-Associated Exosome Release from Human Prostate Cancer Cells. *Cancer Research*, 68, 7864-7871.
- LEIGHTON, J., BRADA, Z., ESTES, L. W. & JUSTH, G. 1969. Secretory Activity and Oncogenicity of a Cell Line (MDCK) Derived from Canine Kidney. *Science*, 163, 472-473.
- LEIGHTON, J., ESTES, L. W., MANSUKHANI, S. & BRADA, Z. 1970. A cell line derived from normal dog kidney (MDCK) exhibiting qualities of papillary adenocarcinoma and of renal tubular epithelium. *Cancer*, 26, 1022-1028.
- LEPUR, A., SALOMONSSON, E., NILSSON, U. J. & LEFFLER, H. 2012. Ligand induced galectin-3 protein self-association. *J.Biol.Chem.*, 287, 21751-21756.
- LEVER, J. E. 1985. Variant (MDCK) kidney epithelial cells altered in response to inducers of dome formation and differentiation. *Journal of Cellular Physiology*, 122, 45-52.
- LI, P., LIU, S., LU, M., BANDYOPADHYAY, G., OH, D., IMAMURA, T., JOHNSON, A. M. F., SEARS, D., SHEN, Z., CUI, B., KONG, L., HOU, S., LIANG, X., IOVINO, S., WATKINS, S. M., YING, W., OSBORN, O., WOLLAM, J., BRENNER, M. & OLEFSKY, J. M. 2016. Hematopoietic-Derived Galectin-3 Causes Cellular and Systemic Insulin Resistance. *Cell*, 167, 973-984.e12.
- LIANG, B., PENG, P., CHEN, S., LI, L., ZHANG, M., CAO, D., YANG, J., LI, H., GUI, T., LI, X. & SHEN, K. 2013. Characterization and proteomic analysis of ovarian cancer-derived exosomes. *J Proteomics*, 80, 171-82.
- LIAO, D. I., KAPADIA, G., AHMED, H., VASTA, G. R. & HERZBERG, O. 1994. Structure of S-lectin, a developmentally regulated vertebrate beta-galactoside-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91, 1428-1432.
- LIN, S., NAIM, H. Y., RODRIGUEZ, A. C. & ROTH, M. G. 1998. Mutations in the middle of the transmembrane domain reverse the polarity of transport of the influenza virus hemagglutinin in MDCK epithelial cells. *J.Cell Biol.*, 142, 51-57.
- LINDSTEDT, R., APODACA, G., BARONDES, S. H., MOSTOV, K. E. & LEFFLER, H. 1993. Apical secretion of a cytosolic protein by Madin-Darby canine kidney cells. Evidence for polarized release of an endogenous lectin by a nonclassical secretory pathway. *J.Biol.Chem.*, 268, 11750-11757.
- LISANTI, M. P., CARAS, I. W., DAVITZ, M. A. & RODRIGUEZ-BOULAN, E. 1989a. A glycopospholipid membrane anchor acts as an apical targeting signal in polarized epithelial cells. *J.Cell Biol.*, 109, 2145-2156.
- LISANTI, M. P., LE BIVIC, A., SARGIACOMO, M. & RODRIGUEZ-BOULAN, E. 1989b. Steady-state distribution and biogenesis of endogenous Madin-Darby canine kidney glycoproteins: evidence for intracellular sorting and polarized cell surface delivery. *J.Cell Biol.*, 109, 2117-2127.
- LISANTI, M. P., SARGIACOMO, M., GRAEVE, L., SALTIEL, A. R. & RODRIGUEZ-BOULAN, E. 1988. Polarized apical distribution of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins in a renal epithelial cell line. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 85, 9557-9561.
- LIU, F. T., ALBRANDT, K., MENDEL, E., KULCZYCKI, A. & ORIDA, N. K. 1985. Identification of an IgE-binding protein by molecular cloning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82, 4100-4104.
- LIU, S. D., WHITING, C. C., TOMASSIAN, T., PANG, M., BISSEL, S. J., BAUM, L. G., MOSSINE, V. V., POIRIER, F., HUFLEJT, M. E. & MICELI, M. C. 2008. Endogenous galectin-1 enforces class I-restricted TCR functional fate decisions in thymocytes. *Blood*, 112, 120-30.

- LIU, W., HSU, D. K., CHEN, H.-Y., YANG, R.-Y., CARRAWAY, K. L., ISSEROFF, R. R. & LIU, F.-T. 2012. Galectin-3 Regulates Intracellular Trafficking of EGFR through Alix and Promotes Keratinocyte Migration. *Journal of Investigative Dermatology*, 132, 2828-2837.
- LOBSANOV, Y. D., GITT, M. A., LEFFLER, H., BARONDES, S. H. & RINI, J. M. 1993. X-ray crystal structure of the human dimeric S-Lac lectin, L-14-II, in complex with lactose at 2.9-Å resolution. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 27034-27038.
- LONCLE, N., AGROMAYOR, M., MARTIN-SERRANO, J. & WILLIAMS, D. W. 2015. An ESCRT module is required for neuron pruning. *Scientific Reports*, 5, 8461.
- LOOMIS, W. F., BEHRENS, M. M., WILLIAMS, M. E. & ANJARD, C. 2010. Pregnenolone Sulfate and Cortisol Induce Secretion of Acyl-CoA-binding Protein and Its Conversion into Endozepines from Astrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 21359-21365.
- LOTTSPREICH, F., ENGELS, J. W. & SOLODKOFF, Z. L. 2012. *Bioanalytik*, Spektrum Akademischer Verlag.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. & RANDALL, R. J. 1951. PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- LU, Q., HOPE, L. W., BRASCH, M., REINHARD, C. & COHEN, S. N. 2003. TSG101 interaction with HRS mediates endosomal trafficking and receptor down-regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 7626-7631.
- LUKYANOV, P., FURTAK, V. & OCHIENG, J. 2005. Galectin-3 interacts with membrane lipids and penetrates the lipid bilayer. *Biochem Biophys Res Commun*, 338, 1031-6.
- MACH, T. M. V. 2013. *pH-abhängige strukturelle und funktionelle Variationen des β -Galactosid-bindenden Proteins Galectin-3*, Philipps-Universität Marburg.
- MACKENZIE, A., WILSON, H. L., KISS-TOTH, E., DOWER, S. K., NORTH, R. A. & SURPRENANT, A. 2001. Rapid secretion of interleukin-1 β by microvesicle shedding. *Immunity*, 15, 825-35.
- MADRIGAL-MATUTE, J., LINDHOLT, J. S., FERNANDEZ-GARCIA, C. E., BENITO-MARTIN, A., BURILLO, E., ZALBA, G., BELOQUI, O., LLAMAS-GRANDA, P., ORTIZ, A., EGIDO, J., BLANCO-COLIO, L. M. & MARTIN-VENTURA, J. L. 2014. Galectin-3, a Biomarker Linking Oxidative Stress and Inflammation With the Clinical Outcomes of Patients With Atherothrombosis. *Journal of the American Heart Association*, 3.
- MALIK, Z. A., KOTT, K. S., POE, A. J., KUO, T., CHEN, L., FERRARA, K. W. & KNOWLTON, A. A. 2013. Cardiac myocyte exosomes: stability, HSP60, and proteomics. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 304, H954-H965.
- MANJITHAYA, R., ANJARD, C., LOOMIS, W. F. & SUBRAMANI, S. 2010. Unconventional secretion of *Pichia pastoris* Acb1 is dependent on GRASP protein, peroxisomal functions, and autophagosome formation. *The Journal of Cell Biology*, 188, 537-546.
- MARKOWSKA, A. I., JEFFERIES, K. C. & PANJWANI, N. 2011. Galectin-3 Protein Modulates Cell Surface Expression and Activation of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 in Human Endothelial Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 286, 29913-29921.
- MARTÍN-SÁNCHEZ, F., DIAMOND, C., ZEITLER, M., GOMEZ, A. I., BAROJA-MAZO, A., BAGNALL, J., SPILLER, D., WHITE, M., DANIELS, M. J. D., MORTELLARO, A., PEÑALVER, M., PASZEK, P., STERINGER, J. P., NICKEL, W., BROUGH, D. & PELEGRÍN, P. 2016. Inflammasome-dependent IL-1 β release depends upon membrane permeabilisation. *Cell Death And Differentiation*, 23, 1219.

- MARTIN-SERRANO, J., EASTMAN, S. W., CHUNG, W. & BIENIASZ, P. D. 2005. HECT ubiquitin ligases link viral and cellular PPXY motifs to the vacuolar protein-sorting pathway. *The Journal of Cell Biology*, 168, 89-101.
- MARTIN-SERRANO, J., YAROVOY, A., PEREZ-CABALLERO, D. & BIENIASZ, P. D. 2003a. Divergent retroviral late-budding domains recruit vacuolar protein sorting factors by using alternative adaptor proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 12414-9.
- MARTIN-SERRANO, J., ZANG, T. & BIENIASZ, P. D. 2003b. Role of ESCRT-I in retroviral budding. *J Virol*, 77, 4794-804.
- MASSA, S. M., COOPER, D. N., LEFFLER, H. & BARONDES, S. H. 1993. L-29, an endogenous lectin, binds to glycoconjugate ligands with positive cooperativity. *Biochemistry*, 32, 260-267.
- MATHIVANAN, S., LIM, J. W., TAURO, B. J., JI, H., MORITZ, R. L. & SIMPSON, R. J. 2010. Proteomics analysis of A33 immunoaffinity-purified exosomes released from the human colon tumor cell line LIM1215 reveals a tissue-specific protein signature. *Mol Cell Proteomics*, 9, 197-208.
- MATTER, K., HUNZIKER, W. & MELLMAN, I. 1992. Basolateral sorting of LDL receptor in MDCK cells: the cytoplasmic domain contains two tyrosine-dependent targeting determinants. *Cell*, 71, 741-753.
- MAZUREK, N., CONKLIN, J., BYRD, J. C., RAZ, A. & BRESALIER, R. S. 2000. Phosphorylation of the β -Galactoside-binding Protein Galectin-3 Modulates Binding to Its Ligands. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 36311-36315.
- MCCULLOUGH, J., CLIPPINGER, A. K., TALLEGE, N., SKOWYRA, M. L., SAUNDERS, M. G., NAISMITH, T. V., COLF, L. A., AFONINE, P., ARTHUR, C., SUNDQUIST, W. I., HANSON, P. I. & FROST, A. 2015. Structure and membrane remodeling activity of ESCRT-III helical polymers. *Science*, 350, 1548-1551.
- MCCULLOUGH, J., COLF, L. A. & SUNDQUIST, W. I. 2013. Membrane fission reactions of the mammalian ESCRT pathway. *Annu Rev Biochem*, 82, 663-92.
- MCCULLOUGH, J., FISHER, R. D., WHITBY, F. G., SUNDQUIST, W. I. & HILL, C. P. 2008. ALIX-CHMP4 interactions in the human ESCRT pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 7687-7691.
- MCGRATH, J. P. & VARSHAVSKY, A. 1989. The yeast STE6 gene encodes a homologue of the mammalian multidrug resistance P-glycoprotein. *Nature*, 340, 400.
- MCNEIL, P. L. & KIRCHHAUSEN, T. 2005. An emergency response team for membrane repair. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6, 499.
- MCWILLIAM, H., LI, W., ULUDAG, M., SQUIZZATO, S., PARK, Y. M., BUSO, N., COWLEY, A. P. & LOPEZ, R. 2013. Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Research*, 41, W597-W600.
- MEADS, T. & SCHROER, T. A. 1995. Polarity and nucleation of microtubules in polarized epithelial cells. *Cell Motil. Cytoskeleton*, 32, 273-288.
- MEHUL, B., BAWUMIA, S., MARTIN, S. R. & HUGHES, R. C. 1994. Structure of baby hamster kidney carbohydrate-binding protein CBP30, an S-type animal lectin. *J. Biol. Chem.*, 269, 18250-18258.
- MEHUL, B. & HUGHES, R. C. 1997. Plasma membrane targeting, vesicular budding and release of galectin 3 from the cytoplasm of mammalian cells during secretion. *J. Cell Sci.*, 110 (Pt 10), 1169-1178.
- MEISTER, G., LANDTHALER, M., PATKANIOWSKA, A., DORSETT, Y., TENG, G. & TUSCHL, T. 2004. Human Argonaute2 Mediates RNA Cleavage Targeted by miRNAs and siRNAs. *Molecular Cell*, 15, 185-197.
- MENG, B., IP, N. C., PRESTWOOD, L. J., ABBINK, T. E. & LEVER, A. M. 2015. Evidence that the endosomal sorting complex required for transport-II (ESCRT-II) is required for efficient human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) production. *Retrovirology*, 12, 72.

- MENON, R. P. & 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, 569-576.
- MICHAELIS, S. 1993. STE6, the yeast a-factor transporter. *Semin Cell Biol*, 4, 17-27.
- MICSONAI, A., WIEN, F., KERNYA, L., LEE, Y.-H., GOTO, Y., RÉFRÉGIERS, M. & KARDOS, J. 2015. Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112, E3095-E3103.
- MIERZWA, B. E., CHIARUTTINI, N., REDONDO-MORATA, L., MOSER VON FILSECK, J., KÖNIG, J., LARIOS, J., POSER, I., MÜLLER-REICHERT, T., SCHEURING, S., ROUX, A. & GERLICH, D. W. 2017. Dynamic subunit turnover in ESCRT-III assemblies is regulated by Vps4 to mediate membrane remodelling during cytokinesis. *Nature Cell Biology*, 19, 787.
- MIRANDA, K. C., KHROMYKH, T., CHRISTY, P., LE, T. L., GOTTARDI, C. J., YAP, A. S., STOW, J. L. & TEASDALE, R. D. 2001. A Dileucine Motif Targets E-cadherin to the Basolateral Cell Surface in Madin-Darby Canine Kidney and LLC-PK1 Epithelial Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 22565-22572.
- MOBIUS, W., VAN DONSELAAR, E., OHNO-IWASHITA, Y., SHIMADA, Y., HEIJNEN, H. F., SLOT, J. W. & GEUZE, H. J. 2003. Recycling compartments and the internal vesicles of multivesicular bodies harbor most of the cholesterol found in the endocytic pathway. *Traffic.*, 4, 222-231.
- MONTECALVO, A., LARREGINA, A. T., SHUFESKY, W. J., STOLZ, D. B., SULLIVAN, M. L., KARLSSON, J. M., BATY, C. J., GIBSON, G. A., ERDOS, G., WANG, Z., MILOSEVIC, J., TKACHEVA, O. A., DIVITO, S. J., JORDAN, R., LYONS-WEILER, J., WATKINS, S. C. & MORELLI, A. E. 2012. Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood*, 119, 756-66.
- MONTELEONE, M., STOW, J. L. & SCHRODER, K. 2015. Mechanisms of unconventional secretion of IL-1 family cytokines. *Cytokine*, 74, 213-218.
- MORELLE, W., STECHLY, L., ANDRÉ, S., SEUNINGEN ISABELLE, V., PORCHET, N., GABIUS, H.-J., MICHALSKI, J.-C. & HUET, G. 2009. Glycosylation pattern of brush border-associated glycoproteins in enterocyte-like cells: involvement of complex-type N-glycans in apical trafficking. *Biological Chemistry*.
- MORITA, E., SANDRIN, V., CHUNG, H. Y., MORHAM, S. G., GYGI, S. P., RODESCH, C. K. & SUNDQUIST, W. I. 2007. Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis. *The EMBO Journal*, 26, 4215-4227.
- MORITA, E., SANDRIN, V., MCCULLOUGH, J., KATSUYAMA, A., BACI HAMILTON, I. & SUNDQUIST, W. I. 2011. ESCRT-III protein requirements for HIV-1 budding. *Cell Host Microbe*, 9, 235-242.
- MORITA, E. & SUNDQUIST, W. I. 2004. RETROVIRUS BUDDING. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20, 395-425.
- MOSTOV, K. E., DE BRUYN KOPS, A. & DEITCHER, D. L. 1986. Deletion of the cytoplasmic domain of the polymeric immunoglobulin receptor prevents basolateral localization and endocytosis. *Cell*, 47, 359-364.
- MULLER, W. E., CONRAD, J., SCHRODER, C., ZAHN, R. K., KURELEC, B., DREESBACH, K. & UHLENBRUCK, G. 1983. Characterization of the trimeric, self-recognizing *Geodia cydonium* lectin I. *Eur J Biochem*, 133, 263-7.
- MUNTASELL, A., BERGER, A. C. & ROCHE, P. A. 2007. T cell-induced secretion of MHC class II-peptide complexes on B cell exosomes. *Embo j*, 26, 4263-72.
- MURALIDHARAN-CHARI, V., CLANCY, J., PLOU, C., ROMAO, M., CHAVRIER, P., RAPOSO, G. & D'SOUZA-SCHOREY, C. 2009. ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles. *Curr Biol*, 19, 1875-85.
- MURALIDHARAN-CHARI, V., CLANCY, J. W., SEDGWICK, A. & D'SOUZA-SCHOREY, C. 2010. Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *J Cell Sci*, 123, 1603-11.

- MÜSCH, A. 2004. Microtubule Organization and Function in Epithelial Cells. *Traffic*, 5, 1-9.
- NABHAN, J. F., HU, R., OH, R. S., COHEN, S. N. & LU, Q. 2012. Formation and release of arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles (ARMMs) at plasma membrane by recruitment of TSG101 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 4146-51.
- NANGIA-MAKKER, P., NAKAHARA, S., HOGAN, V. & RAZ, A. 2007. Galectin-3 in apoptosis, a novel therapeutic target. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 39, 79-84.
- NICKEL, W. 2010. Pathways of unconventional protein secretion. *Current Opinion in Biotechnology*, 21, 621-626.
- NICKEL, W. 2011. The Unconventional Secretory Machinery of Fibroblast Growth Factor 2. *Traffic*, 12, 799-805.
- NICKEL, W. & RABOUILLE, C. 2009. Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 148-55.
- NIEMINEN, J., KUNO, A., HIRABAYASHI, J. & SATO, S. 2007. Visualization of galectin-3 oligomerization on the surface of neutrophils and endothelial cells using fluorescence resonance energy transfer. *J.Biol.Chem.*, 282, 1374-1383.
- NIEUWENHUIZEN, R. P., LIDKE, K. A., BATES, M., PUIG, D. L., GRUNWALD, D., STALLINGA, S. & RIEGER, B. 2013. Measuring image resolution in optical nanoscopy. *Nat Methods*, 10, 557-62.
- NOWAK, T. P., KOBILER, D., ROEL, L. E. & BARONDES, S. H. 1977. Developmentally regulated lectin from embryonic chick pectoral muscle. Purification by affinity chromatography. *Journal of Biological Chemistry*, 252, 6026-30.
- OCHIENG, J., FRIDMAN, R., NANGIA-MAKKER, P., KLEINER, D. E., LIOTTA, L. A., STETLER-STEVENSON, W. G. & RAZ, A. 1994. Galectin-3 is a novel substrate for human matrix metalloproteinases-2 and -9. *Biochemistry*, 33, 14109-14.
- OGAWA, Y., KANAI-AZUMA, M., AKIMOTO, Y., KAWAKAMI, H. & YANOSHITA, R. 2008. Exosome-like vesicles with dipeptidyl peptidase IV in human saliva. *Biol Pharm Bull*, 31, 1059-62.
- OGDEN, A. T., NUNES, I., KO, K., WU, S., HINES, C. S., WANG, A.-F., HEGDE, R. S. & LANG, R. A. 1998. GRIFIN, a Novel Lens-specific Protein Related to the Galectin Family. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 28889-28896.
- OLMOS, Y., HODGSON, L., MANTELL, J., VERKADE, P. & CARLTON, J. G. 2015. ESCRT-III controls nuclear envelope reformation. *Nature*, 522, 236.
- PALADE, G. E. 1955. Studies on the endoplasmic reticulum. II. Simple dispositions in cells in situ. *J Biophys Biochem Cytol*, 1, 567-82.
- PALADINO, S., POCARD, T., CATINO, M. A. & ZURZOLO, C. 2006. GPI-anchored proteins are directly targeted to the apical surface in fully polarized MDCK cells. *J.Cell Biol.*, 172, 1023-1034.
- PALADINO, S., SARNATARO, D., PILLICH, R., TIVODAR, S., NITSCH, L. & ZURZOLO, C. 2004. Protein oligomerization modulates raft partitioning and apical sorting of GPI-anchored proteins. *J.Cell Biol.*, 167, 699-709.
- PALADINO, S., SARNATARO, D., TIVODAR, S. & ZURZOLO, C. 2007. Oligomerization is a specific requirement for apical sorting of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins but not for non-raft-associated apical proteins. *Traffic.*, 8, 251-258.
- PARCZYK, K. & KOCH-BRANDT, C. 1991. The role of carbohydrates in vectorial exocytosis The secretion of the gp 80 glycoprotein complex in a ricin-resistant mutant of MDCK cells. *FEBS Letters*, 278, 267-270.
- PAROLINI, I., FEDERICI, C., RAGGI, C., LUGINI, L., PALLESCHI, S., DE MILITO, A., COSCIA, C., IESSI, E., LOGOZZI, M., MOLINARI, A., COLONE, M., TATTI, M., SARGIACOMO, M. & FAIS, S. 2009. Microenvironmental pH Is a Key Factor for Exosome Traffic in Tumor Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 34211-34222.

- PARTRIDGE, E. A., LE, R. C., DI GUGLIELMO, G. M., PAWLING, J., CHEUNG, P., GRANOVSKY, M., NABI, I. R., WRANA, J. L. & DENNIS, J. W. 2004. Regulation of cytokine receptors by Golgi N-glycan processing and endocytosis. *Science*, 306, 120-124.
- PAZ, I., SACHSE, M., DUPONT, N., MOUNIER, J., CEDERFUR, C., ENNINGA, J., LEFFLER, H., POIRIER, F., PREVOST, M.-C., LAFONT, F. & SANSONETTI, P. 2010. Galectin-3, a marker for vacuole lysis by invasive pathogens. *Cellular Microbiology*, 12, 530-544.
- PFEIFER, K., HAASEMANN, M., GAMULIN, V., BRETTEING, H., FAHRENHOLZ, F. & MULLER, W. E. 1993. S-type lectins occur also in invertebrates: high conservation of the carbohydrate recognition domain in the lectin genes from the marine sponge *Geodia cydonium*. *Glycobiology*, 3, 179-84.
- PISITKUN, T., SHEN, R. F. & KNEPPER, M. A. 2004. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 13368-73.
- PORNILLOS, O., ALAM, S. L., RICH, R. L., MYSZKA, D. G., DAVIS, D. R. & SUNDQUIST, W. I. 2002. Structure and functional interactions of the Tsg101 UEV domain. *The EMBO Journal*, 21, 2397-2406.
- PORNILLOS, O., HIGGINSON, D. S., STRAY, K. M., FISHER, R. D., GARRUS, J. E., PAYNE, M., HE, G. P., WANG, H. E., MORHAM, S. G. & SUNDQUIST, W. I. 2003. HIV Gag mimics the Tsg101-recruiting activity of the human Hrs protein. *J Cell Biol*, 162, 425-34.
- POTTER, B. A., IHRKE, G., BRUNS, J. R., WEIXEL, K. M. & WEISZ, O. A. 2004. Specific N-glycans direct apical delivery of transmembrane, but not soluble or glycosylphosphatidylinositol-anchored forms of endolyn in Madin-Darby canine kidney cells. *Mol. Biol. Cell*, 15, 1407-1416.
- POTTER, B. A., WEIXEL, K. M., BRUNS, J. R., IHRKE, G. & WEISZ, O. A. 2006. N-Glycans Mediate Apical Recycling of the Sialomucin Endolyn in Polarized MDCK Cells. *Traffic*, 7, 146-154.
- PROGIDA, C., MALEROD, L., STUFFERS, S., BRECH, A., BUCCI, C. & STENMARK, H. 2007. RILP is required for the proper morphology and function of late endosomes. *J Cell Sci*, 120, 3729-37.
- PUERTOLLANO, R. 2005. Interactions of TOM1L1 with the Multivesicular Body Sorting Machinery. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 9258-9264.
- PUERTOLLANO, R. & BONIFACINO, J. S. 2004. Interactions of GGA3 with the ubiquitin sorting machinery. *Nature Cell Biology*, 6, 244.
- QU, Y., FRANCHI, L., NUNEZ, G. & DUBYAK, G. R. 2007. Nonclassical IL-1 β Secretion Stimulated by P2X7 Receptors Is Dependent on Inflammasome Activation and Correlated with Exosome Release in Murine Macrophages. *The Journal of Immunology*, 179, 1913-1925.
- RAAB, M., GENTILI, M., DE BELLY, H., THIAM, H.-R., VARGAS, P., JIMENEZ, A. J., LAUTENSCHLAEGER, F., VOITURIEZ, R., LENNON-DUMÉNIL, A.-M., MANEL, N. & PIEL, M. 2016. ESCRT III repairs nuclear envelope ruptures during cell migration to limit DNA damage and cell death. *Science*, 352, 359-362.
- RABOUILLE, C. 2017. Pathways of Unconventional Protein Secretion. *Trends in Cell Biology*, 27, 230-240.
- RABOUILLE, C. & LINSTEDT, A. D. 2016. GRASP: A Multitasking Tether. *Front Cell Dev Biol*, 4, 1.
- RABOUILLE, C., MALHOTRA, V. & NICKEL, W. 2012. Diversity in unconventional protein secretion. *Journal of Cell Science*, 125, 5251-5255.
- RAIBORG, C., GRØNVOLD BACHE, K., MEHLUM, A., STANG, E. & STENMARK, H. 2001. Hrs recruits clathrin to early endosomes. *The EMBO Journal*, 20, 5008-5021.

- RAIBORG, C., WESCHE, J., MALERØD, L. & STENMARK, H. 2006. Flat clathrin coats on endosomes mediate degradative protein sorting by scaffolding Hrs in dynamic microdomains. *Journal of Cell Science*, 119, 2414-2424.
- RAJ, D. A., FIUME, I., CAPASSO, G. & POCSEFALVI, G. 2012. A multiplex quantitative proteomics strategy for protein biomarker studies in urinary exosomes. *Kidney Int*, 81, 1263-72.
- RAMEZANI, A., HAWLEY, T. S. & HAWLEY, R. G. 2000. Lentiviral Vectors for Enhanced Gene Expression in Human Hematopoietic Cells. *Molecular Therapy*, 2, 458-469.
- RAPOSO, G., NIJMAN, H. W., STOORVOGEL, W., LIEJENDEKKER, R., HARDING, C. V., MELIEF, C. J. & GEUZE, H. J. 1996a. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med*, 183, 1161-72.
- RAPOSO, G., NIJMAN, H. W., STOORVOGEL, W., LIEJENDEKKER, R., HARDING, C. V., MELIEF, C. J. & GEUZE, H. J. 1996b. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *The Journal of Experimental Medicine*, 183, 1161-1172.
- RAPOSO, G. & STOORVOGEL, W. 2013. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *The Journal of Cell Biology*, 200, 373-383.
- RAUCH, S. & MARTIN-SERRANO, J. 2011. Multiple Interactions between the ESCRT Machinery and Arrestin-Related Proteins: Implications for PPXY-Dependent Budding. *Journal of Virology*, 85, 3546-3556.
- RAZ, A., MEROMSKY, L., ZVIBEL, I. & LOTAN, R. 1987. Transformation-related changes in the expression of endogenous cell lectins. *Int J Cancer*, 39, 353-60.
- RAZ, A., PAZERINI, G. & CARMI, P. 1989. Identification of the Metastasis-associated, Galactoside-binding Lectin as a Chimeric Gene Product with Homology to an IgE-binding Protein. *Cancer Research*, 49, 3489-3493.
- REDDY, A., CALER, E. V. & ANDREWS, N. W. 2001. Plasma Membrane Repair Is Mediated by Ca²⁺-Regulated Exocytosis of Lysosomes. *Cell*, 106, 157-169.
- RICARDO, S. & LEHMANN, R. 2009. An ABC Transporter Controls Export of a Drosophila Germ Cell Attractant. *Science*, 323, 943-946.
- RICHARDSON, J. C., SCALERA, V. & SIMMONS, N. L. 1981. Identification of two strains of MDCK cells which resemble separate nephron tubule segments. *Biochim Biophys Acta*, 673, 26-36.
- RINDLER, M. J., CHUMAN, L. M., SHAFFER, L. & SAIER, M. H. 1979a. Retention of differentiated properties in an established dog kidney epithelial cell line (MDCK). *The Journal of Cell Biology*, 81, 635-648.
- RINDLER, M. J., IVANOV, I. E., PLESKEN, H., RODRIGUEZ-BOULAN, E. & SABATINI, D. D. 1984. Viral glycoproteins destined for apical or basolateral plasma membrane domains traverse the same Golgi apparatus during their intracellular transport in doubly infected Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol*, 98, 1304-19.
- RINDLER, M. J., TAUB, M. & SAIER, M. H. 1979b. Uptake of ²²Na⁺ by cultured dog kidney cells (MDCK). *Journal of Biological Chemistry*, 254, 11431-9.
- ROBERTSON, M. W., ALBRANDT, K., KELLER, D. & LIU, F. T. 1990. Human IgE-binding protein: a soluble lectin exhibiting a highly conserved interspecies sequence and differential recognition of IgE glycoforms. *Biochemistry*, 29, 8093-100.
- RODRIGUEZ-BOULAN, E., KREITZER, G. & MUSCH, A. 2005. Organization of vesicular trafficking in epithelia. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 233-47.
- RODRIGUEZ-BOULAN, E. & MÜSCH, A. 2005. Protein sorting in the Golgi complex: Shifting paradigms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1744, 455-464.
- RODRIGUEZ-BOULAN, E., PASKIET, K. T., SALAS, P. J. & BARD, E. 1984. Intracellular transport of influenza virus hemagglutinin to the apical surface of Madin-Darby canine kidney cells. *J. Cell Biol.*, 98, 308-319.

- RODRÍGUEZ, A., WEBSTER, P., ORTEGO, J. & ANDREWS, N. W. 1997. Lysosomes Behave as Ca²⁺ regulated Exocytic Vesicles in Fibroblasts and Epithelial Cells. *The Journal of Cell Biology*, 137, 93-104.
- ROFF, C. F., ROSEVEAR, P. R., WANG, J. L. & BARKER, R. 1983. Identification of carbohydrate-binding proteins from mouse and human fibroblasts. *Biochemical Journal*, 211, 625-629.
- ROFF, C. F. & WANG, J. L. 1983. Endogenous lectins from cultured cells. Isolation and characterization of carbohydrate-binding proteins from 3T3 fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 258, 10657-63.
- ROUSH, D. L., GOTTARDI, C. J., NAIM, H. Y., ROTH, M. G. & CAPLAN, M. J. 1998. Tyrosine-based Membrane Protein Sorting Signals Are Differentially Interpreted by Polarized Madin-Darby Canine Kidney and LLC-PK1 Epithelial Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 26862-26869.
- SACHSE, M., URBÉ, S., OORSCHOT, V., STROUS, G. J. & KLUMPERMAN, J. 2002. Bilayered Clathrin Coats on Endosomal Vacuoles Are Involved in Protein Sorting toward Lysosomes. *Molecular Biology of the Cell*, 13, 1313-1328.
- SAIER, M. H., JR. & DEUTSCHER, J. 1988. [Coordinate control of cell growth and transport functions in a kidney cell line]. *Naturwissenschaften*, 75, 451-7.
- SALOMONSSON, E., CARLSSON, M. C., OSLA, V., HENDUS-ALTENBURGER, R., KAHL-KNUTSON, B., OBERG, C. T., SUNDIN, A., NILSSON, R., NORDBERG-KARLSSON, E., NILSSON, U. J., KARLSSON, A., RINI, J. M. & LEFFLER, H. 2010. Mutational tuning of galectin-3 specificity and biological function. *J.Biol.Chem.*, 285, 35079-35091.
- SAMBROOK, J. & RUSSELL, D. W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SARNATARO, D., CAMPANA, V., PALADINO, S., STORNAIUOLO, M., NITSCH, L. & ZURZOLO, C. 2004. PrP(C) association with lipid rafts in the early secretory pathway stabilizes its cellular conformation. *Mol.Biol.Cell*, 15, 4031-4042.
- SATO, G. 1981. *Functionally Differentiated Cell Lines*, Liss.
- SATO, S., BURDETT, I. & HUGHES, R. C. 1993. Secretion of the baby hamster kidney 30-kDa galactose-binding lectin from polarized and nonpolarized cells: a pathway independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex. *Exp.Cell Res.*, 207, 8-18.
- SATO, S. & HUGHES, R. C. 1992. Binding specificity of a baby hamster kidney lectin for H type I and II chains, polylectosamine glycans, and appropriately glycosylated forms of laminin and fibronectin. *Journal of Biological Chemistry*, 267, 6983-6990.
- SAVINA, A., FURLAN, M., VIDAL, M. & COLOMBO, M. I. 2003. Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. *J Biol Chem*, 278, 20083-90.
- SCHÄFER, T., ZENTGRAF, H., ZEHE, C., BRÜGGER, B., BERNHAGEN, J. & NICKEL, W. 2004. Unconventional Secretion of Fibroblast Growth Factor 2 Is Mediated by Direct Translocation across the Plasma Membrane of Mammalian Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 6244-6251.
- SCHEIFFELE, P., PERANEN, J. & SIMONS, K. 1995. N-glycans as apical sorting signals in epithelial cells. *Nature*, 378, 96-98.
- SCHLUNDT, A., STICHT, J., PIOTUKH, K., KOSSLICK, D., JAHNKE, N., KELLER, S., SCHUEMANN, M., KRAUSE, E. & FREUND, C. 2009. Proline-rich Sequence Recognition: II. PROTEOMICS ANALYSIS OF Tsg101 UBIQUITIN-E2-LIKE VARIANT (UEV) INTERACTIONS. *Molecular & Cellular Proteomics*, 8, 2474-2486.
- SCHMIDT, H., GELHAUS, C., NEBENDAHL, M., LETTAU, M., LUCIUS, R., LEIPPE, M., KABELITZ, D. & JANSSEN, O. 2011. Effector granules in human T lymphocytes: the luminal proteome of secretory lysosomes from human T cells. *Cell Commun Signal*, 9, 4.

- SCHNEIDER, D. 2011. *Unkonventionelle Sekretion und Endozytose von Galectin-3*, Philipps-Universität Marburg.
- SCHNEIDER, D., GREB, C., KOCH, A., STRAUBE, T., ELLI, A., DELACOUR, D. & JACOB, R. 2010. Trafficking of galectin-3 through endosomal organelles of polarized and non-polarized cells. *Eur.J.Cell Biol.*, 89, 788-798.
- SCHNEIDER, T. D. & STEPHENS, R. M. 1990. Sequence logos: a new way to display consensus sequences. *Nucleic Acids Res*, 18, 6097-100.
- SCHNITZBAUER, J., STRAUSS, M. T., SCHLICHTHAERLE, T., SCHUEDER, F. & JUNGSMANN, R. 2017. Super-resolution microscopy with DNA-PAINT. *Nat Protoc*, 12, 1198-1228.
- SCHOTMAN, H., KARHINEN, L. & RABOUILLE, C. 2008. dGRASP-Mediated Noncanonical Integrin Secretion Is Required for Drosophila Epithelial Remodeling. *Developmental Cell*, 14, 171-182.
- SCHROEDER, R., LONDON, E. & BROWN, D. 1994. Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 12130-4.
- SCOTT, A., CHUNG, H. Y., GONCIARZ-SWIATEK, M., HILL, G. C., WHITBY, F. G., GASPAR, J., HOLTON, J. M., VISWANATHAN, R., GHAFARIAN, S., HILL, C. P. & SUNDQUIST, W. I. 2005. Structural and mechanistic studies of VPS4 proteins. *Embo j*, 24, 3658-69.
- SEELENMEYER, C., STEGMAYER, C. & NICKEL, W. 2008. Unconventional secretion of fibroblast growth factor 2 and galectin-1 does not require shedding of plasma membrane-derived vesicles. *FEBS Lett*, 582, 1362-8.
- SEELENMEYER, C., WEGEHINGEL, S., TEWS, I., KÜNZLER, M., AEBI, M. & NICKEL, W. 2005. Cell surface counter receptors are essential components of the unconventional export machinery of galectin-1. *The Journal of Cell Biology*, 171, 373-381.
- SEETHARAMAN, J., KANIGSBERG, A., SLAABY, R., LEFFLER, H., BARONDES, S. H. & 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, 13047-13052.
- SHI, Y., LIN, X., CHEN, G., YAN, J., YING, M. & ZHENG, X. 2017. Galectin-3 rs4652 A>C polymorphism is associated with the risk of gastric carcinoma and P-glycoprotein expression level. *Oncol Lett*, 14, 8144-8149.
- SHIH, S. C., KATZMANN, D. J., SCHNELL, J. D., SUTANTO, M., EMR, S. D. & HICKE, L. 2002. Epsins and Vps27p/Hrs contain ubiquitin-binding domains that function in receptor endocytosis. *Nature Cell Biology*, 4, 389.
- SHOU, J., BULL, C. M., LI, L., QIAN, H. R., WEI, T., LUO, S., PERKINS, D., SOLENBERG, P. J., TAN, S. L., CHEN, X. Y., ROEHM, N. W., WOLOS, J. A. & ONYIA, J. E. 2006. Identification of blood biomarkers of rheumatoid arthritis by transcript profiling of peripheral blood mononuclear cells from the rat collagen-induced arthritis model. *Arthritis Res Ther*, 8, R28.
- SIMMEN, T., HONING, S., ICKING, A., TIKKANEN, R. & HUNZIKER, W. 2002. AP-4 binds basolateral signals and participates in basolateral sorting in epithelial MDCK cells. *Nat.Cell Biol.*, 4, 154-159.
- SIMONS, K. & IKONEN, E. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387, 569-572.
- SIMONS, K. & VIRTA, H. 2006. Chapter 15 - Growing Madin-Darby Canine Kidney Cells for Studying Epithelial Cell Biology A2 - Celis, Julio E. *Cell Biology (Third Edition)*. Burlington: Academic Press.
- SINZELLE, L., IZSVAK, Z. & IVICS, Z. 2009. Molecular domestication of transposable elements: from detrimental parasites to useful host genes. *Cell Mol Life Sci*, 66, 1073-93.

- SKOG, J., WÜRDINGER, T., VAN RIJN, S., MEIJER, D. H., GAINCHE, L., CURRY JR, W. T., CARTER, B. S., KRICHEVSKY, A. M. & BREAKEYFIELD, X. O. 2008. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nature Cell Biology*, 10, 1470.
- SKOGBERG, G., GUDMUNSDOTTIR, J., VAN DER POST, S., SANDSTROM, K., BRUHN, S., BENSON, M., MINCHEVA-NILSSON, L., BARANOV, V., TELEMO, E. & EKWALL, O. 2013. Characterization of human thymic exosomes. *PLoS One*, 8, e67554.
- SLAGSVOLD, T., AASLAND, R., HIRANO, S., BACHE, K. G., RAIBORG, C., TRAMBALIOLO, D., WAKATSUKI, S. & STENMARK, H. 2005. Eap45 in mammalian ESCRT-II binds ubiquitin via a phosphoinositide-interacting GLUE domain. *J Biol Chem*, 280, 19600-6.
- SLAUGHTER, R. S., SMART, C. E., WONG, D.-S. & LEVER, J. E. 1982. Lysosomotropic agents and inhibitors of cellular transglutaminase stimulate dome formation, a differentiated characteristic of MDCK kidney epithelial cell cultures. *Journal of Cellular Physiology*, 112, 141-147.
- SOTELO, J. R. & PORTER, K. R. 1959. An electron microscope study of the rat ovum. *J Biophys Biochem Cytol*, 5, 327-42.
- SPARROW, C. P., LEFFLER, H. & BARONDES, S. H. 1987. Multiple soluble beta-galactoside-binding lectins from human lung. *J.Biol.Chem.*, 262, 7383-7390.
- STALZ, H., ROTH, U., SCHLEUDER, D., MACHT, M., HAEBEL, S., STRUPAT, K., PETER-KATALINIC, J. & HANISCH, F. G. 2006. The *Geodia cydonium* galectin exhibits prototype and chimera-type characteristics and a unique sequence polymorphism within its carbohydrate recognition domain. *Glycobiology*, 16, 402-14.
- STECHLY, L., MORELLE, W., DESSEIN, A. F., ANDRE, S., GRARD, G., TRINEL, D., DEJONGHE, M. J., LETEURTRE, E., DROBECQ, H., TRUGNAN, G., GABIUS, H. J. & HUET, G. 2009. Galectin-4-regulated delivery of glycoproteins to the brush border membrane of enterocyte-like cells. *Traffic.*, 10, 438-450.
- STEINHAEUER, C., FORTHMANN, C., VOGELSANG, J. & TINNEFELD, P. 2008. Superresolution microscopy on the basis of engineered dark states. *J Am Chem Soc*, 130, 16840-1.
- STERINGER, J. P., BLEICKEN, S., ANDREAS, H., ZACHERL, S., LAUSSMANN, M., TEMMERMAN, K., CONTRERAS, F. X., BHARAT, T. A. M., LECHNER, J., MÜLLER, H.-M., BRIGGS, J. A. G., GARCÍA-SÁEZ, A. J. & NICKEL, W. 2012. Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate (PI(4,5)P₂)-dependent Oligomerization of Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2) Triggers the Formation of a Lipidic Membrane Pore Implicated in Unconventional Secretion. *Journal of Biological Chemistry*, 287, 27659-27669.
- STERINGER, J. P., LANGE, S., ČUJOVÁ, S., ŠACHL, R., POOJARI, C., LOLICATO, F., BEUTEL, O., MÜLLER, H.-M., UNGER, S., COSKUN, Ü., HONIGMANN, A., VATTULAINEN, I., HOF, M., FREUND, C. & NICKEL, W. 2017. Key steps in unconventional secretion of fibroblast growth factor 2 reconstituted with purified components. *eLife*, 6, e28985.
- STERINGER, J. P., MÜLLER, H.-M. & NICKEL, W. 2015. Unconventional Secretion of Fibroblast Growth Factor 2—A Novel Type of Protein Translocation across Membranes? *Journal of Molecular Biology*, 427, 1202-1210.
- STEWART, S. E., MENZIES, S. A., POPA, S. J., SAVINYKH, N., PETRUNKINA HARRISON, A., LEHNER, P. J. & MOREAU, K. 2017. A genome-wide CRISPR screen reconciles the role of N-linked glycosylation in galectin-3 transport to the cell surface. *Journal of Cell Science*, 130, 3234-3247.
- STILES, C. D., DESMOND, W., CHUMAN, L. M., SATO, G. & SAIER, M. H. 1976. Growth Control of Heterologous Tissue Culture Cells in the Congenitally Athymic Nude Mouse. *Cancer Research*, 36, 1353-1360.
- STINCHCOMBE, J., BOSSI, G. & GRIFFITHS, G. M. 2004. Linking Albinism and Immunity: The Secrets of Secretory Lysosomes. *Science*, 305, 55-59.

- STRACK, B., CALISTRI, A., CRAIG, S., POPOVA, E. & GOTTLINGER, H. G. 2003. AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell*, 114, 689-99.
- STRAUBE, T., VON, M. T., HONIG, E., GREB, C., SCHNEIDER, D. & JACOB, R. 2013. PH-dependent recycling of galectin-3 at the apical membrane of epithelial cells. *Traffic*, 14, 1014-1027.
- STRIEBEL, F., KRESS, W. & WEBER-BAN, E. 2009. Controlled destruction: AAA+ ATPases in protein degradation from bacteria to eukaryotes. *Curr Opin Struct Biol*, 19, 209-17.
- TAKENAKA, Y., FUKUMORI, T. & RAZ, A. 2002. Galectin-3 and metastasis. *Glycoconj J*, 19, 543-9.
- TARABOLETTI, G., D'ASCENZO, S., GIUSTI, I., MARCHETTI, D., BORSOTTI, P., MILLIMAGGI, D., GIAVAZZI, R., PAVAN, A. & DOLO, V. 2006. Bioavailability of VEGF in tumor-shed vesicles depends on vesicle burst induced by acidic pH. *Neoplasia*, 8, 96-103.
- TEICHBERG, V. I., SILMAN, I., BEITSCH, D. D. & RESHEFF, G. 1975. A beta-D-galactoside binding protein from electric organ tissue of *Electrophorus electricus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72, 1383-7.
- TEIS, D., SAKSENA, S. & EMR, S. D. 2008. Ordered assembly of the ESCRT-III complex on endosomes is required to sequester cargo during MVB formation. *Dev Cell*, 15, 578-89.
- TEO, H., GILL, D. J., SUN, J., PERISIC, O., VEPRINTSEV, D. B., VALLIS, Y., EMR, S. D. & WILLIAMS, R. L. 2006. ESCRT-I core and ESCRT-II GLUE domain structures reveal role for GLUE in linking to ESCRT-I and membranes. *Cell*, 125, 99-111.
- TEO, H., PERISIC, O., GONZALEZ, B. & WILLIAMS, R. L. 2004. ESCRT-II, an endosome-associated complex required for protein sorting: crystal structure and interactions with ESCRT-III and membranes. *Dev Cell*, 7, 559-69.
- THAN, N. G., SUMEGI, B., THAN, G. N., BERENTE, Z. & BOHN, H. 1999. Isolation and Sequence Analysis of a cDNA Encoding Human Placental Tissue Protein 13 (PP13), a New Lysophospholipase, Homologue of Human Eosinophil Charcot-Leyden Crystal Protein. *Placenta*, 20, 703-710.
- THERY, C., BOUSSAC, M., VERON, P., RICCIARDI-CASTAGNOLI, P., RAPOSO, G., GARIN, J. & AMIGORENA, S. 2001. Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J.Immunol.*, 166, 7309-7318.
- THERY, C., REGNAULT, A., GARIN, J., WOLFERS, J., ZITVOGEL, L., RICCIARDI-CASTAGNOLI, P., RAPOSO, G. & AMIGORENA, S. 1999. Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73. *J Cell Biol*, 147, 599-610.
- THERY, C., ZITVOGEL, L. & AMIGORENA, S. 2002. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol*, 2, 569-79.
- TIVODAR, S., PALADINO, S., PILLICH, R., PRINETTI, A., CHIGORNO, V., VAN MEER, G., SONNINO, S. & ZURZOLO, C. 2006. Analysis of detergent-resistant membranes associated with apical and basolateral GPI-anchored proteins in polarized epithelial cells. *FEBS Lett*, 580, 5705-12.
- TOSCANO, M. A., BIANCO, G. A., ILARREGUI, J. M., CROCI, D. O., CORREALE, J., HERNANDEZ, J. D., ZWIRNER, N. W., POIRIER, F., RILEY, E. M., BAUM, L. G. & RABINOVICH, G. A. 2007. Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. *Nat Immunol*, 8, 825-34.
- TOWBIN, H., STAHELIN, T. & GORDON, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 76, 4350-4354.
- TRAJKOVIC, K., HSU, C., CHIANTIA, S., RAJENDRAN, L., WENZEL, D., WIELAND, F., SCHWILLE, P., BRUGGER, B. & SIMONS, M. 2008. Ceramide triggers

- budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science*, 319, 1244-7.
- URBAN, J., PARCZYK, K., LEUTZ, A., KAYNE, M. & KONDOR-KOCH, C. 1987. Constitutive apical secretion of an 80-kD sulfated glycoprotein complex in the polarized epithelial Madin-Darby canine kidney cell line. *J. Cell Biol.*, 105, 2735-2743.
- USAMI, Y., POPOV, S. & GÖTTLINGER, H. G. 2007. Potent Rescue of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Late Domain Mutants by ALIX/AIP1 Depends on Its CHMP4 Binding Site. *Journal of Virology*, 81, 6614-6622.
- VALENTICH, J. D. 1981. Morphological similarities between the dog kidney cell line MDCK and the mammalian cortical collecting tubule. *Ann N Y Acad Sci*, 372, 384-405.
- VAN DER POL, E., BÖING, A. N., HARRISON, P., STURK, A. & NIEUWLAND, R. 2012. Classification, Functions, and Clinical Relevance of Extracellular Vesicles. *Pharmacological Reviews*, 64, 676-705.
- VAN KIMMENADE, R. R. J. & JANUZZI, J. L. 2012. Emerging Biomarkers in Heart Failure. *Clinical Chemistry*, 58, 127-138.
- VAN MEER, G. & SIMONS, K. 1986. The function of tight junctions in maintaining differences in lipid composition between the apical and the basolateral cell surface domains of MDCK cells. *EMBO J.*, 5, 1455-1464.
- VAN MEER, G. & SIMONS, K. 1988. Lipid polarity and sorting in epithelial cells. *J. Cell Biochem.*, 36, 51-58.
- VERPLANK, L., BOUAMR, F., LAGRASSA, T. J., AGRESTA, B., KIKONYOGO, A., LEIS, J. & CARTER, C. A. 2001. Tsg101, a homologue of ubiquitin-conjugating (E2) enzymes, binds the L domain in HIV type 1 Pr55^{Gag}. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, 7724-7729.
- VESPA, G. N., LEWIS, L. A., KOZAK, K. R., MORAN, M., NGUYEN, J. T., BAUM, L. G. & MICELI, M. C. 1999. Galectin-1 specifically modulates TCR signals to enhance TCR apoptosis but inhibit IL-2 production and proliferation. *J Immunol*, 162, 799-806.
- VIDAL, M., MANGEAT, P. & HOEKSTRA, D. 1997. Aggregation reroutes molecules from a recycling to a vesicle-mediated secretion pathway during reticulocyte maturation. *J. Cell Sci.*, 110 (Pt 16), 1867-1877.
- VIEIRA, O. V., VERKADE, P., MANNINEN, A. & SIMONS, K. 2005. FAPP2 is involved in the transport of apical cargo in polarized MDCK cells. *J. Cell Biol.*, 170, 521-526.
- VIETRI, M., SCHINK, K. O., CAMPSTEIJN, C., WEGNER, C. S., SCHULTZ, S. W., CHRIST, L., THORESEN, S. B., BRECH, A., RAIBORG, C. & STENMARK, H. 2015. Spastin and ESCRT-III coordinate mitotic spindle disassembly and nuclear envelope sealing. *Nature*, 522, 231.
- VON DER MALSBURG, A., ABUTBUL-IONITA, I., HALLER, O., KOCHS, G. & DANINO, D. 2011. Stalk domain of the dynamin-like MxA GTPase protein mediates membrane binding and liposome tubulation via the unstructured L4 loop. *J. Biol. Chem.*, 286, 37858-37865.
- VON SCHWEDLER, U. K., STUCHELL, M., MULLER, B., WARD, D. M., CHUNG, H. Y., MORITA, E., WANG, H. E., DAVIS, T., HE, G. P., CIMBORA, D. M., SCOTT, A., KRAUSSLICH, H. G., KAPLAN, J., MORHAM, S. G. & SUNDQUIST, W. I. 2003. The protein network of HIV budding. *Cell*, 114, 701-713.
- WAGNER-HÜLSMANN, C., BACHINSKI, N., DIEHL-SEIFERT, B., BLUMBACH, B., STEFFEN, R., PANCER, Z. & MÜLLER, W. E. G. 1996. A galectin links the aggregation factor to cells in the sponge (*Geodia cydonium*) system. *Glycobiology*, 6, 785-793.
- WANG, S. F., TSAO, C. H., LIN, Y. T., HSU, D. K., CHIANG, M. L., LO, C. H., CHIEN, F. C., CHEN, P., ARTHUR CHEN, Y. M., CHEN, H. Y. & LIU, F. T. 2014.

- Galectin-3 promotes HIV-1 budding via association with Alix and Gag p6. *Glycobiology*, 24, 1022-35.
- WANG, T. & HONG, W. 2006. RILP interacts with VPS22 and VPS36 of ESCRT-II and regulates their membrane recruitment. *Biochem Biophys Res Commun*, 350, 413-23.
- WEBSTER, B. M., COLOMBI, P., JAGER, J. & LUSK, C. P. 2014. Surveillance of nuclear pore complex assembly by ESCRT-III/Vps4. *Cell*, 159, 388-401.
- WEGEHINGEL, S., ZEHE, C. & NICKEL, W. 2008. Rerouting of fibroblast growth factor 2 to the classical secretory pathway results in post-translational modifications that block binding to heparan sulfate proteoglycans. *FEBS Lett*, 582, 2387-92.
- WEISZ, O. A. & RODRIGUEZ-BOULAN, E. 2009. Apical trafficking in epithelial cells: signals, clusters and motors. *J. Cell Sci.*, 122, 4253-4266.
- WELTON, J. L., KHANNA, S., GILES, P. J., BRENNAN, P., BREWIS, I. A., STAFFURTH, J., MASON, M. D. & CLAYTON, A. 2010. Proteomics analysis of bladder cancer exosomes. *Mol Cell Proteomics*, 9, 1324-38.
- WHITE, I. J., BAILEY, L. M., AGHAKHANI, M. R., MOSS, S. E. & FUTTER, C. E. 2006. EGF stimulates annexin 1-dependent inward vesiculation in a multivesicular endosome subpopulation. *The EMBO Journal*, 25, 1-12.
- WHITE, S. R. & LAURING, B. 2007. AAA+ ATPases: achieving diversity of function with conserved machinery. *Traffic*, 8, 1657-67.
- WIENKEN, C. J., BAASKE, P., ROTHBAUER, U., BRAUN, D. & DUHR, S. 2010. Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis. *Nature Communications*, 1, 100.
- WOLLERT, T. & HURLEY, J. H. 2010. Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature*, 464, 864-9.
- WOLLERT, T., WUNDER, C., LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. & HURLEY, J. H. 2009. Membrane scission by the ESCRT-III complex. *Nature*, 458, 172-7.
- WOO, H. J., LOTZ, M. M., JUNG, J. U. & MERCURIO, A. M. 1991. Carbohydrate-binding protein 35 (Mac-2), a laminin-binding lectin, forms functional dimers using cysteine 186. *Journal of Biological Chemistry*, 266, 18419-18422.
- WOO, H. J., SHAW, L. M., MESSIER, J. M. & MERCURIO, A. M. 1990. The major non-integrin laminin binding protein of macrophages is identical to carbohydrate binding protein 35 (Mac-2). *Journal of Biological Chemistry*, 265, 7097-7099.
- XU, R., GREENING, D. W., RAI, A., JI, H. & SIMPSON, R. J. 2015. Highly-purified exosomes and shed microvesicles isolated from the human colon cancer cell line LIM1863 by sequential centrifugal ultrafiltration are biochemically and functionally distinct. *Methods*, 87, 11-25.
- YANG, R. Y., HILL, P. N., HSU, D. K. & LIU, F. T. 1998. Role of the carboxyl-terminal lectin domain in self-association of galectin-3. *Biochemistry*, 37, 4086-4092.
- YANG, R. Y., HSU, D. K. & LIU, F. T. 1996. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 6737-42.
- YEAMAN, C., LE GALL, A. H., BALDWIN, A. N., MONLAUZEUR, L., LE BIVIC, A. & RODRIGUEZ-BOULAN, E. 1997. The O-glycosylated stalk domain is required for apical sorting of neurotrophin receptors in polarized MDCK cells. *J. Cell Biol.*, 139, 929-940.
- YOO, J.-S., MOYER, B. D., BANNYKH, S., YOO, H.-M., RIORDAN, J. R. & BALCH, W. E. 2002. Non-conventional Trafficking of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator through the Early Secretory Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 11401-11409.
- YOSHII, T., FUKUMORI, T., HONJO, Y., INOHARA, H., KIM, H.-R. C. & RAZ, A. 2002. Galectin-3 Phosphorylation Is Required for Its Anti-apoptotic Function and Cell Cycle Arrest. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 6852-6857.
- ZALBA, G., FORTUÑO, A., ORBE, J., SAN JOSÉ, G., MORENO, M. U., BELZUNCE, M., RODRÍGUEZ, J. A., BELOQUI, O., PÁRAMO, J. A. & DÍEZ, J. 2007. Phagocytic NADPH Oxidase-Dependent Superoxide Production Stimulates

- Matrix Metalloproteinase-9. *Implications for Human Atherosclerosis*, 27, 587-593.
- ZEITLER, M., STERINGER, J. P., MÜLLER, H.-M., MAYER, M. P. & NICKEL, W. 2015. HIV-Tat Protein Forms Phosphoinositide-dependent Membrane Pores Implicated in Unconventional Protein Secretion. *Journal of Biological Chemistry*, 290, 21976-21984.
- ZHAI, Q., FISHER, R. D., CHUNG, H.-Y., MYSZKA, D. G., SUNDQUIST, W. I. & HILL, C. P. 2007. Structural and functional studies of ALIX interactions with YPXnL late domains of HIV-1 and EIAV. *Nature Structural & Molecular Biology*, 15, 43.
- ZHANG, D., ROGERS, G. C., BUSTER, D. W. & SHARP, D. J. 2007. Three microtubule severing enzymes contribute to the "Pacman-flux" machinery that moves chromosomes. *The Journal of Cell Biology*, 177, 231-242.
- ZHANG, M., KENNY, S. J., GE, L., XU, K. & SCHEKMAN, R. 2015. Translocation of interleukin-1 β into a vesicle intermediate in autophagy-mediated secretion. *eLife*, 4, e11205.
- ZHANG, Q.-H., YE, M., WU, X.-Y., REN, S.-X., ZHAO, M., ZHAO, C.-J., FU, G., SHEN, Y., FAN, H.-Y., LU, G., ZHONG, M., XU, X.-R., HAN, Z.-G., ZHANG, J.-W., TAO, J., HUANG, Q.-H., ZHOU, J., HU, G.-X., GU, J., CHEN, S.-J. & CHEN, Z. 2000. Cloning and Functional Analysis of cDNAs with Open Reading Frames for 300 Previously Undefined Genes Expressed in CD34+ Hematopoietic Stem/Progenitor Cells. *Genome Research*, 10, 1546-1560.
- ZHOU, Q. & CUMMINGS, R. D. 1990. The S-type lectin from calf heart tissue binds selectively to the carbohydrate chains of laminin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 281, 27-35.
- ZHU, W.-Q. & OCHIENG, J. 2001. Rapid Release of Intracellular Galectin-3 from Breast Carcinoma Cells by Fetuin. *Cancer Research*, 61, 1869-1873.
- ZIMMERMANN, P., MEERSCHAERT, K., REEKMANS, G., LEENAERTS, I., SMALL, J. V., VANDEKERCKHOVE, J., DAVID, G. & GETTEMANS, J. 2002. PIP2-PDZ Domain Binding Controls the Association of Syntenin with the Plasma Membrane. *Molecular Cell*, 9, 1215-1225.
- ZLATKINE, P., MEHUL, B. & MAGEE, A. I. 1997. Retargeting of cytosolic proteins to the plasma membrane by the Lck protein tyrosine kinase dual acylation motif. *J Cell Sci*, 110 (Pt 5), 673-9.
- ZUFFEREY, R., DONELLO, J. E., TRONO, D. & HOPE, T. J. 1999. Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virol*, 73, 2886-92.

6 Abkürzungsverzeichnis

ACE	<i>Angiotensin Converting Enzyme</i>
AG	Arbeitsgruppe
AOBS	<i>Acousto-Optical-Beam-Splitter</i>
AOTF	<i>Acousto-Optical-Tunable-Filtern</i>
APM	Apikale Plasmamembran
ARE	Apikales Recycling-Endosom
ARRDC1	<i>Arrestin Domain-containing Protein 1</i>
AS	Aminosäure
ASF	Asialofetuin
BS3	Bis(sulfo-succinimidyl)suberat
CAT	Chloramphenicol Acetyl-Transferase
CD	Circulardichroismus
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>
CLICs	<i>Clathrin-independent carriers</i>
CRD	<i>Carbohydrate recognition domain</i>
CUPS	<i>Compartments for UPS</i>
ddH ₂ O	<i>Aqua bidestillata</i>
DOF	<i>Depth of Field</i>
DRM	<i>Detergent resistant Membrane</i>
DTSSP	Dithiobis(sulfosuccinimidyl)propionat
DTT	Dithiothreitol
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor-Rezeptor</i>
EIAV	<i>Equine infectious Anemia Virus</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESCRT	<i>Endosomal Sorting Complex required for Transport</i>
FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
FE	Frühes Endosom
FGF2	<i>Fibroblast Growth Factor 2</i>
FRAP	<i>Fluorescence Recovery after Photobleaching</i>
FRC	Fourier Ring Korrelation
FWHM	<i>Full Width at Half Maximum</i>
Gal	Galektin
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GRIFIN	<i>Galectin-related interfiber protein</i>
GRP	<i>Galectin-related protein</i>

HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
Hrs	<i>Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate</i>
IL-1 β	Interleukin-1 β
ILV	Intraluminale Vesikel
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid
IR-Laser	Infrarot-Laser
ISC	<i>Intersystem Crossing</i>
LBP	<i>Non-Integrin Laminin binding Protein</i>
LPH	Laktase-Phlorizin-Hydrolase
MDCK	<i>Madin-Darby Canine Kidney</i>
MEA	Cysteamin
Mgat5	Mannosylglykoprotein-Acetylglucosaminyl-Transferase V
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
min	Minuten
mRNA	<i>messengerRNA</i>
MST	<i>Microscale Thermophoresis</i>
MTOC	Mikrotubuli-organisierendes Zentrum
MVB	Multivesikuläre Körperchen
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NRMSD	<i>Normalized Root-Mean-Square Deviation</i>
nSMase2	Neutrale Sphingomyelinase-2
PAS	Protein A-Sepharose
PH	Pleckstrin <i>Homology</i>
PLA	<i>Proximity Ligation Assay</i>
PM	Plasmamembran
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMT	<i>Photomultiplier</i>
PP-13	<i>Placental protein 13</i>
PSF	Punktspreizfunktion
PtdIns3P	Phosphatidylinositol-3-Phosphat
RBL	<i>Rat Basophilic Leukemia</i>
RCA	<i>Rolling Circle Amplification</i>
RISC	<i>RNA-induced Silencing Complex</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat

SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i>
SI	Saccharase-Isomaltase
SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment Receptor</i>
STAM1	<i>Signal transducing adapter molecule</i>
SV	Sekretorisches Vesikel
TAT	<i>Transactivator of Transcription</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor
TEER	<i>Trans Epithelial Electric Resistance</i>
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskopie
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TJ	<i>Tight Junction</i>
TRBP	<i>Double-Strand RNA binding-Protein</i>
UEV	Ubiquitin E2 <i>Variant</i>
UPS	Unkonventionelle Proteinsekretion

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 Spezifische Differenzierung der Epithelien.....	1
Abb. 1.2 Aufbau einer polaren Epithelzelle.	2
Abb. 1.3 Zelluläre Logistik.....	4
Abb. 1.4 Modell der Galektin-vermittelten Proteinsortierung in einem Post-Golgi-Kompartiment.	9
Abb. 1.5 Klassifizierung und Struktur der Galektinfamilie.	12
Abb. 1.6 Struktur der Gal3-CRD.	12
Abb. 1.7 Formen der Gal3-Oligomerisierung.....	14
Abb. 1.8 Die Translation klassisch sekretierter Proteine und unkonventionell sekretierter Proteine.....	15
Abb. 1.9 Übersicht der verschiedenen Wege der unkonventionellen Proteinsekretion.	15
Abb. 1.10 Übersicht der unkonventionellen Proteinsekretion Typ-III.	17
Abb. 1.11 Der ESCRT-Superkomplex.	20
Abb. 1.12 Die ESCRT-abhängige Membranabschnürung.	21
Abb. 1.13 Die Wirkungsstätten des ESCRT-Komplexes.	22
Abb. 2.1 Ausbildung von Hemizysten im polaren MDCK-Zellverbund (Schema).....	34
Abb. 2.2 Ausbildung von Hemizysten im polaren MDCK-Zellverbund (Lichtmikroskopie).....	34
Abb. 2.3 Kultivierung von MDCK-Zellen auf porösen PET-Filtereinsätzen.	35
Abb. 2.4 RNAi-Mechanismus.	40
Abb. 2.5 Jablonski-Diagramm zu den verschiedenen Energiezuständen eines Valenzelektrons.	41
Abb. 2.6 Aufbau eines inversen Fluoreszenzmikroskops.	42
Abb. 2.7 In situ <i>Proximity Ligation Assay</i>	44
Abb. 2.8 Schematischer Aufbau eines Konfokalen-Laser- <i>Scanning</i> -Mikroskops.....	46
Abb. 2.9 Spektrales Detektionsmodul (SP) mit drei PMTs.	47
Abb. 2.10 Detektionsmechanismus der GSDIM.	48
Abb. 2.11 Jablonski-Diagramm der relevanten Energiezustände und deren Lebensdauer.....	49
Abb. 2.12 Prinzip des GSDIM-Algorithmus.	50
Abb. 2.13 Jablonski-Diagramm der relevanten Energiezustände in der GSDIM.....	51
Abb. 2.14 Berechnung der <i>Average Intensity Plots</i>	52
Abb. 2.15 Vergleich der beiden GSDIM-Techniken.	53
Abb. 2.16 Illustration der 3D-GSDIM-Methode.	54
Abb. 2.17 Schema der Exosomen-Präparation.	57
Abb. 2.18 Aufbau Western Blot im <i>Semidry</i> -Verfahren.....	61

Abb. 2.19 Schema des GFP-Pull-downs.....	67
Abb. 2.20 Schema zur GFP-Nanobody-Trap.....	67
Abb. 2.21 Die Mikrothermophorese (MST).....	69
Abb. 2.22 Schema zur Darstellung der Temperaturzyklen in der Polymerase-Ketten-Reaktion.....	70
Abb. 3.1 Gal3 befindet sich im Lumen apikaler Exosomen.....	79
Abb. 3.2 Gal3 kolokalisiert mit Proteinen des ESCRT-Superkomplexes.....	81
Abb. 3.3 Überprüfung der Antikörper-Spezifität.....	83
Abb. 3.4 Gal3-Rekrutierung in ILVs (I).....	84
Abb. 3.5 Gal3-Rekrutierung in ILVs (II).....	85
Abb. 3.6 Computer-basierte Simulationen zur Verifizierung der experimentellen GSDIM-Daten.....	86
Abb. 3.7 Picasso Simulation intraluminale Gal3-Rekrutierung.....	87
Abb. 3.8 Gal3-Rekrutierung in ILVs (Elektronenmikroskopie).....	88
Abb. 3.9 Statistische Analyse der elektronenmikroskopischen Daten.....	89
Abb. 3.10 Gal3 kommt im Lumen von ILVs und Exosomen vor.....	91
Abb. 3.11 Gal3 interagiert mit der ESCRT-I-Untereinheit Tsg101.....	93
Abb. 3.12 Proximity Ligation Assay von Gal3 und Tsg101.....	94
Abb. 3.13 Der <i>Knockdown</i> von Tsg101 reduziert die exosomale Gal3-Sekretion.....	96
Abb. 3.14 Der <i>Knockdown</i> von Tsg101 führt zu einer intrazellulären Akkumulation von Gal3.....	97
Abb. 3.15 Die dominant-negative Mutation von Vps4a führt zu einer Akkumulation von Gal3 (I).....	99
Abb. 3.16 Die dominant-negative Mutation von Vps4a führt zu einer Akkumulation von Gal3 (II).....	100
Abb. 3.17 Das P(S/T)AP-Tetrapeptid im N-Terminus von Gal3 ist hochkonserviert.....	102
Abb. 3.18 Funktionalitätstest der rekombinant hergestellten Gal3-Varianten und Tsg101.....	104
Abb. 3.19 Das PSAP-Tetrapeptidmotiv ist verantwortlich für die direkte Interaktion mit Tsg101.....	105
Abb. 3.20 MST-Bindungskurven und die abgeleiteten Dissoziationskonstanten.....	107
Abb. 3.21 Das PSAP-Tetrapeptidmotiv ist verantwortlich für die exosomale Sekretion von Gal3.....	108
Abb. 3.22 Modell zur Übertragung des PSAP-Motivs auf eGFP.....	108
Abb. 3.23 Das PSAP-Motiv ist auf GFP übertragbar und löst dessen exosomale Sekretion aus.....	109

Abb. 3.24 Gal3 spielt womöglich eine funktionelle Rolle in der Exosomen-Biogenese.	110
Abb. 4.1 Modell der unkonventionellen Sekretion von Gal3 durch Inkorporation in ILVs.	112
Abb. 4.2 Analogie zwischen der viralen Freisetzung und der exosomalen Gal3- Sekretion.	118
Abb. 4.3 Mögliche Mechanismen zur Freisetzung von exosomalem Gal3.....	127
Abb. 4.4 Die diskutierten Mechanismen der Exosomen-Internalisierung.....	128
Abb. 10.1 Ergänzende GSDIM-Daten zu Abb. 3.4.	167
Abb. 10.2 Ergänzende GSDIM-Daten zu Abb. 3.5.	168
Abb. 10.3 3D-GSDIM Daten zu Abb. 3.4.....	169
Abb. 10.4 3D-GSDIM Daten zu Abb. 3.5.....	170
Abb. 10.5 Ergänzende GSDIM-Daten zu Abb. 3.14.	171

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1 Chemikalien und Reagenzien.....	27
Tabelle 2-2 Verbrauchsmaterialien.	28
Tabelle 2-3 Geräte und Software.	29
Tabelle 2-4 Verwendete Primärantikörper.....	30
Tabelle 2-5 Verwendete Sekundärantikörper.....	31
Tabelle 2-6 Lösungen, Medien und Puffer.	31
Tabelle 2-7 Auflistung stabiler Zelllinien.....	39
Tabelle 2-8 Verwendete siRNA-Duplexe.....	41
Tabelle 2-9 Mengenangaben zur Erstellung der denaturierenden SDS-PA-Gele.	61
Tabelle 2-10 PCR-Ansatz.....	71
Tabelle 2-11 Ansatz Restriktionsendonukleasebehandlung.....	72
Tabelle 2-12 Ligationsansatz.....	73
Tabelle 2-13 Verwendete Plasmide.....	74
Tabelle 3-1 Geschätzter Anteil der Sekundär-Struktur [%].	104
Tabelle 3-2 Abgeleitete Dissoziationskonstanten der Gal3-V5-Mutanten und Gal3 der Ratte.....	106
Tabelle 4-1 Beliebige Zusammenstellung von Proteinen mit (P/A)(S/T)AP-Domäne und exosomaler Sekretion.	133

9 Formelverzeichnis

Formel 2.1 Berechnung der Auflösungsgrenze (Abbe Formel).....	47
Formel 2.2 Berechnung der Sättigungsintensität für den Triplettzustand.....	49
Formel 2.3 Approximation des Anteils der Fluorophore im Grundzustand.....	49
Formel 2.4 Berechnung der Auflösung in der GSDIM-Mikroskopie I.....	50
Formel 2.5 Berechnung der Auflösung in der GSDIM-Mikroskopie II.....	50
Formel 2.6 Berechnung von F_{norm} in der MST.....	68

10 APPENDIX

10.1 Ergänzende 2D- und 3D-GSDIM-Daten

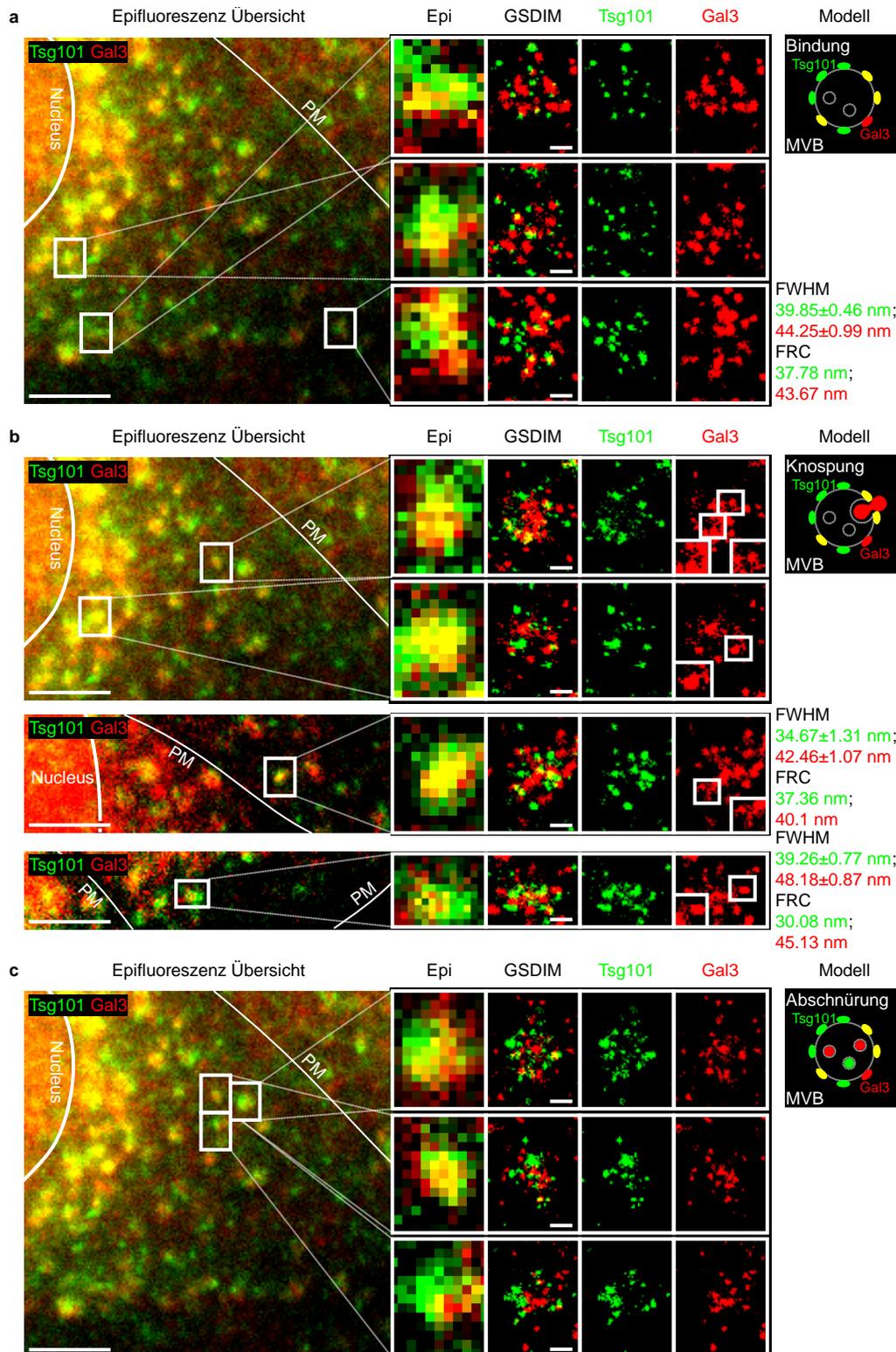


Abb. 10.1 Ergänzende GSDIM-Daten zu Abb. 3.4. MDCK-Zellen wurden für zwei Tage kultiviert und anschließend eine Immunfluoreszenzfärbung gegen Gal3 und Tsg101 durchgeführt. Zur Übersicht ist der komplette Epifluoreszenz-Ausschnitt hinzugefügt. Zu sehen sind die drei Gal3-Rekrutierungsstadien in ILVs, bestehend aus Bindung (a), Knospung (b), und finaler Abschnürung ins MVB-Lumen (c). Maßstäbe: Epifluoreszenz-Übersicht, 2,5 µm; GSDIM, 250 nm. PM: Plasmamembran; FRC: Fourier Ring Korrelation; FWHM: Full Width at Half Maximum.

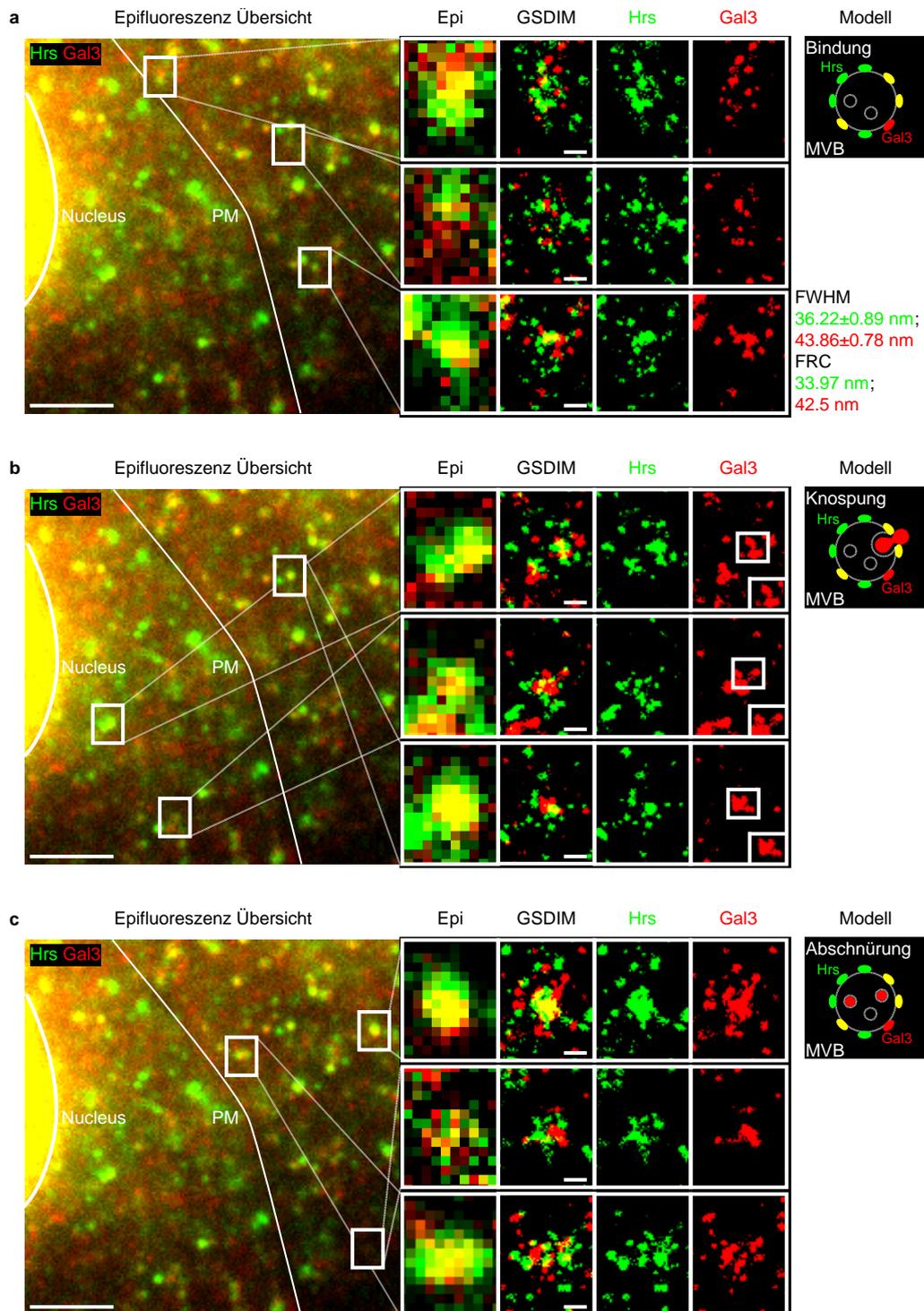


Abb. 10.2 Ergänzende GSDIM-Daten zu Abb. 3.5. MDCK-Zellen wurden für zwei Tage kultiviert und anschließend einer Immunfluoreszenzfärbung gegen Gal3 und Hrs unterzogen. Zur Übersicht ist der komplette Epifluoreszenz-Ausschnitt hinzugefügt. Zu sehen sind die drei Gal3-Rekrutierungsstadien in ILVs, bestehend aus Bindung (a), Knospung (b), und finaler Abschnürung ins MVB-Lumen (c). Maßstäbe: Epifluoreszenz-Übersicht, 2,5 μ m; GSDIM, 250 nm. PM: Plasmamembran; FRC: Fourier Ring Korrelation; FWHM: Full Width at Half Maximum.

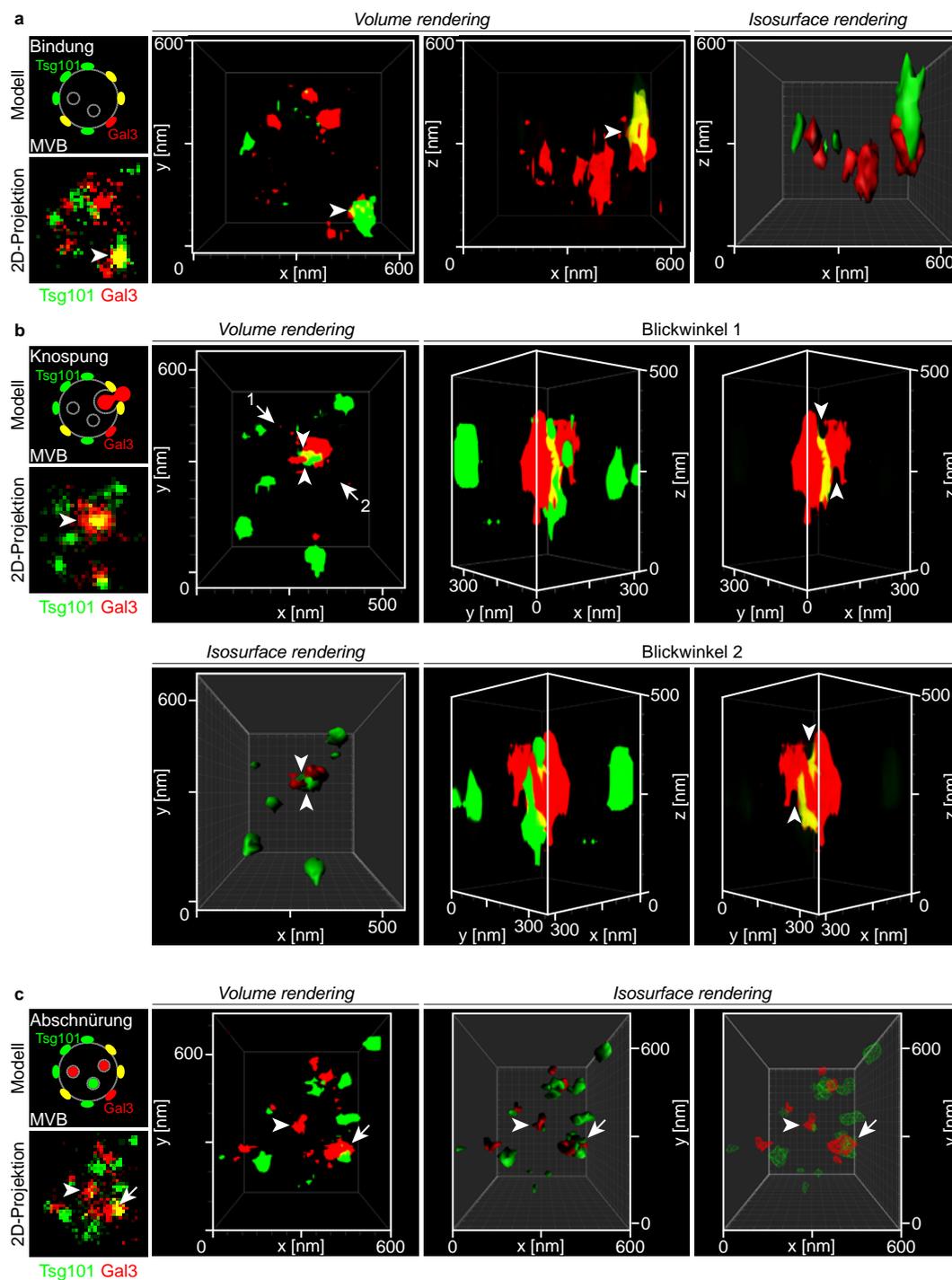


Abb. 10.3 3D-GSDIM Daten zu Abb. 3.4. MDCK-Zellen wurden für zwei Tage kultiviert und anschließend einer Immunfluoreszenzfärbung gegen Gal3 und Tsg101 unterzogen. Zur Übersicht ist zusätzlich die 2D-Projektion des MVBs angegeben. Zu sehen sind die drei Gal3-Rekrutierungsstadien in ILVs, bestehend aus Bindung (a), Knospung (b), und finaler Abschnürung ins MVB-Lumen (c). Die Pfeilköpfe verweisen auf die jeweiligen charakteristischen Gal3-Strukturen. Die Pfeile in b verweisen auf die beiden unterschiedlichen Blickwinkel. Der Pfeil in c verweist auf eine Gal3-Rekrutierung an der MVB-Membran und gehört damit zur Stufe-I.

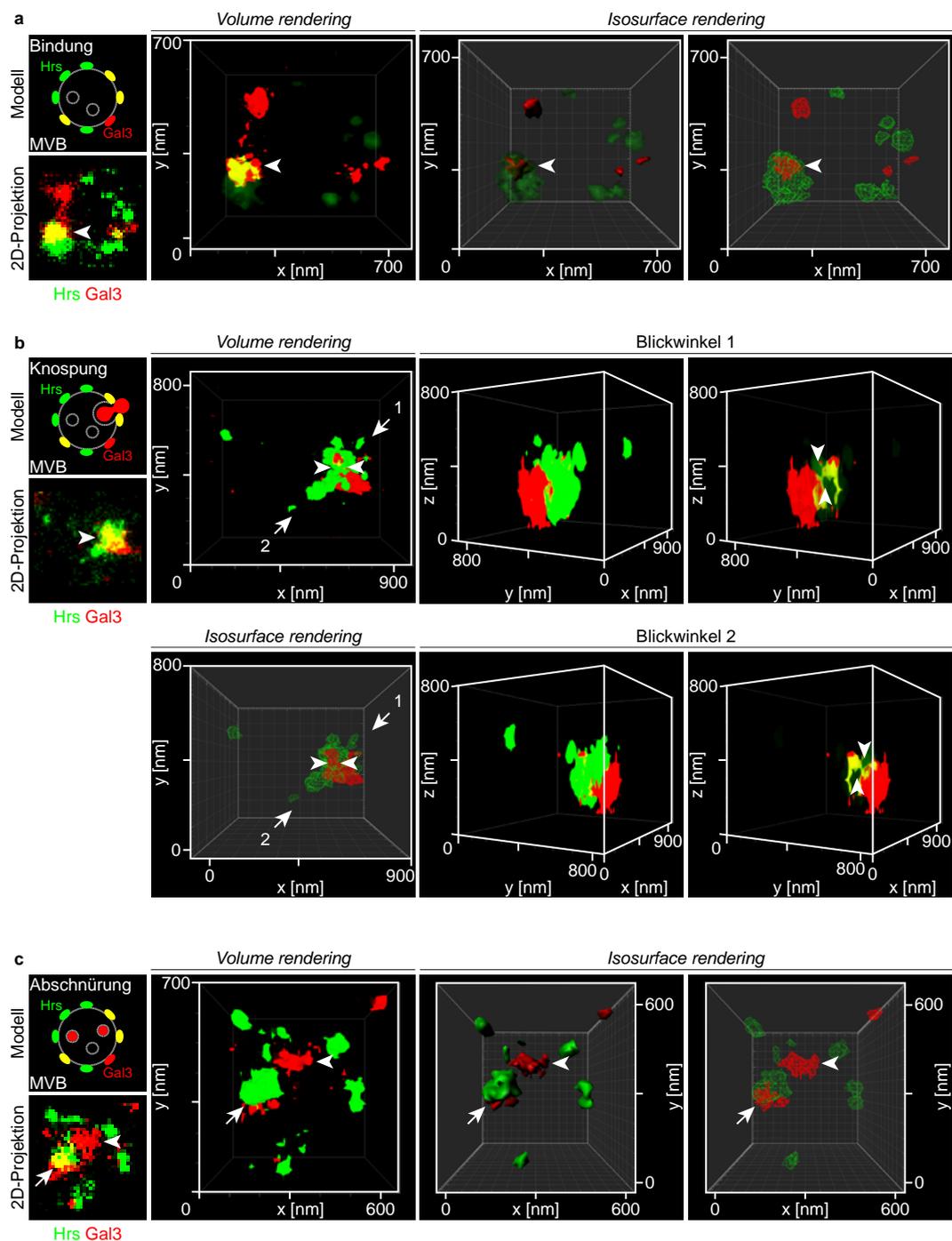


Abb. 10.4 3D-GSDIM Daten zu Abb. 3.5. MDCK-Zellen wurden für zwei Tage kultiviert und anschließend einer Immunfluoreszenzfärbung gegen Gal3 und Hrs unterzogen. Zur Übersicht ist zusätzlich die 2D-Projektion des MVBs angegeben. Zu sehen sind die drei Gal3-Rekrutierungsstadien in ILVs, bestehend aus Bindung (a), Knospung (b), und finaler Abschnürung ins MVB-Lumen (c). Die Pfeilköpfe verweisen auf die jeweiligen charakteristischen Gal3-Strukturen. Die Pfeile in b verweisen auf die beiden unterschiedlichen Blickwinkel. Der Pfeil in c verweist auf eine Gal3-Rekrutierung an der MVB-Membran und gehört damit zur Stufe-I.

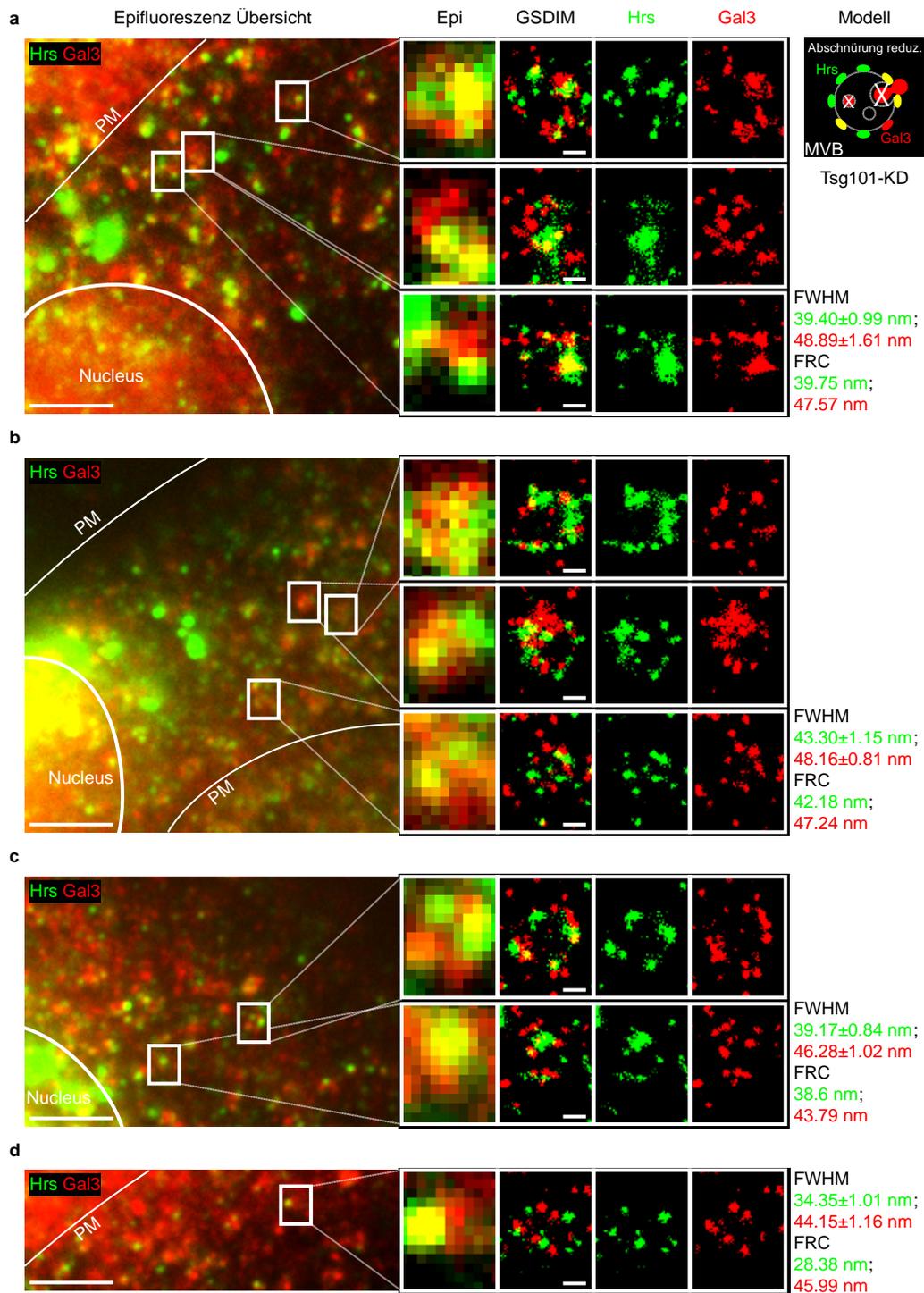


Abb. 10.5 Ergänzende GSDIM-Daten zu Abb. 3.14. Tsg101-depletierte MDCK-Zellen wurden einer Immunfluoreszenzfärbung gegen Gal3 und Hrs unterzogen. Zur Übersicht ist der komplette Epifluoreszenz-Ausschnitt hinzugefügt. In allen vier Zellen (**a-d**) konnten fast ausschließlich nur noch Stufe-I-MVBs gefunden werden. Gal3 akkumulierte auf der begrenzenden MVB-Membran. Maßstäbe: Epifluoreszenz-Übersicht, 2,5 µm; GSDIM, 250 nm. PM: Plasmamembran; FRC: Fourier Ring Korrelation; FWHM: *Full Width at Half Maximum*.

10.2 Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden in dem folgenden Fachartikel publiziert:

BÄNFER, S., SCHNEIDER, D., DEWES, J., STRAUSS, M. T., FREIBERT, S.-A., HEIMERL, T., MAIER, U. G., ELSÄSSER, H.-P., JUNGSMANN, R. & JACOB, R. 2018. A Molecular mechanism to recruit galectin-3 into multivesicular bodies for polarized exosomal secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.

Teile dieser Arbeit wurden auf den folgenden Konferenzen vorgestellt:

BÄNFER, S., SCHNEIDER, D., DEWES, J., ELSÄSSER, H.-P. & JACOB, R. A Molecular mechanism to recruit galectin-3 into multivesicular bodies for polarized exosomal secretion. *ASCB Meeting*, Philadelphia, USA (2017).

BÄNFER, S., SCHNEIDER, D., DEWES, J., ELSÄSSER, H.-P. & JACOB, R. A Molecular mechanism to recruit galectin-3 into multivesicular bodies for polarized exosomal secretion. *EMBO Workshop Transducing glycan information into function: Lessons from and for galectins*, Mandelieu-la-Napoule, Frankreich (2016). *Ausgezeichnet mit EMBO-Poster-Preis 2016*.

Weitere Publikationen:

STEHLING, O., JEOUNG, J. H., FREIBERT, S. -A., PAUL, V. D., BÄNFER, S., NIGGEMEYER, B., RÖSSER, R., DOBBEK, H., LILL, R. 2018. Function and crystal structure of the dimeric P-loop ATPase CFD1 coordinating an exposed [4Fe-4S] cluster for transfer to apoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Angenommen.

WEBER, M., SEDIRI, H., FELGENHAUER, U., BINZEN, I., BÄNFER, S., JACOB, R., BRUNOTTE, L., GARCIA-SASTRE, A., SCHMID-BURGK, J. L., SCHMIDT, T., HORNING, V., KOCHS, G., SCHWEMMLE, M., KLENK, H. D. & WEBER, F. 2015. Influenza virus adaptation PB2-627K modulates nucleocapsid inhibition by the pathogen sensor RIG-I. *Cell Host Microbe*, 17, 309-19.

GOEDICKE-FRITZ, S., KAISTHA, A., KACIK, M., MARKERT, S., HOFMEISTER, A., BUSCH, C., BÄNFER, S., JACOB, R., GRGIC, I. & HOYER, J. 2015. Evidence for functional and dynamic microcompartmentation of Cav-1/TRPV4/K(Ca) in caveolae of endothelial cells. *Eur J Cell Biol*, 94, 391-400.

BÄNFER, S., 2014. The Force of the Dark Side – Embedding Media for GSDIM Super-Resolution Localization Microscopy. Leica Science Lab [Online] Available at: <http://www.leica-microsystems.com/science-lab/the-force-of-the-dark-side-embedding-media-for-gsdim-super-resolution-localization-microscopy/>

TARIKI, M., WIECZOREK, S. A., SCHNEIDER, P., BÄNFER, S., VEITINGER, S., JACOB, R., FENDRICH, V. & LAUTH, M. 2013. RIO kinase 3 acts as a SUFU-dependent positive regulator of Hedgehog signaling. *Cell Signal*, 25, 2668-75.

STRAUBE, T., BÄNFER, S., JACOB, R., 2013. Three-Dimensional Super-Resolution GSDIM Microscopy. Leica Science Lab, [Online] Available at: <http://www.leica-microsystems.com/science-lab/three-dimensional-super-resolution-gsdim-microscopy/>

ZINK, S., GROSS, L., BÄNFER, S., JACOB, R., 2013. Ground State Depletion Microscopy Applied to Tubulin Modifications in Epithelial Cells. *Microscopy Today* 21 (04), 14-18.

ZINK, S., GROSSE, L., FREIKAMP, A., BÄNFER, S., MUKSCH, F. & JACOB, R. 2012. Tubulin detyrosination promotes monolayer formation and apical trafficking in epithelial cells. *J.Cell Sci.*, 125, 5998-6008.

10.3 Lebenslauf

Die Seite 173 (Lebenslauf) enthält persönliche Daten. Aus diesem Grund ist diese nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

10.4 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer des Fachbereichs Humanmedizin und im Studiengang Humanbiologie waren die Damen und Herren in Marburg:

Adamkiewicz, Aigner, Bauer S, Bauer UM, Bette, Brandt, Brehm, Daut, Decher, Elsässer, Fritz, Feuser, Garten, Greene, Greiner, Großmann, Grzeschick, Hofmann, Jacob, Käuser, Kösters, Lill, Lillig, Lohöfer, Lohoff, Maisner, Milani, Moll, Mühlenhoff, Müller, Müller-Brüsselbach, Oliver, Pagenstecher, Parak, Pierik, Plant, Preisig-Müller, del Rey, Stehling, Steinhoff, Suske, Weihe, Westermann, Wöhr und Wrocklage.

10.5 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

„Der molekulare Mechanismus der Galektin-3-Rekrutierung in Multivesikuläre Körperchen zur polarisierten exosomalen Sekretion“

im Institut für Zytobiologie und Zytopathologie unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Roland Lill mit Unterstützung durch Prof. Dr. Ralf Jacob ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Ich versichere, dass ich sämtliche wörtlichen oder sinngemäßen Übernahmen und Zitate kenntlich gemacht habe.

Mit dem Einsatz von Software zur Erkennung von Plagiaten bin ich einverstanden.

Vorliegende Arbeit wurde in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

BÄNFER, S., SCHNEIDER, D., DEWES, J., STRAUSS, M. T., FREIBERT, S.-A., HEIMERL, T., MAIER, U. G., ELSÄSSER, H.-P., JUNGSMANN, R. & JACOB, R. 2018. A Molecular mechanism to recruit galectin-3 into multivesicular bodies for polarized exosomal secretion. Proceedings of the National Academy of Sciences.

(Ort, Datum) Prof. Dr. Ralf Jacob

Die Hinweise zur Erkennung von Plagiaten habe ich zur Kenntnis genommen.

(Ort, Datum) Sebastian Bänfer

10.6 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle von ganzem Herzen bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Ralf Jacob bedanken. Dafür, dass er mir sofort Vertrauen geschenkt hat und die Möglichkeit der *Fast-Track*-Promotion gegeben hat. Dafür, dass ich mich an meinem Lieblingsspielzeug, dem GSDIM-Mikroskop, völlig frei entwickeln durfte. Für das Promotionsthema, dessen Stellenwert an der Publikation abgelesen werden kann. Für die Unterstützung in jeglicher Hinsicht und vor allem für die hervorragende Zusammenarbeit, auch wenn das mit mir als manischen Perfektionisten sicherlich nicht immer einfach war. Für die unglaublich interessante Zeit beim ASCB-Meeting und das unvergessliche Essen im Sampan Restaurant in Philadelphia. Kurzum, dass er mir ein wahrer Doktorvater war.

Mein besonderer Dank gilt auch Dr. Thomas Strecker für das Erstellen des Zweitgutachtens und dafür, dass er mir gezeigt hat, was einen erfolgreichen (Nachwuchs-) Wissenschaftler ausmacht.

Nur wenige Doktoranden können von sich behaupten, noch einen zusätzlichen (Adoptiv) Doktorvater zu besitzen. Ich gehöre jedoch dazu, sodass ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Hans-Peter Elsässer bedanken möchte. Für die vorübergehende, freundschaftliche Aufnahme in die AG Elsässer, für die Kino-Abende und wunderbaren Mittagspausen. Aber auch für die unglaubliche Unterstützung am EM und bei der Mutagenese-PCR. Einen solchen Beistand und einzigartige Verbundenheit erfährt ein Doktorand, der nicht zur Arbeitsgruppe gehört, sicherlich nicht oft.

Ich möchte mich zudem bei unserem Direktor Prof. Dr. Roland Lill bedanken. Dafür, dass er mir in der schwersten Stunde beigestanden hat und für die absolut vorbildhafte Leitung seiner Zellbio-Familie.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der AG Jacob bedanken. Nicht oft genug kann ich mich bei Waltraud Ackermann und Martina Dienst bedanken. Waltraud Ackermann insbesondere für ihre fantastischen Fertigkeiten in der Immunfluoreszenz- und der EM-Färbung. Martina Dienst für ihre hingebungsvolle Unterstützung bei der Mutagenese-PCR, Aufreinigung von rekombinanten Proteinen, Plasmid-Präparationen und vieles mehr. Daneben gilt mein besonderer Dank meinem Vorgänger Dominik Schneider, der mit seiner Arbeit die Grundlage gelegt hat, ohne die diese Dissertation überhaupt nicht möglich gewesen wäre. Dies gilt nicht nur für die vielen Konstrukte und Zelllinien, sondern auch thematisch und in Hinblick auf das Paper. Ein besonderes Dankeschön möchte ich auch an Jenny Dewes richten, die als Bachelor- und Master-Studentin maßgeblich zu dem Erfolg dieser Arbeit beigetragen hat, besonders was die Exosomen-Präparation angeht. Darüber hinaus möchte ich mich bei Ellena Hönig, Karina Ringer, Florian Hoff, Manuel Müller, Christian Schink, Tobias von

Mach, Tamara Straube und Katharina Fritsch bedanken für die wunderbare Arbeitsatmosphäre und so manche schöne Feierabende.

Insbesondere möchte ich ein Wort des Dankes an Ursula Lehr richten, für ihre genialen Fertigkeiten in der Präparation der EM-Proben, ohne die die Visualisierung des Sortierprozesses nicht möglich gewesen wäre und damit der Schwerpunkt dieser Arbeit fehlen würde.

Des Weiteren gilt ein besonderer Dank unseren Kooperationspartnern, die dazu beigetragen haben das Paper bei PNAS zu ermöglichen. Ich bin sehr stolz, dass Prof. Dr. Ralf Jungmann, ein großes Vorbild auf dem Feld der ultrahochauflösenden Lichtmikroskopie, mit seinen GSDIM-Simulationen zum Erfolg des Papers beigetragen hat. In diesem Zusammenhang möchte ich auch Maximilian Strauß für seine hervorragende Arbeit noch einmal ausdrücklich danken. Daneben möchte ich mich bei Prof. Dr. Uwe Maier und Dr. Thomas Heimerl bedanken, die es durch viel Einsatz geschafft haben, die EM-Daten durch wunderschöne 3D-Tomographien abknospender ILVs zu komplettieren. Auch Dr. Sven Freibert gilt mein ausdrücklicher Dank, mit dessen Hilfe die Bestimmung der Dissoziationskonstanten gelang. Auch Joey Braymer hatte einen großen Anteil am Erfolg des Papers, da er in Hinblick auf die englische Sprache durchgehend beratend zur Seite stand, sodass ich ihm hiermit noch einmal meinen Dank aussprechen möchte.

Ich möchte mich an dieser Stelle auch noch einmal ganz herzlich bei der Von-Behring-Röntgen-Stiftung bedanken, die mir als Studenten ein grandioses Stipendium ermöglicht hat. Neben dem unglaublichen Gefühl, für seine harte Arbeit belohnt zu werden, sind im Rahmen der vielen Veranstaltungen und jährlichen Stipendiaten-Treffen wunderbare Freundschaften entstanden. Im Besonderen möchte ich mich deshalb bei Heidi Natelberg bedanken, die das alles durch ihre großartige Arbeit bewirkt hat. Daneben gilt mein Dank auch dem Vorsitzenden Friedrich Bohl, der durch seine zahlreichen Einblicke, Erfahrungen und Anekdoten die Treffen bereichert hat. Auch Prof. Dr. Hans-Dieter Klenk möchte ich für die aufschlussreichen und faszinierenden Einblicke z. B. in die Geschichte der sog. „Marburger Affenseuche“ danken.

Ich möchte außerdem dem gesamten Institut für Zellbiologie für die außergewöhnliche Unterstützung, Atmosphäre und Hilfsbereitschaft danken, sowie für die wunderschönen Feiern und Ausflüge. Ich bin sehr froh ein Teil der Marburger Zytobiologie-Familie gewesen sein zu dürfen. Insbesondere möchte ich mich auch noch bei Gisela Lesch und Ralf Rößer bedanken, ohne die das Institut organisatorisch bzw. Computer-technisch wohl nicht funktionieren würde.

Ein ganz großer Dank gebührt Dr. David Fuhrmann, ohne den ich wohl nie Humanbiologe (sondern Radiologe), geschweige denn Doktor *in spe* geworden wäre.

Für die vielen, vielen Abende mit sagenhaften Fußballduellen (am Bildschirm und in der Realität!), gutem Essen und unvergesslichen Erlebnissen. *Verus amicus est tamquam alter idem!* Eine solche Freundschaft gibt es nur einmal im Leben. Vielen Dank dafür!

Schließlich möchte ich meiner Familie für die vorbehaltlose Unterstützung und Begleitung während meiner Zeit in Marburg danken. Danke, dass ich mich immer auf Euren Beistand verlassen konnte. Leider kann mein Großvater, der sich immer ganz besonders für meine Arbeit interessierte, den Tag meiner Promotion nicht mehr miterleben, aber vielleicht kannst Du ja von oben die Daumen drücken.

Zu guter Letzt möchte ich meiner lieben Freundin Clarissa und meinem kleinen Beagle Emil danken, die mich auch in der (mehrere Jahre andauernden) Zeit unterstützt haben, in der ich erst nach Mitternacht nachhause gekommen bin und auch am Wochenende im Labor war. So viel Glück und Verständnis ist sicherlich nicht selbstverständlich und verdeutlicht nur, was für eine wunderschöne, symbiotische Verbindung zwischen uns besteht.

Abschließen möchte ich meine Dissertation mit einem Zitat aus meinem Lieblingsbuch von Antoine de Saint-Exupéry, das meiner Meinung nach all das zusammenfasst, was meine Zeit als Doktorand ausgemacht hat (auch wenn die deutsche Übersetzung nicht ganz an die Bedeutung heran kommt, sei sie hier dennoch angefügt):

«Ce qui embellit le desert, c'est qu'il cache un puits quelque part.»

„Es macht die Wüste schön, dass sie irgendwo einen Brunnen birgt.“