



Universitätsklinikum
Hamburg-Eppendorf

**Sorting Nexin-3 beeinflusst die Reifung
von Borrelien-haltigen Phagosomen durch Bildung einer
Plattform für PI(3)P, Rab5a und Galectin-9**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
Fachbereich Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Matthias Klose
aus Halle (Saale)

Hamburg, 2019

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2015 bis Juni 2019 unter der Leitung von Prof. Dr. Stefan Linder am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf angefertigt.

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
im Fachbereich Biologie
der Universität Hamburg
vorgelegt von
M. Sc. Matthias Klose
aus Halle (Saale)

Tag der Disputation: 08.11.2019
Erstgutachter: Prof. Dr. Stefan Linder
Zweitgutachter: Prof. Dr. Julia Kehr

Weitere Mitglieder der Prüfungskommission:
PD Dr. Andreas Pommerening-Röser (Vorsitz)
Prof. Dr. Wolfgang Streit

„Das haben wir noch nie probiert, also geht es sicher gut!“

- Pippi Langstrumpf -

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	3
2. Summary	4
3. Einleitung	5
3.1 <i>Borrelia burgdorferi</i>	5
3.2 Die Rolle der RabGTPasen bei der intrazellulären Prozessierung von Borrelien	11
3.3 Sorting Nexine (SNXe)	14
3.4 Galectine	19
4. Ziel der Arbeit	22
5. Material	23
5.1 Geräte	23
5.2 Software	24
5.3 Chemikalien und Reagenzien	24
5.4 Verbrauchsmaterialien	25
5.5 Größenstandards	26
5.6 Kits	26
5.7 Medien und Zusätze für die Zellkultur	26
5.8 Enzyme	27
5.9 Bakterienstämme und Zelllinien	27
5.10 Antikörper	28
5.11 Oligonukleotide	29
5.12 Plasmide	30
6. Methoden	32
6.1 Mikrobiologische Methoden	32
6.2 Molekularbiologische Methoden	33
6.3 Zellkulturtechnische Methoden	38
6.4 Proteinbiochemische Methoden	44
6.5 Mikroskopie	48
7. Ergebnisse	50
7.1 Sorting nexin-3 lokalisiert an Borrelien-haltigen Phagosomen	50
7.2 SNX3 reguliert die phagosomale Kompaktierung von Borrelien	53
7.3 SNX3-Vesikel akkumulieren bis zur vollständigen Kompaktierung an Borrelienphagosomen und sind positiv für Rab5a	56

7.4	Sorting Nexin-3 wird für proteolytische Prozessierung von <i>Borrelia burgdorferi</i> benötigt.....	59
7.5	Die SNX3-Bindung am Phagosom wird über die PX-Domäne vermittelt.....	62
7.6	PI3K-Aktivität und Bindung von PI(3)P durch SNX3 ist wichtig für Kompaktierung von Borrelien.....	68
7.7	Der C-terminale Teil von SNX3 ist für die Kompaktierung von Borrelien essenziell.....	70
7.8	Galectin-9 ist ein Bindungspartner von SNX3 und beeinflusst die Kompaktierung von Borrelien.....	75
7.9	SNX3 ermöglicht die Rekrutierung von Rab5a und Gal9 an Borrelien-haltige Phagosomen.....	87
8.	Diskussion.....	89
8.1	Sorting Nexine – neue Regulatoren der Borrelien-Phagozytose?.....	89
8.2	Die PX-Domäne ist essenziell für die Kompaktierung von Borrelien.....	91
8.3	Der C-Terminus von SNX3 rekrutiert eine zweite Vesikelpopulation	94
9.	Literaturverzeichnis.....	101
10.	Abkürzungsverzeichnis.....	111
11.	Abbildungsverzeichnis	113
12.	Tabellenverzeichnis	115
13.	Danksagung.....	116
14.	Anhang	117
14.1	Publikationen.....	117
14.2	Inhalt der Video-CD.....	118
15.	Eidesstattliche Erklärung.....	119

1. Zusammenfassung

Die Gram-negative Spirochäte *Borrelia burgdorferi* ist der Erreger der Lyme-Borreliose. Sie wird durch Zecken auf den Menschen übertragen und ist die derzeit am häufigsten durch Vektoren verursachte Infektionskrankheit in den USA, Europa und Asien. Die Internalisierung erfolgt durch professionelle Phagozyten, insbesondere Makrophagen. Eine Aufnahme von Borrelien geschieht durch die Bildung von Filopodien und *coiling*-Pseudopoden, die intrazelluläre Prozessierung erfolgt anschließend in Phagolysosomen. Die erfolgreiche Erkennung, Aufnahme und Eliminierung der Spirochäten durch Immunzellen sind somit entscheidend für den Ausgang einer Infektion. Die phagosomale Kompaktierung, ein entscheidender Schritt bei der Reifung der Phagolysosomen, wird durch den Kontakt von Rab5a-positiven Vesikeln mit der Phagosomenhülle hervorgerufen. Die vorher gestreckten Borrelien werden in Phagosomen zu einer verdichteten, kugelförmigen Struktur kompaktiert.

Diese Arbeit liefert neue Einblicke in die molekularen Mechanismen primärer humaner Makrophagen bei einer Infektion mit *Borrelia burgdorferi*. Ein detailliertes Screening von neun verschiedenen Proteinen der Sorting Nexin (SNX)-Familie zeigte, dass von allen getesteten Sorting Nexinen nur SNX3 bis zur vollständigen Kompaktierung an Borrelien-haltigen Phagosomen akkumuliert. SNX3 wird zusammen mit Rab5a-Vesikeln in humanen Makrophagen transportiert und seine PX-Domäne ermöglicht den Kontakt zwischen Vesikeln und Phagosomen, indem sie ausschließlich an PI(3)P bindet. Darüber hinaus bildet SNX3 nicht nur ein Andocksystem für Rab5a-positive Vesikel, sondern seine C-terminale Region rekrutiert auch Galectin-9-positive Vesikel an Phagosomen. Galectin-9 ist ein am Protein- und Membranrecycling beteiligtes Lektin, das hier als weiterer Regulator der Phagosomenkompaktierung identifiziert wurde und zusammen mit SNX3 wirkt. Sorting Nexin 3 bildet somit eine Plattform für zwei verschiedene Vesikelpopulationen sowie einen Konvergenzpunkt für die endosomale Recyclingmaschinerie, um zur Reifung der Phagosomen und zur intrazellulären Prozessierung von Borrelien beizutragen.

Darüber hinaus zeigt die vorliegende Arbeit, dass die helikale Morphologie von *Borrelia burgdorferi* selbst, aufgrund der an den Spitzen der Membrankurvatur hohen lokalen PI(3)P-Anreicherung, eine der treibenden Elemente für die effiziente Eliminierung von Spirochäten durch Immunzellen sein könnte.

2. Summary

The Gram-negative spirochete *Borrelia burgdorferi* is the causative agent of Lyme disease. It is transmitted to humans by ticks which causes this currently most prevalent vector-borne disease in the USA, Europe and Asia. Borreliae are internalized by macrophages, which are professional phagocytes and one of the first immune cells that are recruited to the site of a tick bite. The uptake of borreliae is mediated by the formation of filopodia and coiling pseudopods. Subsequently, internalized borreliae are processed in phagolysosomes. Successful recognition, uptake and elimination of the spirochetes by these cells is thus decisive for the outcome of a respective infection. Phagosomal compaction, a crucial step in phagolysosome maturation, is driven by contact of Rab5a-positive vesicles with the phagosomal coat. Elongated borreliae are reorganized in phagosomes to a compacted, dense and globular structure.

This work provides new insights into the molecular mechanisms of primary human macrophages processing *Borrelia burgdorferi*. A detailed screen of nine different proteins of the sorting nexin (SNX) family showed that SNX3 is the only one of the tested sorting nexins that is present at *Borrelia*-containing phagosomes until their full compaction. SNX3 is transported together with Rab5a vesicles in human macrophages and its PX domain enables vesicle-phagosome contact by binding exclusively to PI(3)P, a phospholipid in the phagosomal coat that is recognized as a central modulator in endosomal trafficking and membrane transport. Moreover, besides providing a docking system for Rab5a-positive vesicles, the C-terminal region of SNX3 recruits galectin-9-positive vesicles to phagosomes. Galectin-9 is a lectin implicated in protein and membrane recycling, which was here identified as a further regulator of phagosome compaction and was found to work in the same pathway as SNX3 in borreliae compaction. SNX3 thus forms a hub for two distinct vesicle populations, forming a convergence point for the endosomal recycling machinery, to contribute to phagosome maturation and intracellular processing of borreliae.

Furthermore, this study also suggests that the helical morphology of *Borrelia burgdorferi* itself, providing sites of high curvature and thus of local PI(3)P enrichment at phagosomes, may be one of the driving elements underlying efficient elimination of spirochetes by immune cells.

3. Einleitung

3.1 *Borrelia burgdorferi*

Das Bakterium *Borrelia burgdorferi* ist der Verursacher der Lyme-Borreliose, einer multisystemische Erkrankung, die in erster Linie Haut, Nervensystem und Gelenke betrifft (Burgdorfer et al., 1982; Zajkowska et al., 2012). Die Übertragung erfolgt durch Schildzecken der Gattung *Ixodes*. Seit der Entdeckung von *Borrelia burgdorferi* in den 1970er Jahren in Lyme, Connecticut, hat sich das Feld der Forschung um die Borreliose von einer mikrobiologischen Kuriosität zu einem Hauptzweig der Forschung um bakterielle Erreger entwickelt. Das persistierende Auftreten der Lyme-Borreliose in verschiedenen Teilen der Welt, hervorgerufen durch verschiedene Genotypen der Borrelien, hat es längst zu einem globalen Problem gemacht. Klimawandel und damit verbundene milde Winter begünstigen steigende Zeckenpopulationen und damit die Verbreitung der Spirochäten. In Deutschland besteht mittlerweile in neun von 16 Bundesländern eine Meldepflicht für Patienten mit Lyme-Borreliose (Enkelmann et al., 2018).

3.1.1 Aufbau und Struktur

Borrelia burgdorferi ist ein Gram-negatives Bakterium, welches zusammen mit *Leptospira* und *Treponema* zu der Familie der Spirochaetaceae gehört. Charakteristisch für diese Spirochäten ist eine Länge von 10-40 μm und ein Durchmesser von 0,2-0,5 μm (Aberer and Duray, 1991). Die helikale Morphologie der Borrelien basiert auf dem Vorhandensein der Endoflagellen, die sich innerhalb der inneren und äußeren Membran, im sogenannten periplasmatischen Raum, entlang der Bakterien befinden (Abb. 1) (Dombrowski et al., 2009). Diese Endoflagellen, die an den jeweiligen Enden der Bakterien fixiert sind, ermöglichen den Borrelien eine schnelle Fortbewegung, mitunter bis zu 4 $\mu\text{m}/\text{s}$ im Gewebe und 4,25 $\mu\text{m}/\text{s}$ *in vitro* (Goldstein et al., 1994; Li et al., 2000; Moriarty et al., 2008).

Alle Vertreter der Gattung *Borrelia* besitzen ein lineares Chromosom und sowohl lineare als auch zirkuläre Plasmide. Beim *Borrelia burgdorferi*-Stamm B31 sind das beispielsweise ein 910.725 bp großes lineares Chromosom und 12 lineare und 9

zirkuläre Plasmide mit einer Gesamtgröße von rund 612 kbp (Casjens et al., 2000; Fraser et al., 1997). Auf die unterschiedlichen Genotypen der Borrelien wird im folgenden Kapitel näher eingegangen. Das Chromosom, welches die überwiegende Mehrheit der *housekeeping*-Gene beinhaltet, ist in Bezug auf Organisation und Inhalt über die verschiedenen Genera hinaus relativ einheitlich und bezüglich der Größe für Bakterien eher klein (Casjens, 1998). Die Plasmide hingegen variieren stärker und sind hinsichtlich Anlagerung, Infektivität und dem Entgehen der Wirtszellimmunantwort von entscheidender Bedeutung (Fraser et al., 1997). Unter anderem darauf codiert sind Oberflächenlipoproteine wie OspA und OspC (*outer surface protein A* und C) (Schwan et al., 1995). Dafür besitzen Borrelien weder klassische Virulenzfaktoren noch Proteine für einen Sekretionsapparat. Auch weisen sie, untypisch für Gram-negative Bakterien, keine Lipopolysaccharide (LPS) oder Lipoteichonsäuren (LPA) in ihrer äußeren Zellmembran auf (Fraser et al., 1997).

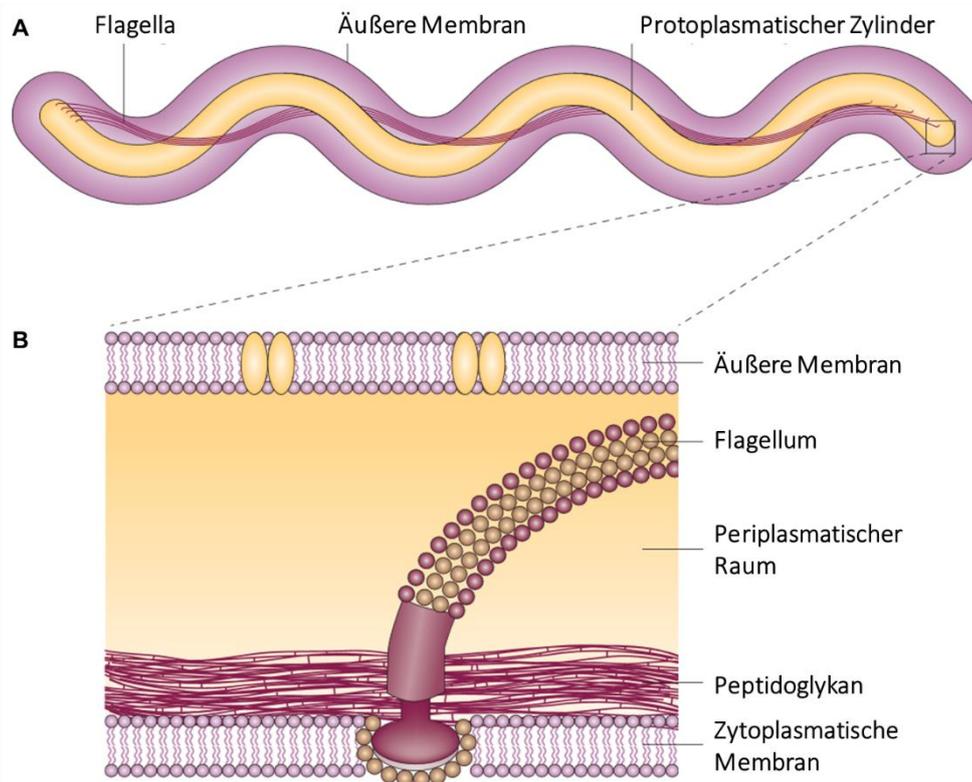


Abb. 1: Schematischer Aufbau eines *Borrelia burgdorferi*-Spirochäten. A: Übersicht, B: Detaildarstellung der Flagellenverankerung innerhalb des periplasmatischen Raums zwischen innerer und äußerer Membran. Geändert nach Charon and Goldstein (2002).

3.1.2 Genotypen von *Borrelia burgdorferi sensu lato*

Zurzeit sind 19 verschiedene Borrelien-Genotypen bekannt, von denen neun humanpathogen sind. Alle davon beziehen sich jeweils auf den *Borrelia burgdorferi sensu lato*-Komplex (Borchers et al., 2015). Der in Nordamerika am weitesten verbreitete Genotyp ist *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, dessen Stamm B31 der zurzeit am besten beschriebene und charakterisierte aller Borrelientypen ist (Fraser et al., 1997). Im Verlauf der Experimente dieser Arbeit ist mit *Borrelia burgdorferi* ausschließlich dieser Wildtyp-Stamm B31 oder, davon abgeleitet, sein GFP-exprimierender Stamm GCB726, gemeint. Die in Europa und Asien am häufigsten vorkommenden humanpathogenen Spezies sind *Borrelia garinii* und *Borrelia afzelii* (Borchers et al., 2015). Der zuletzt entdeckte humanpathogene Genotyp ist *Borrelia mayonii*, der 2016 an der Mayo Clinic in Rochester (USA) in Routineproben von Patienten isoliert und charakterisiert wurde (Pritt et al., 2016a; Pritt et al., 2016b). Zum *Borrelia burgdorferi sensu lato*-Komplex nicht gezählt werden Borrelien, die andere Erkrankungen als die Lyme-Borreliose hervorrufen. Dazu zählt unter anderem *Borrelia recurrentis* als Erreger des Rückfallfiebers (Cutler, 2010).

3.1.3 Übertragung, Infektion und die Lyme-Borreliose

Die Übertragung von Borrelien erfolgt über Schildzecken der Gattung *Ixodes*. In Europa und Asien sind dies größtenteils *Ixodes ricinus* sowie *Ixodes persulcatus* und in Nordamerika *Ixodes pacificus* sowie *Ixodes scapularis* (Dolan et al., 1998; Lane et al., 1991). Diese haben vier Entwicklungsstadien: Ei, Larve, Nymphe und adulte Zecke. Die Larven ernähren sich durch Blutmahlzeit an Kleintieren wie Mäusen, bei denen sie auch infiziert werden können. Mäuse sind ein wichtiges Reservoir von Borrelien, da eine Infektion mit Borrelien bei ihnen meist asymptomatisch bleibt (Tilly et al., 2008). Die Zecken fressen während ihrer beiden weiteren Entwicklungsstadien auch an anderen Wirten, was den Borrelien die Möglichkeit bietet, sich unter anderem auf Wildtiere wie Hirsch und andere Säugetiere zu verteilen. Der Mensch ist hierbei ein Fehlwirt, da er die Lyme-Borreliose nach Infektion mit Borrelien entwickelt.

Eine gute Adaption der Borrelien an die Wechsel zwischen verschiedenen Wirten ist eine wichtige Voraussetzung für die erfolgreiche Verteilung. So herrscht im Darm der Zecke mehr oder weniger Umgebungstemperatur und ein basischer pH von zirka 9,5, während in den meisten Säugetieren eine Körpertemperatur von 36-38 °C sowie ein neutraler pH von 7,4-7,6 vorherrscht (Bowman et al., 1995; Sawyer et al., 1991). Borrelien reagieren auf diese Veränderungen mit unterschiedlichen Genexpressionsmustern und passen sich so an die jeweiligen Bedingungen an. Eine der wesentlichen Anpassungen beinhaltet die differentielle Expression von Lipoproteinen in der äußeren Membran, den so genannten Osps, bei denen man von einem reziproken Expressionsmuster spricht, und die unter anderem auf diese Temperatur- und pH-Änderungen reagieren (Caimano et al., 2007; Carroll et al., 1999). Während OspA überwiegend exprimiert wird, während die Borrelie den Darm der Zecke kolonisiert, so wird OspC dann gebildet, wenn Borrelien während einer Blutmahlzeit auf den von der Zecke gestochenen Wirt übertragen werden (Carroll et al., 1999; Schwan et al., 1995).

Eine Infektion mit Borrelien wird beim Menschen als Lyme-Borreliose bezeichnet. Man spricht von einer multisystemischen Erkrankung, von der angenommen wird, dass sie hauptsächlich auf eine entzündliche Reaktion des Körpers auf die Borrelieninfektion zurückzuführen ist. Die Entwicklung der Lyme-Borreliose ist in drei Stadien aufgeteilt: 1. frühe lokale Infektion, 2. frühe verbreitete Infektion, 3. späte persistierende Infektion (Zajkowska et al., 2012). An der Einstichstelle, an der die Zecke ihre Blutmahlzeit vollzieht, kann es zu einer Übertragung von Borrelien auf den Menschen kommen. Charakteristisch für eine Infektion ist ein schmerzloser, roter Hautausschlag, der sich ringförmig um diese Einstichstelle bildet, die so genannte *Erythema migrans* (EM). Sie wird auch Wanderröte genannt, da sich der kreisförmige Ausschlag über die Zeit nach außen bewegt. Es handelt sich hierbei um die erste Immunantwort des Körpers mit Zellen, wie Makrophagen, T-Zellen, dendritischen Zellen und Neutrophilen (Berger, 1984; Steere et al., 1983). Die Wanderröte wird in der Regel von Grippe-ähnlichen Symptomen wie Fieber, Kopfschmerzen, Müdigkeit, Übelkeit sowie Rücken- und Gelenkschmerzen begleitet (Steere et al., 1983). Leider tritt die EM nur in etwa 60 % der Fälle auf, daher kann eine Infektion mit Borrelien zunächst auch unerkant bleiben. Die Behandlung mit Antibiotika wie Doxycyclin im

Frühstadium der Infektion hat eine gute Prognose, während eine ausbleibende Behandlung zu fortschreitenden Manifestationen der Lyme-Borreliose führt, die anschließend schwieriger zu heilen sind (Stanek and Strle, 2018; Zajkowska et al., 2012).

3.1.4 Makrophagen-Borrelien-Interaktion

Biopsien der betroffenen Stellen innerhalb der *Erythema migrans* zeigen die Akkumulation verschiedener Immunzellen wie Makrophagen (Salazar et al., 2003). Diese sind Teil des angeborenen Immunsystems und die erste Verteidigungslinie gegen Pathogene mit Hilfe eines Prozesses, der als Phagozytose bezeichnet wird. Phagozytose ist als Aufnahme von Partikeln mit einem Durchmesser von mehr als 0,5 μm definiert (Gordon, 2016). Makrophagen werden auch als professionelle Phagozyten bezeichnet, da sie in der Lage sind, pro Zelle eine hohe Anzahl an Bakterien zu eliminieren. Sie werden von aus den Knochenmark-abgeleiteten myeloischen Vorläuferzellen gebildet und zirkulieren als Monozyten in der Blutbahn. Bei Entzündung und der damit einhergehenden chemotaktischen Anziehung durch Zytokine dringen Monozyten in das jeweilige Gewebe ein und differenzieren dort zu Makrophagen (Carman, 2009).

Üblicherweise erfolgt die Erkennung von Bakterien entweder durch Opsonine, die Faktoren des Komplementsystems und Antikörper einschließen, oder durch konservierte oberflächenexponierte Proteine, so genannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs - *pathogen associated molecular patterns*). Opsonine und PAMPs werden von mehreren Zelloberflächenrezeptoren erkannt. Sobald eine Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung hergestellt und die Bakterien immobilisiert sind, entwickeln Makrophagen Protrusionen, die den Erreger einschließen und zur Internalisierung beitragen. Diese Schritte der Immobilisierung und Internalisierung erfordern eine gut abgestimmte und lokalisierte Regulation des Aktinzytoskeletts. Im Fall von Borrelien ist bekannt, dass ihre Phagozytose durch mehrere verschiedene Rezeptoren vermittelt wird, einschließlich opsonischer Rezeptoren wie Fc γ R und dem Komplementrezeptor 3 (CR3 - *complement receptor 3*) (Benach et al., 1984; Hawley et al., 2012). Darüber hinaus kann die Internalisierung von *Borrelia burgdorferi* auch durch den nicht-opsonischen Toll-like-Rezeptor 2 (TLR2) vermittelt werden, wobei

die nachfolgende Signalübertragung Signalwege umfasst, die sowohl MyD88-abhängig als auch -unabhängig sind (Salazar et al., 2009; Shin et al., 2009).

Die Aufnahme von Pathogenen erfolgt in ein spezifisches Kompartiment der Zelle, das Phagosom, welches sich aus dem Abschnüren der Pathogen-umschließenden Membran ableitet. Phagosomen reifen dann aufgrund von Fusionen mit Endo- und Lysosomen zu Phagolysosomen, was zu einer Ansäuerung und Aktivität von lytischen Enzymen innerhalb dieses Kompartiments und damit zum Abbau der aufgenommenen Pathogene führt (Fairn and Grinstein, 2012). Die Aufnahme von Borrelien erfolgt in zwei Stufen: Zuerst wird die Spirochäte in der Nähe der Makrophagenoberfläche durch die Ausbildung eines Filopodiums fixiert (Abb. 2A). Die Herausforderung für die Makrophagen besteht dabei, die höchst motilen Borrelien zu immobilisieren und am Loslösen zu hindern. Daher erfolgt bei der Bildung der Filopodien eine Nukleation, Elongation und Bündelung von unverzweigten Aktinfilamenten, um die erforderliche Steifheit und Stabilität zu erreichen. Dabei sind die Formine FMNL1 und mDia1 in den Borrelien-induzierten Filopodien lokalisiert, ihre Aktivität ist hierbei für die Bildung von Filopodien als Reaktion auf Makrophagenkontakt mit Borrelien und auch für die anschließende Internalisierung erforderlich (Naj et al., 2013). Neben FMNL1 ist Daam1 als ein weiterer Vertreter der Formingruppe wichtig für den Prozess der Bündelung der Aktinfilamente in Filopodien (Abb. 2A) (Hoffmann et al., 2014).

Nachdem die Borrelien fixiert und nahe zur Makrophagenoberfläche gebracht wurden, werden sie überwiegend durch einen spezifischen Mechanismus internalisiert, den man als *coiling*-Phagozytose bezeichnet (Abb. 2B) (Rittig et al., 1992). Während dieses Prozesses werden die Spirochäten sukzessiv durch eine lange, Aktin-reiche Protrusion, dem *coiling*-Pseudopod, umhüllt, der sich in mehreren Windungen um die Borrelië wickelt (Naj and Linder, 2015). Der Prozess selbst ist von der Wirtszelle aus gesteuert und basiert auf der charakteristischen Morphologie der Bakterien (Rittig et al., 1998a). Dieser Mechanismus ist auch für *Legionella pneumophila*, *Trypanosoma cruzi* und Leishmanien sowie bestimmte Pilze beschrieben (Horwitz, 1984; Rittig et al., 1998b). Der Mechanismus der *coiling*-Phagozytose kann nicht einem bestimmten Typ eines Phagozytose-Rezeptors zugeordnet werden, da die *coiling*-Phagozytose von *Borrelia burgdorferi* sowohl Merkmale der CR3- als auch der FcγR-abhängigen Phagozytose aufweist (Linder et al., 2001). Für die anschließende

intrazelluläre Prozessierung der Borrelien in Phagosomen sind sogenannte RabGTPasen charakteristisch, auf welche nachfolgend eingegangen wird.

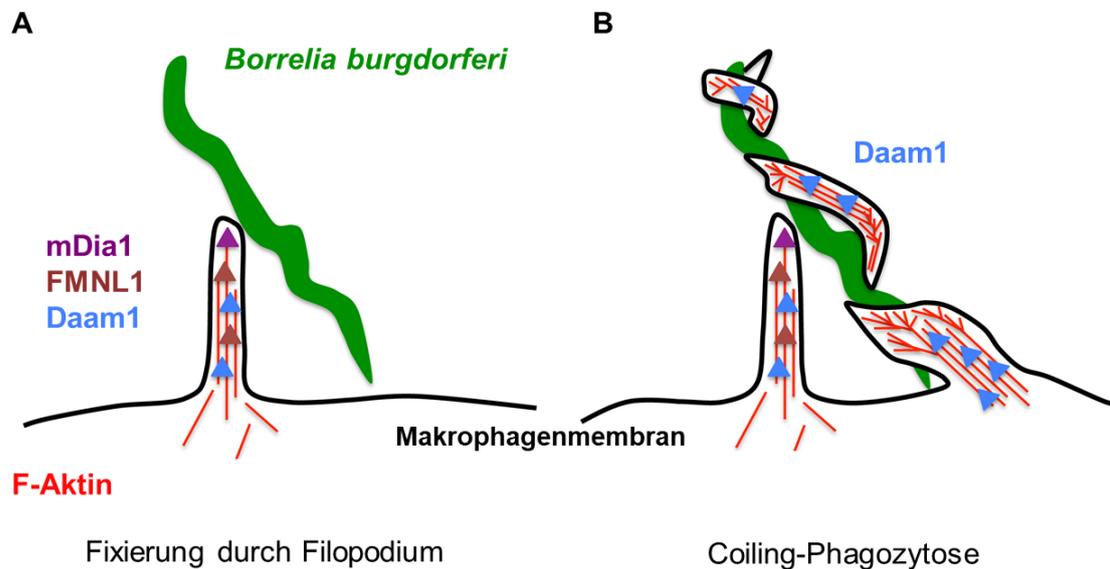


Abb. 2: Erster Kontakt und Aufnahme von Borrelien durch Makrophagen. A: Fixierung des Spirochäten durch Membranausstülpung (Filopodium), die mittels Aktinnukleation und Bündelung von Aktinfilamenten durch die Formine mDia1, FMNL1 und Daam1 hervorgerufen wird. B: Umhüllung und anschließende Internalisierung des Borreliums durch *coiling*-Phagozytose. Der *coiling*-Pseudopod ist ebenfalls positiv für Daam1. Modifiziert nach Naj and Linder (2015).

3.2 Die Rolle der RabGTPasen bei der intrazellulären Prozessierung von Borrelien

Die Entwicklung der Phagosomen während des Phagozytoseprozesses wird in drei verschiedene Stufen eingeteilt: 1. frühes Phagosom, 2. spätes Phagosom und 3. Phagolysosom. Die vollständig maturierten Phagolysosomen sind in der Lage, Proteine, Lipide und Kohlenhydrate zu verdauen und dadurch auch Bakterien sowie andere Pathogene. Schlüsselregulatoren dieses Reifeprozesses sind u.a. Vertreter der RabGTPasen-Familie (*Ras-related proteins in brain*), kleine GTPasen mit einer Größe von 20-25 kDa. Sie sind molekulare Schalter, die zwischen einem aktiven, GTP-gebundenen und einem inaktiven, GDP-gebundenen Zustand wechseln (Abb. 3) (Stenmark and Olkkonen, 2001; Stenmark et al., 1994). In ihrem aktiven Zustand

interagieren RabGTPasen mit ihren jeweiligen Effektorproteinen, die verschiedene Prozesse steuern, einschließlich Fusion und Spaltung phagosomaler Membranen sowie motorabhängiger Transport (Hutagalung and Novick, 2011).

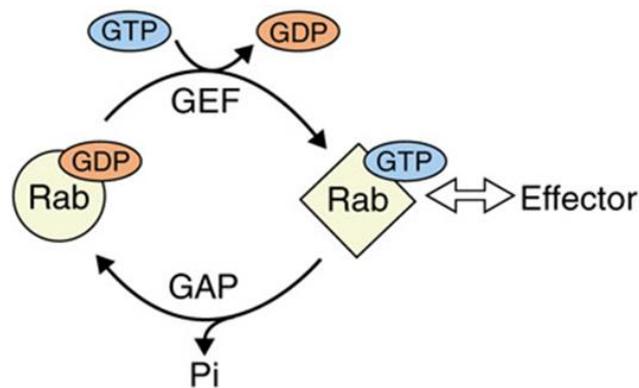


Abb. 3: RabGTPasen-Zyklus. Die RabGTPase wechselt zwischen inaktiver GDP- und aktiver GTP-gebundener Formen, die unterschiedliche Konformationen aufweisen. Die Umwandlung erfolgt durch Nukleotidaustausch, der durch einen Guaninaustauschfaktor (GEF - *guanine nucleotide exchange factor*) katalysiert wird. Die Umwandlung von der GTP-Form in die GDP-gebundene Form erfolgt durch GTP-Hydrolyse, die durch ein GTPase-aktivierendes Protein (GAP) erleichtert wird. Pi: anorganisches Phosphat. Modifiziert nach Stenmark and Olkkonen (2001).

Im Falle der Borrelien-haltigen Phagosomen in Makrophagen spielen diese kleinen GTPasen ebenfalls eine große Rolle. Für die weitere Prozessierung von *Borrelia burgdorferi* wird die Spirochäte zunächst in ein Rab22a-positives Phagosom internalisiert. Anschließend wird das Phagosom von Rab5a-positiven Vesikeln kontaktiert (Abb. 4). Direkt nach Beginn der Internalisierung werden die länglichen, gestreckten Spirochäten zu kugelförmigen und globulären Strukturen kompaktiert. Diese Verdichtung der Borrelien geht mit einer wiederholten Tubulierung der Membran von Phagosomen einher, was darauf hindeutet, dass die Reduktion der phagosomalen Oberfläche eine treibende Kraft für die Kompaktierung der Spirochäten sein könnte. Interessanterweise findet die Bildung und Ablösung von Membrantubuli bevorzugt an Stellen statt, an denen Rab5a-positive Vesikel die Rab22a-positive phagosomale Membran kontaktieren, was darauf hinweist, dass beide RabGTPasen für diesen Prozess erforderlich sind (Naj and Linder, 2015). Eine siRNA-vermittelte Depletion beider RabGTPasen hat sowohl eine reduzierte Kompaktierung, als auch ein erhöhtes intrazelluläres Überleben von Borrelien zur Folge (Naj and Linder, 2015).

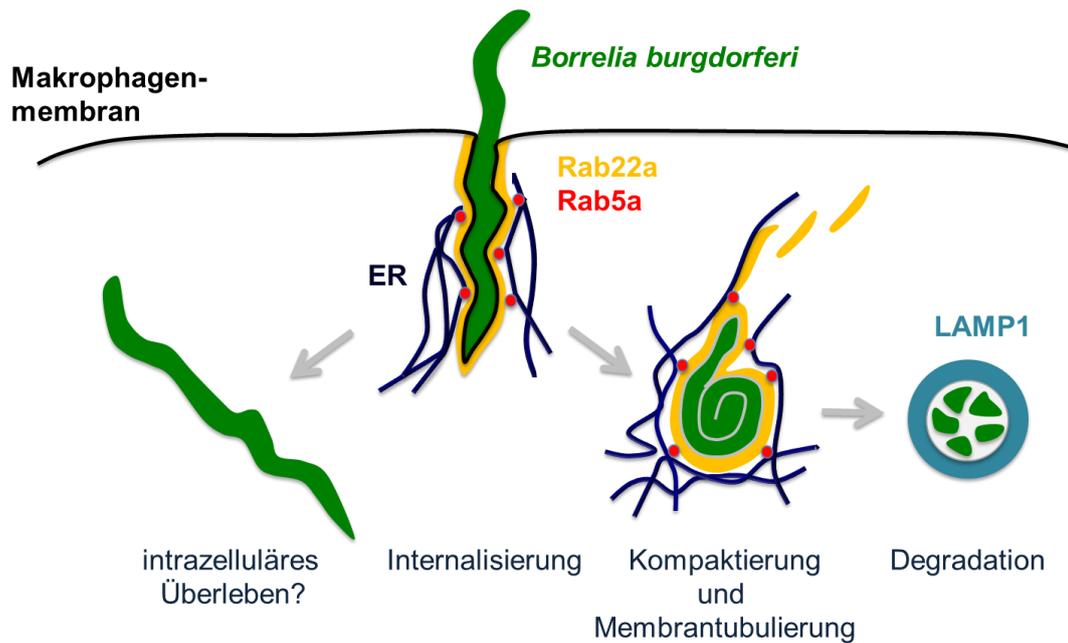


Abb. 4: RabGTPasen sind an der intrazellulären Prozessierung von Borrelien in Makrophagen beteiligt. Die Spirochäte (grün) wird über *coiling*-Phagozytose aufgenommen und unmittelbar in ein Phagosom, welches positiv für Rab22a (gelb) ist, aufgenommen. Das Borrelien-haltige Phagosom wird von Rab5a-Vesikeln (rot) kontaktiert. Eine anschließende Membrantubulation bewirkt eine Reduktion der Phagosomenoberfläche, was zur Kompaktierung der Borrelien führt. Eine weitere Reifung des Phagosoms zum Phagolysosom, welche durch den lysosomalen Marker LAMP1 (blau) angezeigt wird, führt zur Eliminierung der Spirochäten. Die Abwesenheit von Rab5a und Rab22a kann zu einem erhöhten intrazellulären Überleben von Borrelien führen. ER: Endoplasmatisches Retikulum. Modifiziert nach Naj and Linder (2015).

Neben diesen beiden RabGTPasen sind nur wenige Proteine bekannt, die Einfluss auf die intrazelluläre Prozessierung von Borrelien haben. Aufgrund der Beteiligung an Prozessen wie Endo- bzw. Phagozytose wurde die nachfolgende Proteingruppe der Sorting Nexine diesbezüglich näher betrachtet.

3.3 Sorting Nexine (SNXe)

3.3.1 Allgemeine Einführung

Die Sorting Nexin-Familie besteht aus einer großen und vielfältigen Gruppe von zytoplasmatischen- und Membran-assoziierten Proteinen, die an verschiedenen Teilprozessen der Endo- bzw. Phagozytose, der Proteinsortierung oder dem intrazellulärem Proteintransport beteiligt sind. Bislang sind zehn Vertreter in Hefen und 33 SNXe in Säugerzellen bekannt (Cullen, 2008). Allen Vertretern gleich ist das Vorhandensein einer Phosphatidylinositolphosphat (PIP)-bindenden Domäne, der so genannten PX-Domäne (*phox homology*) (Seet and Hong, 2006), auf die nachfolgend gesondert eingegangen wird (Kap. 3.3.3). Darüber hinaus beinhalten SNXe weitere Domänen zur Protein-Lipid- oder Protein-Protein-Interaktion. Dies ist Grundvoraussetzung zur spezifischen Erkennung von zellulären Membranen sowie Proteinbindung für zelluläre Sortier-, Signal- und Transportprozesse. Der erste identifizierte Vertreter, SNX1, wurde 1996 in einem *yeast-to-hybrid*-Screen erstmals als neuer Interaktionspartner für den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor EGFR (*epidermal growth factor receptor*) beschrieben (Kurten et al., 1996).

3.3.2 Klassifikation der SNXe

Sorting Nexine werden aufgrund ihres unterschiedlichen modularen Aufbaus aus verschiedenen Domänen eingeteilt (Abb. 5A-C). Hierbei unterscheidet man drei Untergruppen der SNX-Familie:

1. SNX1, SNX2, SNX4, SNX5, SNX6, SNX7, SNX8, SNX9, SNX18, SNX30, SNX32 und SNX32 bilden dabei die Gruppe der so genannten SNX-BAR-Proteine, die am C-terminalen Ende eine BAR-Domäne (Bin/Amphiphysin/Rvs) besitzen (Abb. 5A). Über diese BAR-Domänen können zwei SNX-Proteine Homo- oder Heterodimere bilden, durch Assoziation mit Membranen die Membrankurvatur erfassen oder sogar induzieren (Sierecki et al., 2014; van Weering et al., 2012a) und somit zum Beispiel an der Formierung von Membrantubuli beteiligt sein (Cullen and Korswagen, 2011; van Weering et al., 2012b).

2. Die zweite Subfamilie, bestehend aus SNX3, SNX10, SNX11, SNX12, SNX16, SNX20, SNX21, SNX22, SNX24 und SNX29, ist charakteristisch für SNX-Proteine, die lediglich eine PX-Domäne besitzen und dadurch größtenteils zu den kleinsten Vertretern gehören (Abb. 5B) (Cullen, 2008).
3. Die dritte Gruppe beinhaltet die übrigen SNX-Proteine, die unterschiedliche Protein-Protein- oder Protein-Lipid-Interaktionsdomänen aufweisen (Abb. 5C). So besitzen SNX17, SNX27 und SNX31 beispielsweise eine FERM-Domäne (Protein 4.1, Ezrin, Radixin, Moesin), die Bindung und Recycling von β -Integrinen ermöglicht (Bottcher et al., 2012; Tseng et al., 2014) oder G-Protein-regulatorische Sequenzen wie bei SNX13, SNX14 und SNX25 (Hollinger and Hepler, 2002).

Eine Sonderstellung nimmt SNX23 ein, welches ebenfalls als Kif16B bekannt ist (Hoepfner et al., 2005). Bei der Klassifizierung ist generell zu beachten, dass das Hauptkriterium in erster Linie die vorhandene PX-Domäne ist. Einige vermeintliche SNX-Proteine, wie das Kinesin Kif16B, können jedoch fälschlicherweise dieser Familie zugeordnet werden. Eine Fehlkategorisierung kann nur durch die systematische Untersuchung der zellulären Funktion der einzelnen Proteine erkannt werden (Worby and Dixon, 2002).

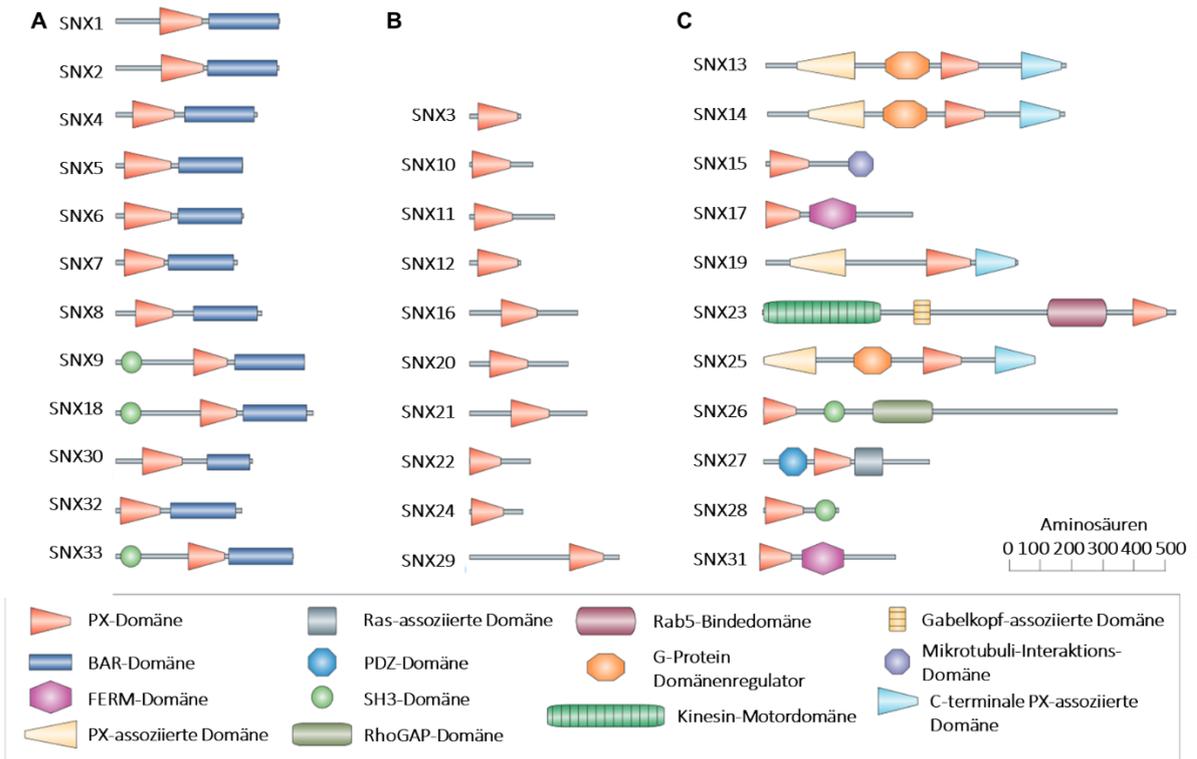


Abb. 5: Übersicht über die in Säugerzellen bekannten Sorting Nexine. Abgebildet sind die drei Untergruppen der SNXe, spaltenweise sortiert. A: SNX-PX-BAR-Proteine, B: SNX-PX-Proteine, C: SNX-PX-Variabel. Modifiziert nach Cullen (2008).

3.3.3 Die PX-Domäne

Ein wesentlicher Bestandteil aller identifizierten SNXe ist die PX-Domäne, welche eine Protein-Lipid-Interaktion vermittelt. Sie ermöglicht die Bindung an Phosphatidylinositol-3-monophosphat (PI(3)P), aber auch an Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat (PI(4,5)P₂), wobei Ersteres ein zentraler Regulator im Endosomen- sowie Membrantransport ist (Simonsen et al., 2001). Die PX-Domäne ist ein 100-130 Aminosäuren langes Peptid bestehend aus drei antiparallelen β -Faltblättern und drei aufeinanderfolgenden α -Helices (Overduin et al., 2015; Song et al., 2001; Xu et al., 2001b). Eine wesentliche Eigenschaft dieser Sekundärstruktur ist eine strukturlose, Prolin-reiche Schleife zwischen Helix α 1 und α 2 sowie eine basische, elektropositive Bindetasche für eine direkte Bindung der negativ-geladenen Phosphatgruppen der Phosphoinositole (Abb. 6A) (Lenoir et al., 2018; Lucas et al., 2016).

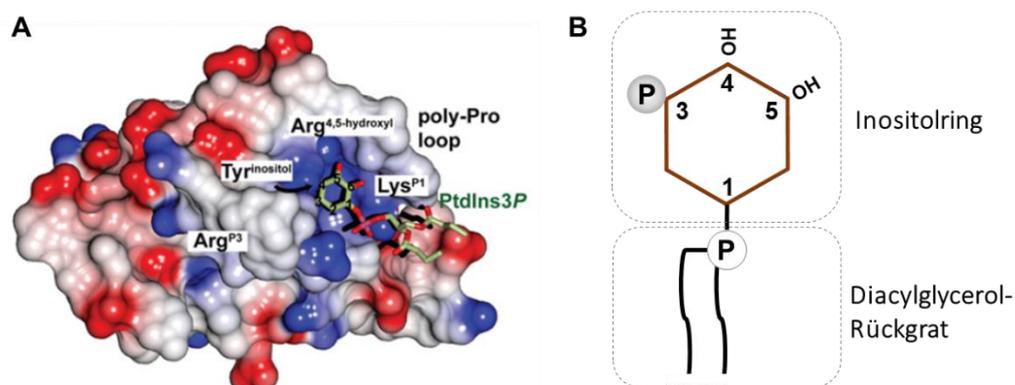


Abb. 6: Die PX-Domäne und PI(3)P. A: Oberflächenstruktur einer im Komplex mit PI(3)P kristallisierten PX-Domäne vom p40phox-Protein (PDB-Code: 1H6H). Eine rote Färbung stellt elektronegative und eine blaue Färbung elektropositive Bereiche dar. Modifiziert nach Teasdale and Collins (2012). B: Schematische Darstellung eines 3'-phosphorylierten Inositols (PI(3)P).

Für die Bindung von zumeist PI(3)P durch die PX-Domäne sind drei Aminosäuren verantwortlich: Arginin-70, Tyrosin-71 und Lysin-95. Die Positionen der einzelnen Aminosäuren beziehen sich auf die PX-Domäne im 19 kDa großen SNX3-Protein. Arginin-70 ist hierbei wichtig für die Bindung des 3'-Phosphats, welches PI(3)P seinen numerischen Namen gibt. Das darauffolgende Tyrosin-71 vermittelt neben Arginin-70 die stärkste Bindung, da es als aromatische Aminosäure mit dem Inositolring des

PI(3)P eine Stapelbindung eingeht. Die Mutation beider Aminosäuren, Arginin-70 und Tyrosin-71, sind gut beschriebene Ansätze zu Bindungsstudien der PX-Domäne (Xu et al., 2001a). Die dritte Aminosäure Lysin-95 ist wichtig für die Bindung des P1-Phosphats und damit zur Ausrichtung des Phosphoinositols innerhalb der Bindungstasche. Die 4'- und 5'-Hydroxygruppen des Inositolrings gehen abschließend eine Bindung mit einer hochkonservierten Arginin-Seitenkette ein, was ebenfalls zur Ausrichtung des PIPs beiträgt und eine eventuelle Bindung von 4'- oder 5'-phosphorylierten Lipiden ausschließt (Abb. 6A,B) (Lenoir et al., 2018; Lucas et al., 2016).

3.3.4 Sorting Nexine und Infektionen

Die Aufnahme von Bakterien in Immunzellen bedarf zum Teil erheblicher Veränderungen im Vesikeltransport und Membranbewegungen. So sind zum Beispiel die Ausbildung von *phagocytic cups* oder Filopodien notwendig, um Pathogene aufzunehmen. Der Umbau des Aktinzytoskeletts und das zeitlich-räumliche Vorhandensein bestimmter Regulatoren sind dafür entscheidend. Jedoch ist aktuell noch wenig über die potenzielle Rolle von Sorting Nexinen innerhalb dieser Prozesse bekannt. Das Eindringen von *Salmonella enterica* ist hierbei das bis jetzt am besten bekannte Beispiel. Demzufolge ist SNX1 für die Organisation des tubulären Netzwerks während der Bildung der Vakuolen, die Salmonellen beinhalten (SCV – *Salmonella-containing vacuoles*), verantwortlich (Bujny et al., 2008). Eine Depletierung von SNX3 dagegen zeigte eine reduzierte Anzahl an *Salmonella*-induzierten Filamenten (SIFs) (Braun et al., 2010). Neuere Studien zeigen, dass *Chlamydia trachomatis* SNX5 für sich benutzt, um den Retromer-basierten Transport zu verändern oder zu unterbrechen (Elwell et al., 2017). Dagegen konnte gezeigt werden, dass SNX10 die Phagosomenreifung in Makrophagen begünstigt und vor einer Infektion von *Listeria monocytogenes* in Mausmodellen schützt (Lou et al., 2017).

Die meisten Sorting Nexine wirken mit einem anderen SNX oder anderen Interaktionspartner zusammen in Transport- und Membranprozessen. Im Verlauf dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass neben der Gruppe der Sorting Nexine auch ein Vertreter der Gruppe der Galectine eine entscheidende Rolle bei der Prozessierung von Borrelien in Makrophagen spielen.

3.4 Galectine

Kohlenhydratverbindungen können energiereiche Moleküle an Schlüsselstellen in Stoffwechselwegen sein. Sie werden auch verwendet, um Proteine und Lipide zu modifizieren, beispielsweise um Glykolipide oder -proteine herzustellen, die sowohl in intrazellulären als auch extrazellulären Prozessen wichtig sind (Liu et al., 2002). Zucker-bindende Lektine sind hierbei wichtige Modulatoren vieler solcher Prozesse. Galectine sind Proteine, die β -Galaktoside wie N-Acetyllaktosamin binden, welche in N- und O-verknüpften Glykoproteinen vorhanden sind. Sie sind unter anderem an der Kontrolle des Prä-mRNA-Spleißens und bei Prozessen wie Apoptose, Infektion, Zellzyklus, Zellteilung, Metastasierung und Diabetes beteiligt (Chou et al., 2018; Fortuna-Costa et al., 2014; Pugliese et al., 2014). Eine Klassifizierung auf der Grundlage struktureller Ähnlichkeiten umfasst drei verschiedene Typen an Galectinen:

1. Prototyp-Galectine (Galectin-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 und -15), die eine konservierte Domäne zur Erkennung von Kohlenhydraten besitzt (*carbohydrate recognition domain* – CRD) und als Monomere oder Dimere vorliegen.
2. Tandem-Galectine (Galectin-4, -6, -8, -9 und -12), die zwei verschiedene CRDs enthalten, die durch ein *linker*-Peptid mit bis zu 70 Aminosäuren getrennt sind.
3. Galectin-3, welches auch als Chimärentyp bezeichnet wird, enthält eine CRD, die an eine N-terminale Region gebunden ist, die nicht zum Lektin gehört.

Die meisten Galectine sind hinsichtlich ihrer Kohlenhydrat-bindenden Aktivitäten entweder zwei- oder mehrwertig, was die Erkennung mehrerer Bindungspartner und die Aktivierung unterschiedlicher Signalwege ermöglicht. Prototyp-Galectine können dimerisieren, Tandem-Galectine vom *Repeat*-Typ sind mindestens zweiwertig und Galectin-3 kann durch Bindung an mehrwertige Glykoproteine Oligomere bilden (Rabinovich et al., 2007; Yang et al., 2008). Eine Übersicht über die verschiedenen Galectin-Typen gibt Abb. 7. Da sich Galectin-9 als wichtiger Interaktionspartner für SNX3 während dieser Arbeit herauskristallisiert hat, wird im Folgenden detailliert auf diesen Vertreter der Galectin-Familie eingegangen.

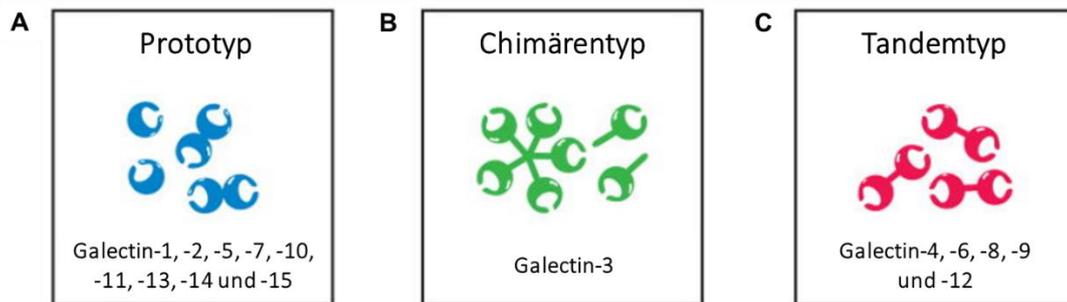


Abb. 7: Schema von Aufbau und Strukturen der verschiedenen Vertreter der Galectin-Familie. A: Prototyp-Galectine, die eine CRD enthalten und Homodimere bilden können. B: Chimärentyp mit Galectin-3 als einzigen Vertreter. Nach der Ligandenbindung unterliegt Galectin-3 Konformationsänderungen, die seine Oligomerisierung zu Pentameren ermöglichen. C: *Tandem-repeat*-Galectine, die zwei verschiedene CRDs enthalten, welche durch einen *linker* miteinander verbunden sind. Modifiziert nach Rabinovich et al. (2007).

3.4.1 Galectin-9: Struktur und Eigenschaften

Galectin-9 ist ein so genanntes *tandem repeat*-Galectin, welches zwei konservierte Domänen zur Erkennung von Kohlenhydraten besitzt (*carbohydrate recognition domain* – CRD). Diese CRDs sind durch eine verbindende Sequenz miteinander verknüpft (*linker*). Galectin-9 wurde erstmals unabhängig und fast gleichzeitig von drei verschiedenen Arbeitsgruppen identifiziert: Als eine neue Galectin-Isoform (Wada and Kanwar, 1997), als Tumorantigen in Zellen von Patienten mit Hodgkin-Lymphom (Tureci et al., 1997), und als neuer eosinophiler chemischer Lockstoff, der von T-Zellen produziert wird (Matsumoto et al., 1998). Die Expression von Galectin-9 erfolgt überwiegend in Leber, Dünndarm und Thymus und in geringerer Menge auch in Niere, Milz, Lunge sowie Herz- und Skelettmuskulatur (Wada and Kanwar, 1997; Wada et al., 1997). Humanes Galectin-9 hat eine sehr hohe Affinität für N-glykosilierte und verzweigte Oligosaccharide, β 1-3-verknüpfte poly-N-Acetyllaktosamine und α 2-3-sialysierte Oligosaccharide (Nagae et al., 2009; Nagae et al., 2008; Yoshida et al., 2010), mit Dissoziationskonstanten (K_d) im nanomolaren oder einstelligen mikromolaren Bereich, bei sialysierten Oligosacchariden im niedrigen zweistelligen mikromolaren Bereich (Hirabayashi et al., 2002). Für die Bindung der Zuckerverbindungen ist jeweils eine Aminosäure in der Bindungstasche der jeweiligen CRD verantwortlich: Alanin-46 zur Bindung von Forssmann-Pentasacchariden (Nagae et al., 2008), Asparagin-137,

welche Poly-N-Acetyllaktosamine bindet (Nagae et al., 2009) und Arginin-221 für die Bindung von sialysierten Oligosacchariden (Yoshida et al., 2010).

Es existieren insgesamt drei verschiedene Isoformen von Galectin-9, die auf der unterschiedlichen Länge der *linker*-Region basieren: Die kleine Isoform Gal9(S) mit 35 kDa, Gal9(M) (36 kDa, auch bekannt als Ecalectin (Hirashima, 1999)) und die Größte, Gal9(L) mit 39 kDa (Sato et al., 2002). Die Expression der drei Isoformen geschieht nicht einheitlich, so exprimieren T-Zellen zum Beispiel ausschließlich Gal9(M) und Gal9(L), jedoch nicht die kleine Isoform (Chabot et al., 2002).

3.4.2 Expression von Galectin-9 in mikrobiellen Infektionen

Mikrobielle Infektionen erhöhen das endogene Expressionslevel von Galectin-9 in infizierten Wirtszellen. Dies wurde bereits für das Dengue-Virus in Endothelzellen (Warke et al., 2003), für *Mycobacterium tuberculosis* in peritonealen Makrophagen (Jayaraman et al., 2010) oder für das Herpes-Simplex-Virus (HSV) in lymphoiden Zellen gezeigt (Sehrawat et al., 2010). Ebenfalls erhöhte Expressionslevel an Galectin-9 können durch Lipopolysaccharide (LPS), dem häufigsten Bestandteil der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien, hervorgerufen werden. Vaskuläre Endothelzellen beispielsweise, die mit LPS behandelt wurden, zeigten anschließend stark erhöhte Gal9 mRNA- und Proteinlevel (Imaizumi et al., 2007). So verursachen beide, bakterielle und virale Infektionen, eine Hochregulation der Galectin-9-Expression in infizierten Zellen.

3.4.3 Duale, antimikrobielle Funktion von Galectin-9

Galectin-9 hat zwei verschiedene Funktionen bezüglich antimikrobieller Immunität. Zum einen stimuliert es die angeborene Immunantwort durch die Rekrutierung von Eosinophilen und erhöht dadurch die antivirale, inflammatorische Antwort (Ishikawa et al., 2004). Im Falle von Infektionen mit *Leishmania major* agiert Galectin-9 als ein Leishmanien-spezifischer Rezeptor in Makrophagen, der zu einer Eliminierung des Parasiten in Makrophagen beiträgt (Pelletier et al., 2003). Der bislang am besten

beschriebene und charakterisierte Bindungspartner für Galectin-9 ist TIM-3 (*T-cell immunoglobulin mucin 3*), welches auf spezifischen Untergruppen von T-Zellen sowie Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen (DCs) lokalisiert ist (Freeman et al., 2010). Die Arbeit von Jayaraman et al. zeigt einen gegenläufigen TIM-3/Galectin-9-Signalweg, der die intrazelluläre Replikation von *M. tuberculosis* in Makrophagen beschränkt (Jayaraman et al., 2010).

Die zweite Funktion beinhaltet die Inhibierung der adaptiven Immunantwort, speziell die T-Zellantwort. So zeigen Galectin-9-Knockoutmäuse eine bessere T-Zellantwort gegenüber HSV-Infektionen (Sehrawat et al., 2010). Die Arbeiten von Sehrawat et al. zeigten, dass die Behandlung von Wildtypmäusen mit Laktose, einem kompetitiven Galectin-9-Inhibitor, zu einer erhöhten Anti-HSV-Immunantwort führt, wohingegen die Zugabe von rekombinanten Galectin-9 den gegenteiligen Effekt zur Folge hatte und die T-Zellantwort blockierte (Sehrawat et al., 2010). Dies zeigt, dass Galectin-9 an der Aktivierung der angeborenen Immunität sowie an einer frühzeitigen Abschaltung der adaptiven Immunantwort während mikrobieller Infektionen beteiligt ist.

4. Ziel der Arbeit

Es ist wenig über die intrazelluläre Prozessierung von Borrelien in Immunzellen, insbesondere über den Kompaktierungsmechanismus, bekannt. Zu diesem Zeitpunkt sind nur wenige Proteine identifiziert, die an der Reifung von Borrelien-haltigen Phagosomen beteiligt sind.

Diese Arbeit hatte das Ziel, die Proteingruppe der Sorting Nexine in Bezug auf die Regulation des Phagozytoseprozesses von *Borrelia burgdorferi* in primären humanen Makrophagen genauer zu untersuchen, sowie die zeitlich-räumlich Koordinierung von verschiedenen Interaktoren der potenziellen SNXe am Phagosom mechanistisch darzustellen.

5. Material

5.1 Geräte

Tab. 1: Geräte.

Bezeichnung	Typ, Hersteller
Autoklav	Varioklav, Thermo Scientific, Rockford (USA)
Eismaschine	Flockeneisbereiter AF-10, Scotsman, Vernon Hills (USA)
Filmkassette	Hartenstein, Würzburg (D)
Gel-Apparaturen horizontal (DNA-Gelelektrophorese)	PeqLab, Erlangen (D)
Gel-Apparaturen vertikal (SDS-PAGE)	PeqLab, Erlangen (D) und Bio-Rad, Hercules (USA)
Heizplatte/Magnetrührwerk IKAMAG RET	Janke&Kunkel GmbH&Co. KG, Staufen (D)
iBlot2	Life Technologies, Carlsbad (USA)
Inkubatoren	CB Series, Binder, Tuttlingen (D); BBD 6220, Heraeus, Hanau (D)
µMACS Separator	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach (D)
NanoDrop ND-1000	PeqLab, Erlangen (D)
NEON Transfektionssystem	Life Technologies, Carlsbad (USA)
Netzgeräte	PeqPower 250/300, PeqLab, Erlangen (D)
pH-Meter	Mettler-Toledo GmbH, Gießen (D)
Photometer	Ultraspec 3100 pro, GE Healthcare, München (D)
Scanner	CanoScan 4400F, Canon, Amsterdam (NL)
Schüttelinkubator	Certomat BS-1, Sartorius, Göttingen (D)
Schüttler	Edmund Bühler GmbH, Tübingen (D)
Sterilwerkbank (S2)	Hera Safe, Thermo Scientific, Rockford (USA)
Vortex-Gerät	Janke&Kunkel GmbH&Co. KG, Staufen (D)
Waage	440-47N, Kern, Balingen-Frommern (D)
Wasserbad	Grant Instruments, Cambridge (GB)
Zählkammer	Neubauer Zählkammer, Hartenstein, Würzburg (D)
Zentrifugen	Sorvall RC-5B, RC28S, Thermo Scientific, Rockford (USA) 5417R/5810R/MiniSpin, Eppendorf, Hamburg (D)

5.2 Software

Tab. 2: Software.

Bezeichnung	Typ, Hersteller
GraphPad Prism 5.04	GraphPad Software, San Diego (USA)
ImageJ 1.5.1j8	NIH, Bethesda (USA)
SnapGene Viewer 4.2.9	GSL Biotech LLC, Chicago (USA)
Serial Cloner 2.6	Freeware, Entwickler Franck Perez (FR)
Swiss PDB Viewer 4.1	Swiss Institute of Bioinformatics, Basel (CH)
Volocity 6	PerkinElmer, Waltham (USA)
Volocity Demo 6.1.1	PerkinElmer, Waltham (USA)

5.3 Chemikalien und Reagenzien

Tab. 3: Chemikalien und Reagenzien.

Bezeichnung	Typ, Hersteller
2-Propanol	Merck, Darmstadt (D)
Bradfordreagenz	Bio-Rad, München (D)
BSA	Roth, Karlsruhe (D)
CD14 beads	Miltenyi Biotec, Teterow (D)
Dimethylsulfoxid >99,5 %	Roth, Karlsruhe (D)
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe (D)
DPBS	Thermo Scientific, Karlsruhe (D)
DQ-BSA	Life Technologies, Carlsbad (USA)
ECL Substrat (Femto)	Thermo Scientific, Karlsruhe (D)
ECL Substrat (Pico)	Thermo Scientific, Karlsruhe (D)
EDTA	Roth, Karlsruhe (D)
Entwicklerlösung (WB)	AGFA, Mortsel (BE)
Ethanol 96 % vergällt	Roth, Karlsruhe (D)
Fixierungslösung (WB)	AGFA, Mortsel (BE)
Formaldehyd 16 % Methanol-frei	Roth, Karlsruhe (D)
Formaldehyd-Lösung 37 %	Sigma-Aldrich, Seelze (D)
Glycin >99 %	Sigma-Aldrich, Seelze (D)
Hoechst 33342	Life Technologies, Carlsbad (USA)
Incidin Plus Desinfektion	ecolab, Saint Paul (USA)
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe (D)
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe (D)
Kalziumchlorid	Roth, Karlsruhe (D)
Lymphozyten Separations Medium 1077	PAA Laboratories, Pasching (D)
Milchpulver	Roth, Karlsruhe (D)
Mowiol 4-88	Roth, Karlsruhe (D)

Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe (D)
Natriumhydroxid 32 %	Roth, Karlsruhe (D)
Proteaseinhibitor	Roche, Penzberg (D)
Saccharose	Roth, Karlsruhe (D)
Salzsäure 2 N	Roth, Karlsruhe (D)
SDS	Roth, Karlsruhe (D)
SiR-DNA (<i>silicone rhodamine DNA</i>)	Spirochrome, Stein am Rhein (CH)
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Seelze (D)
Tris-HCl	Sigma-Aldrich, Seelze (D)
Tween 20	Sigma-Aldrich, Seelze (D)

5.4 Verbrauchsmaterialien

Tab. 4: Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Typ, Hersteller
Deckgläschen (12 mm + 18 mm)	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim v. d. Rhön (D)
Dialysekassetten Slide-A-Lyser	Life Technologies, Carlsbad (USA)
Einwegskalpel	B. Braun Melsungen AG, Melsungen (D)
Einwegspritzen 2 ml, 5 ml, 20 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen (D)
Kanülen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen (D)
Kodak X-Omat AR Filme	GE Healthcare, München (D)
Objektträger	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim v. d. Rhön (D)
Parafilm „M“	American Can Company, Jersey City (USA)
Pasteurpipetten, Glas	Brand, Wertheim (D)
Petrischalen 12 mm + 22 mm WillCo-dish® mit Glasboden	WillCo Wells B.V., Amsterdam (NL)
Pinzetten	Manufactures D’Outils Dumont SA, Montignez (CH)
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht (D)
6-/12-Loch-Platten	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Reaktionsgefäß 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml (Eppis)	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Reaktionsgefäß 15 ml, 50 ml (Falcon-Röhrchen)	Sarstedt, Nümbrecht (D)
serologische Messpipetten 1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Sterilfilter, Filtopur S, 0,2 µm	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Stericup Vacuum Filter Cubs 0,2 µm mit Flasche	Millipore, Billerica (USA)

5.5 Größenstandards

Tab. 5: DNA- und Protein-Größenstandards.

Bezeichnung	Typ, Hersteller
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Scientific, Karlsruhe
PageRuler Plus prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, Karlsruhe
PageRuler Plus unstained Protein Ladder	Thermo Scientific, Karlsruhe

5.6 Kits

Tab. 6: Kits.

Bezeichnung	Typ, Hersteller
DNA Clean & Concentrator-5	Zymo Research Europe GmbH, Freiburg (D)
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Life Technologies, Carlsbad (USA)
Neon Transfection System	Life Technologies, Carlsbad (USA)
NOVEX Colloidal Blue Staining Kit	Thermo Scientific, Karlsruhe
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Karlsruhe
Pierce Silver Stain for Mass Spectrometry	Thermo Scientific, Karlsruhe
QIAquick Spin Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden
TGX FastCast Acrylamide Kit (10 % + 12 %)	BioRad, München (D)
ZR Plasmid Miniprep-Classic	Zymo Research Europe GmbH, Freiburg (D)

5.7 Medien und Zusätze für die Zellkultur

Tab. 7: Medien und Zusätze für primäre humane Monozyten bzw. Makrophagen.

Bezeichnung	Typ, Hersteller
RPMI1640 Basismedium	Thermo Scientific, Karlsruhe (D)
L-Glutamin-Penicillin-Streptomycin-Lösung (100x)	Sigma-Aldrich, Seelze (D)
Autologes, humanes Serum	Transfusionsmedizin, Uniklinik Hamburg-Eppendorf (D)

Tab. 8: Medien und Zusätze für *Borrelia burgdorferi*.

Bezeichnung	Typ, Hersteller
BSK-H	Bio&Sell, Feucht (D)
Kanamycin (200 µg/ml)	Serva, Heidelberg (D)
Gentamycin (100 µg/ml)	Serva, Heidelberg (D)
Kaninchenserum (6 % (v/v))	Bio&Sell, Feucht (D)

5.8 Enzyme

Tab. 9: Allgemeine Enzyme.

Bezeichnung	Typ, Hersteller
Alkalische Phosphatase	NEB, Frankfurt/Main (D)
Accutase	eBioscience, San Diego (D)
Pfu-Polymerase	Thermo Scientific, Karlsruhe (D)
T4-DNA-Ligase	Promega, Mannheim (D)

Tab. 10: Restriktionsendonukleasen.

Bezeichnung	Erkennungssequenz (5'→3')*	Reaktionstemperatur [°C]	Hersteller
<i>Bam</i> HI	G↓GATCC	37 °C	Thermo Scientific
<i>Xho</i> I	GT↓CGAG	37 °C	Thermo Scientific
<i>Eco</i> RI	G↓AATTC	37 °C	Thermo Scientific
<i>Kpn</i> I	GGTAC↓C	37 °C	Thermo Scientific

* ↓: Schnittstelle innerhalb der Erkennungssequenz.

5.9 Bakterienstämme und Zelllinien

Tab. 11: *E. coli*-Stämme.

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> DH5α	F-Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96</i> <i>deoR nupG hsdR17</i> (rK ⁻ mK ⁺), λ ⁻	Hanahan et al. (1991)
<i>E. coli</i> One Shot TOP10	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ(<i>araleu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Thermo Scientific, Karlsruhe (D)
<i>E. coli</i> One Shot BL21-AI (<i>arabinose-</i> <i>induced</i>)	F- <i>ompT hsdSB</i> (rB ⁻ mB ⁻) <i>gal dcm</i> <i>araB::T7RNAP-tetA</i>	Thermo Scientific, Karlsruhe (D)

Tab. 12: *Borrelia burgdorferi*-Stämme.

Stamm	Kurzbeschreibung	Referenz
B31	B31 ATCC 35210	Johnson et al. (1984)
GBC726	5A4 NP1 (kan ^R) + pTM61 (GFP, gen ^R), clone 2	Moriarty et al. (2008)

5.10 Antikörper

Tab. 13: Primäre Antikörper. Verd. WB: Verdünnung in immunochemischer Färbung nach Western Blotting, Verd. IF: Verdünnung in Immunfluoreszenz.

Antikörper	Spezies	Klonalität	Verd. WB	Verd. IF	Hersteller
anti-SNX3	Ziege	polyklonal	-	1:100	Santa Cruz
anti-SNX3	Kaninchen	polyklonal	1:200	-	Proteintech
anti-SNX1	Maus	monoklonal	1:1000	1:100	BD Biosciences
anti-Gal9	Kaninchen	polyklonal	1:500	1:200	Proteintech
anti- <i>Borrelia burgdorferi</i>	Kaninchen	polyklonal	1:1000	1:1000	Antibodies online
anti- <i>Borrelia burgdorferi</i>	Maus	monoklonal	1:1000	1:1000	Novus Biologicals
anti-GFP	Kaninchen	polyklonal	1:5000	-	Novus Biologicals
anti-pan-Aktin	Maus	monoklonal	1:5000	-	Merck Millipore

Tab. 14: Sekundäre Antikörper und Farbstoffe. WB: Verdünnung in immunochemischer Färbung nach Western Blotting, IF: Verdünnung in Immunfluoreszenz. AF: AlexaFluor-Fluorophore mit Wellenlänge in nm.

Antikörper	Spezies	Klonalität	Verd. WB	Verd. IF	Hersteller
anti-Maus-HRP	Schaf	polyklonal	1:5000	-	GE Healthcare
anti-Kaninchen-HRP	Esel	polyklonal	1:10000	-	GE Healthcare
anti-Ziege-HRP	Kaninchen	polyklonal	1:5000	-	abcam
anti-Maus-AF488/568/647	Esel oder Ziege	polyklonal	-	1:200	Thermo Scientific
anti-Kaninchen-AF488/568/647	Esel oder Ziege	polyklonal	-	1:200	Thermo Scientific
anti-Ziege-AF488/568/647	Esel	monoklonal	-	1:200	Thermo Scientific
Phalloidin AF488/568/647	-	-	-	1:50	Thermo Scientific
Hoechst 33342 oder DAPI	-	-	-	1:1000	Thermo Scientific

5.11 Oligonukleotide

Tab. 15: DNA-Oligonukleotidsequenzen.

Nr.	Bezeichnung	Sequenz (5'→ 3')
P01	SNX3_fw	AAAAAAGGTACCCCGGGAGACCGTGGCTGACACCC
P02	SNX3_ΔC_rev	TTTTTTGGATCCTCAATCTATTATTTTCATCTTGTA AAAAAC
P03	SNX3_N+α_rev	TTTTTTTTTGGATCCTCAGCTGGGGGGTCCGTAGG
P04	SNX3_ΔN_fw	AAAAAAGGTACCCCAACCTGAATGACGCCTACGGACCC
P05	SNX3_rev	TTTTTTGGATCCTCAGGCATGTCTTATTTTAGATGG
P06	SNX3_PX+C_fw	AAAAAAGGTACCCCAACTTCCTCGAGATCGATGTGAGC
P07	SNX3_C_fw	AAAAAAGGTACCCCAAAGCTATACTCCATCT
P08	SNX3_C_rev	TTTTTTGGATCCTCAGGCATGTCTTATTTT
P09	Gal9_fw	AAAAAACTCGAGCCGCTTCAGCGGTTCCCAGGCTCCCTAC
P10	Gal9_rev	TTTTTTGGTACCTCATGTCTGCACATGGGTCAGCTGGATGT
P11	SNX3_PX_fw	GAAAGAATCTACTGTTAGAAGAAGAGCCAGTGACTTTG
P12	SNX3_PX_rev	CAAAGTCACTGGCTCTTCTTCTAACAGTAGATTCTTTC
P13	SNX3_si-insens_fw	GAAAGCGTTTTTGGCGCAGCTTCCATTCAGAGGAGATG
P14	SNX3_si-insens_rev	CATCTCCTCTGAATGGAAGCTGCCGCAAAAACGCTTTC
P15	SNX3_GST_fw	AAAAAAGGATCCGCGGAGACCGTGGCTGACACCC
P16	SNX3_GST_rev	AAAAAAGAATTCTCAGGCATGTCTTATTTTAGATGG
P17	KIF5A_stop_fw	CGGCATGGACGAGCTGTACAAGTGATCCATGAATGGAGC
P18	KIF5A_stop_rev	GCTCCATTCATGGATCACTTGTACAGCTCGTCCATGCCG
P19	Gal9_CRD1_fw	AAAAAACTCGAGCCTTTTCTGGGACTATTCAAGGAGG
P20	Gal9_CRD1_rev	TTTTTTGGTACCTCAGAAGCTGATGTAGGACAGCTGC
P21	Gal9_linker_fw	AAAAAACTCGAGCCAGAACCCCGCACAG
P22	Gal9_linker_rev	TTTTTTGGTACCTCAAGGCATCGGATAGGCGGG
P23	Gal9_si-insens_fw	CAGGACGGACTACAAATAACAGTCAATGGGACC
P24	Gal9_si-insens_rev	GGTCCCATTGACTGTTATTTGTAGTCCGTCCTG
P25	Gal9_A46V_fw	GGAACCAGGTTTGTGTGAACTTTCAGACTGG
P26	Gal9_A46V_rev	AAAGTTCACAACAAACCTGGTTCCACTGGCAGC
P27	Gal9_N137A_fw	ATCTCCGTCGCTGGCTCTGTGCAGCTGTCTTA
P28	Gal9_N137A_rev	TGCACAGAGCCAGCGACGGAGATGGTGTCCAC
P29	Gal9_R252A_fw	CAGTGCTCAGGCGTTCCACATCAACCTGTGCT
P30	Gal9_R252A_rev	TTGATGTGGAACGCCTGAGCACTGGGCAGGAC

Tab. 16: SiRNA-Oligonukleotidsequenzen.

Nr.	Bezeichnung	Sequenz (5'→ 3')
R01	SNX3 #1	GCGUCAGCUUCCUUUUAGA-(dTdT)
R02	SNX3 #2	CUCAUAUGCUCAGUUUUUGU-(dTdT)
R03	SNX1 #1	AAGAACAAGACCAAGAGCCAC-(dTdT)
R04	SNX1 #2	GAACAAGACCAAGAGCCAC-(dTdT)
R05	Gal9 #1	GGACUUCAGAUCACUGU-(dTdT)
R06	Gal9 #2	GGAAGACACACAUGCCUUUCC-(dTdT)

5.12 Plasmide

Tab. 17: In dieser Arbeit verwendete Plasmide.

Plasmid	Resistenz	Referenz
GFP-SNX3	Kanamycin	Braun et al. (2010)
RFP-SNX3	Kanamycin	Pons et al. (2008)
Rab5a-RFP	Kanamycin	von S. Grinstein erhalten
SNX1-GFP	Kanamycin	von S. Grinstein erhalten
SNX4-GFP	Kanamycin	von L. Binkle erhalten
GFP-SNX8	Kanamycin	Dyve et al. (2009)
mCherry-SNX9	Ampicillin	Posor et al. (2013)
GFP-SNX12	Kanamycin	Pons et al. (2012)
SNX17-GFP	Kanamycin	Bottcher et al. (2012)
SNX27-GFP	Kanamycin	Tseng et al. (2014)
SNX31-GFP	Kanamycin	Tseng et al. (2014)
PX-p40phox-GFP	Kanamycin	addgene #19010, von M. Yaffe
GFP-PHD-Ing2x3	Kanamycin	addgene #21589, von J. Yuan
MLNx2-GFP	Kanamycin	Hammond and Balla (2015)
GFP-P4M-SidM	Kanamycin	Hammond et al. (2014)
TAPP1-PH-GFP	Kanamycin	Kimber et al. (2002)
PH-PLC δ 1-GFP	Kanamycin	Varnai and Balla (1998)
PH-AKT-GFP	Kanamycin	Sason et al. (2009)
EGFP-C1	Kanamycin	Clontech, Mountain View (USA)
EGFP-C2	Kanamycin	Clontech, Mountain View (USA)
pGEX-2T	Ampicillin	GE Healthcare, München (D)
GFP-SNX3 siRNA-insensitiv	Kanamycin	diese Arbeit
GFP-SNX3-Y71A	Kanamycin	diese Arbeit
GFP-SNX3-Y71A siRNA-insensitiv	Kanamycin	diese Arbeit
GST-SNX3	Ampicillin	diese Arbeit
GST-SNX3-Y71A	Ampicillin	diese Arbeit
GFP-SNX3- Δ N	Kanamycin	diese Arbeit
GFP-SNX3-PX+C	Kanamycin	diese Arbeit
GFP-SNX3-N+ α	Kanamycin	diese Arbeit
GFP-SNX3- Δ C	Kanamycin	diese Arbeit
GFP-SNX3-C	Kanamycin	diese Arbeit
GFP-SNX3- Δ N siRNA-insensitiv	Kanamycin	diese Arbeit
GFP-SNX3-PX+C siRNA-insensitiv	Kanamycin	diese Arbeit
GFP-SNX3- Δ C siRNA-insensitiv	Kanamycin	diese Arbeit
TurboGFP-Galectin-9	Ampicillin	OriGene, Herford (D)
GFP-Gal9	Kanamycin	diese Arbeit

KIF5A-GFP-CIBN	Kanamycin	addgene #102252, von B. Cui
KIF5A-GFP	Kanamycin	diese Arbeit
GFP-Myo1e	Kanamycin	Ouderkirk and Krendel (2014)
GFP-Rab35	Ampicillin	Klinkert and Echard (2016)
GFP-Gal9- Δ CRD2	Kanamycin	diese Arbeit
GFP-Gal9- Δ N	Kanamycin	diese Arbeit
GFP-Gal9-linker+CRD2	Kanamycin	diese Arbeit
GFP-Gal9-N+CRD1	Kanamycin	diese Arbeit
GFP-Gal9-CRD1+linker	Kanamycin	diese Arbeit
GFP-Gal9- Δ CRD2 siRNA-insensitiv	Kanamycin	diese Arbeit
GFP-Gal9- Δ N siRNA-insensitiv	Kanamycin	diese Arbeit
GFP-Gal9-N+CRD1 siRNA-insensitiv	Kanamycin	diese Arbeit
GFP-Gal9-CRD1+linker siRNA-insensitiv	Kanamycin	diese Arbeit
GFP-Gal9-A46V siRNA-insensitiv	Kanamycin	diese Arbeit
GFP-Gal9-N137A siRNA-insensitiv	Kanamycin	diese Arbeit
GFP-Gal9-R252A siRNA-insensitiv	Kanamycin	diese Arbeit
GFP-Gal9-A46V+N173A siRNA-insensitiv	Kanamycin	diese Arbeit
flotillin-1-mCherry	Kanamycin	Baumann et al. (2012)
flotillin-2-mCherry	Kanamycin	Baumann et al. (2012)
GFP-Rab6a	Kanamycin	Rzomp et al. (2003)
GFP-Rab8a	Kanamycin	Henry and Sheff (2008)
GFP-Rab10	Kanamycin	Schuck et al. (2007)
GFP-Rab18	Kanamycin	addgene #49550, von M. Scidmore
GFP-Rab21a	Kanamycin	Simpson et al. (2004)
GFP-SNAP23	Kanamycin	Williams et al. (2014)

Die paarweise Verwendung bestimmter Oligonukleotide zu allen in dieser Arbeit erstellten Konstrukte werden nachfolgend in Kap. 6.2.9 in Tab. 21 dargestellt.

6. Methoden

6.1 Mikrobiologische Methoden

6.1.1 Vorbereiten von Geräten und Lösungen

Hitzestabile Geräte und Lösungen wurden für 20 min bei 121 °C und einem Druck von 2 bar autoklaviert. Hitzelabile Lösungen wurden als Konzentrate hergestellt und mit Hilfe eines Membranfilters mit einer Porengröße von 0,2 µm steril filtriert.

6.1.2 Anzucht und Lagerung von *Escherichia coli*

Die verwendeten *E. coli*-Stämme (Tab. 11) wurden in LB-Flüssigmedium oder auf LB-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotikazusätzen zur Selektion bei 37 °C kultiviert. Die Aufbewahrung der Stämme auf den Nährböden erfolgte bei 4 °C. Zur langfristigen Lagerung wurden die Stämme als Glycerinkulturen bei -20 °C und -80 °C gelagert.

LB-Flüssigmedium	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, pH 7.2, ad 1 l H ₂ O
LB-Agar	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, 16 g Agar-Agar, pH 7.2, ad 1 l H ₂ O

6.1.3 Transformation kompetenter Bakterien

Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* DH5α-Zellen erfolgte zuvor wie in Hanahan et al. (1991) beschrieben. *E. coli* BL21 AI- und *E. coli* TOP10-Zellen wurden vom in Tab. 11 angegebenen Hersteller bezogen. Zur Transformation der jeweiligen Stämme wurde von diesen 50 µl mit 50-100 ng Plasmid-DNA versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 60 s bei 42 °C und eine anschließende fünfminütige Inkubation auf Eis. Zu dem Ansatz wurden 250 µl auf 37 °C vorgewärmtes SOC-Flüssigmedium (ohne Antibiotikazusatz) gegeben und 1 h bei 800 rpm und 37 °C im Thermoschüttler inkubiert. Abschließend wurden die Zellen bei 3000g und RT für 2 min sedimentiert, auf LB-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotikazusätzen ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

SOC-Medium	0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 2 % (w/v) Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM Glukose, pH 6.8
------------	---

6.2 Molekularbiologische Methoden

6.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA (Mini-Prep)

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen wurden für eine Mini-Präparation das ZR Plasmid Miniprep-Classic Kit und für eine Maxi-Präparation das EndoFree Plasmid Maxi Kit verwendet. Beide Präparationen unterscheiden sich in der Reinigung verschieden großer Kulturvolumina und damit auch in der Ausbeute an Plasmid-DNA bezogen auf Zielkonzentration und -volumina. Für die Isolierung wurden 4 ml (Mini) bzw. 100 ml (Maxi) LB-Medium mit entsprechenden Antibiotikazusätzen mit Zellen einer Kolonie angeimpft und schüttelnd über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach 14-16 h wurden die Kulturen bei 4 °C und 4.000 g für 10 min zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden gemäß Herstelleranleitung resuspendiert, lysiert und die Plasmid-DNA über Säulen gereinigt. Die abschließende Elution erfolgte schließlich mit 20 µl (Mini) und 200-300 µl (Maxi) sterilem ddH₂O.

6.2.2 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wird zur *in vitro* Amplifikation von DNA-Sequenzen genutzt (Mullis et al., 1986). Die Durchführung der PCR erfolgte in 250 µl Reaktionsgefäßen. Nach Beendigung der Reaktionsabfolge (Tab. 19) wurden die Ansätze entweder bei 4 °C gelagert oder anschließend direkt mittels Agarosegelelektrophorese untersucht. Die PCR-Ansätze wurden wie folgt zusammengesetzt:

Tab. 18: Übersicht PCR-Reaktionsansatz.

Zutaten	Menge
DNA-Matrize	50 – 100 ng
<i>forward</i> Primer (10 mM)	1 µl
<i>reverse</i> Primer (10 mM)	1 µl
10x PCR-Puffer	5 µl
Desoxynukleotide 40 mM (je 10 mM)	1 µl
Phusion-Polymerase (2 U/µl)	0,5 µl
ddH ₂ O	ad 50 µl

Tab. 19: Reaktionsabfolge der PCR.

Schritt	Zyklen	Zeit	Temperatur
initiale Denaturierung	1	5:00 min	95 °C
Denaturierung		0:30 min	95 °C
Annealing	30	0:45 min	50-65 °C **
Elongation		1 min/kbp*	72 °C
finale Elongation	1	5 min	72 °C

* 1 min je 1000 bp des zu erwarteten DNA-Amplifikationsproduktes

** 5 °C unter mittlerer Schmelztemperatur (T_M) des hybridisierenden Bereiches des jeweiligen DNA-Oligonukleotids

6.2.3 Restriktion von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die partielle Hydrolyse von Plasmid-DNA mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen erfolgte gemäß den vom Hersteller der Enzyme empfohlenen Puffer- und Temperaturbedingungen. Je 1 µg DNA wurde mit 1 U Restriktionsenzym sowie dem entsprechenden Restriktionspuffer versetzt und jeweils immer für 30 min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss an den Verdau wurden die geschnittenen DNA-Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt.

6.2.4 DNA-Agarosegelelektrophorese

Zur gelelektrophoretischen Trennung von DNA-Fragmenten wurden die zu analysierenden Proben mit 6-fachen DNA-Ladepuffer versetzt und in die Probentaschen eines 1% (w/v) Agarosegels pipettiert. Die Agarose wurde zuvor in 1-fachem Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) durch Aufkochen gelöst. Nach Abkühlen auf ca. 40°C wurde SybrSafe in einer Endkonzentration von 0,1 µg/ml zugegeben, die flüssige Agarose in eine horizontalen Gelkammer gegeben, ein Kamm eingesetzt und das Gel abgekühlt. Die Auftrennung der DNA Fragmente erfolgte bei einer angelegten Spannung von konstanten 100 V über einen Zeitraum von ca. 30-40 min in TAE-Puffer. Im Anschluss an die Elektrophorese erfolgte die Visualisierung der Banden mit Hilfe des interkalierenden SybrSafe-Farbstoffes unter UV-Licht, die elektronische Erfassung der Gele über die Geldokumentation sowie ein Ausschneiden der gewünschten Fragmente mittels eines sterilen Skalpell zur weiteren Reinigung.

DNA-Ladepuffer (6x)	10 mM Tris-HCl pH 7.6, 0,03 % (w/v) Bromphenolblau, 0,03 % (w/v) Xylencyanol, 60 % (v/v) Glycerol, 60 mM EDTA
TAE-Puffer (1x)	40 mM Tris-HCl pH 8.4, 20 mM Acetat, 1 mM EDTA

6.2.5 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolierung der gewünschten DNA-Fragmente aus dem Agarosegel wurde das QIAquick Spin Gel Extraction Kit verwendet. Zunächst wurden die gewünschten DNA-Fragmente mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die entfernten Gelstücke wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, gewogen und mit 3 Gelvolumen QG-Puffer versetzt. Dabei entsprachen 100 µg Gel 100 µl Puffer. Die Isolation und Reinigung der DNA aus Agarosegelen erfolgte gemäß Herstelleranleitung. Die abschließende Elution erfolgte mit 20 µl sterilem ddH₂O.

6.2.6 Quantifizierung von isolierter DNA und PCR-Amplifikaten

Die Konzentrationsbestimmung von DNA nach Isolierung oder von PCR-Amplifikaten erfolgte photometrisch mittels NanoDrop bei einer Wellenlänge von 260 nm. Eine Extinktion von 1 entspricht dabei einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml einzelsträngiger DNA oder RNA. Das Verhältnis der Extinktionen OD_{260} zu OD_{280} , welches ein Maß für die Reinheit der isolierten DNA darstellt, sollte bei 1,8-2,0 liegen.

6.2.7 Dephosphorylierung von partiell hydrolysierter DNA

Um eine Religation des verwendeten Vektors zu verhindern, wurden die 5'-Enden der linearisierten Vektor-DNA mit 1 µl alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Die Reaktion und Hitzeinaktivierung wurde nach Angaben des Herstellers in einem Gesamtvolumen von 10 µl durchgeführt.

6.2.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation der DNA-Fragmente zu einem zirkulären Plasmid mit gewünschtem *insert* erfolgte mit Hilfe von T4-DNA-Ligase. Die partialhydrolysierte und isolierte *insert*-DNA sowie Vektor-DNA wurden mit T4-DNA-Ligase in Ligasepuffer vermischt und entweder bei RT für 2 h oder bei 16 °C über Nacht inkubiert. Als Religationskontrolle wurde ein Ansatz wie oben beschrieben, jedoch ohne *insert*-DNA, verwendet. Der Ligationsansatz wurde wie folgt zusammengesetzt:

Tab. 20: Übersicht Ligationsansatz.

Menge	Zutaten
100 ng	dephosphorylierter Vektor
3 bis 5-facher Überschuss	<i>insert</i>
2 µl	10x Reaktionspuffer
1 µl	T4-DNA-Ligase
ad 20 µl	ddH ₂ O

6.2.9 Klonierungsübersicht von in dieser Arbeit konstruierten Plasmide

Tab. 21: Oligonukleotid-Paarungen und DNA-Matrizen für Plasmidkonstruktion.

Konstrukt	verwendete Oligonukleotide	DNA-Matrize
GFP-SNX3- Δ C	P01+P02	GFP-SNX3
GFP-SNX3-N+ α	P01+P03	GFP-SNX3
GFP-SNX3- Δ N	P04+P05	GFP-SNX3
GFP-SNX3-PX+C	P05+P06	GFP-SNX3
GFP-SNX3-C	P07+P08	GFP-SNX3
GFP-SNX3-Y71A	P11+P12	GFP-SNX3
GFP-SNX3 siRNA-insensitiv	P13+P14	GFP-SNX3
GFP-SNX3-Y71A siRNA-insensitiv	P13+P14	GFP-SNX3-Y71A
GST-SNX3	P15+P16	GFP-SNX3
GST-SNX3-Y71A	P15+P16	GFP-SNX3-Y71A
GFP-Gal9	P09+P10	TurboGFP-Galectin9
GFP-Gal9- Δ CRD2	P09+P22	GFP-Gal9
GFP-Gal9- Δ N	P19+P10	GFP-Gal9
GFP-Gal9-linker+CRD2	P21+P10	GFP-Gal9
GFP-Gal9-N+CRD1	P09+P20	GFP-Gal9
GFP-Gal9-CRD1+linker	P19+P22	GFP-Gal9
GFP-Gal9 siRNA-insensitiv	P23+P24	GFP-Gal9
GFP-Gal9- Δ CRD2 siRNA-insensitiv	P23+P24	GFP-Gal9- Δ CRD2
GFP-Gal9- Δ N siRNA-insensitiv	P23+P24	GFP-Gal9- Δ N
GFP-Gal9-N+CRD1 siRNA-insensitiv	P23+P24	GFP-Gal9-N+CRD1
GFP-Gal9-CRD1+linker siRNA-insensitiv	P23+P24	GFP-Gal9- CRD1+linker
GFP-Gal9-A46V siRNA-insensitiv	P25+P26	GFP-Gal9 siRNA- insensitiv
GFP-Gal9-N137A siRNA-insensitiv	P27+P28	GFP-Gal9 siRNA- insensitiv
GFP-Gal9-R252A siRNA-insensitiv	P29+P30	GFP-Gal9 siRNA- insensitiv
GFP-Gal9-A46V+N137A siRNA-insensitiv	P27+P28	GFP-Gal9-A46V siRNA-insensitiv

6.3 Zellkulturtechnische Methoden

6.3.1 Isolierung und Kultivierung primärer, humaner Monozyten

Primäre, humane Monozyten wurden aus so genannten *buffy coats* isoliert, welche ein Nebenprodukt der Aufarbeitung einer Vollblutspende sind. Diese beinhalten größtenteils Leukozyten und Thrombozyten und stellen weniger als 1 % des Anteils am gesamten Vollblut dar. Die Hauptmethode bei dieser Präparation stellt einerseits die Saccharosedichtegradientenzentrifugation (SDGZ) mit Hilfe von Ficoll und Natriumdiatrizoat dar. Diese beiden Bestandteile ergeben das Lymphozyten-separationsmedium (LSM). Darüber hinaus erfolgt die Bindung und eigentliche Isolierung von CD14-positiven Monozyten aus dem *buffy coat* mit Hilfe von mit magnetischen Kügelchen (*beads*) gekoppelten Anti-CD14-Antikörpern und einem Magneten.

Zirka 16 h vor der Präparation wurden die frisch gewonnenen *buffy coats* auf einem Schüttler über Nacht bei 4 °C inkubiert. Zu Beginn der Isolierung erfolgte das vorsichtige Überdecken von je 15 ml LSM mit je zirka 20 ml *buffy coat* in einem 50 ml Reaktionsgefäß. Da ein *buffy coat* eines Spenders zumeist zirka 60 ml beinhaltete wurden pro Spender drei 50 ml Reaktionsgefäße für die SDGZ vorbereitet. Die vorbereiteten Röhrchen rotierten für 30 min bei 460 g und 4°C (ohne starke Beschleunigung und Bremse der Zentrifuge). Nach Abschluss der Zentrifugation wurde die milchig-weiße Interphase abgenommen und in je ein mit 10 ml kaltem RPMI-Medium gefülltem 50 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit kaltem RPMI auf 50 ml aufgefüllt. Im Folgenden wurden die Zellen durch erneutes Zentrifugieren bei 460 g und 4°C für 10 min und Waschen mit RPMI sukzessive in einem Reaktionsgefäß vereint. Nach einem abschließenden Zentrifugationsschritt (460 g, 4 °C, 10 min) wurde der Überstand verworfen und die sedimentierten Zellen in 1,5 ml kalten Monozytenpuffer resuspendiert. Zu dieser Suspension erfolgte die Zugabe von 250 µl magnetischen CD14-*beads* und eine 15-minütige Inkubation auf Eis. Währenddessen wurden je Spender eine Säule in einem Magnetständer fixiert, mit einem Vorfilter versehen und mit 1 ml Monozytenpuffer äquilibriert. Die nun mit den magnetischen *beads* gekoppelten CD14⁺-Monozyten wurden auf die Säule pipettiert, anschließend zweimal mit Monozytenpuffer gewaschen und schließlich mit weiteren 3 ml Monozytenpuffer und durch Entnahme der Säule aus dem Magnetständer in 20 ml

kaltem RPMI eluiert. Die Zellzahl der isolierten Monozyten wurde mit Hilfe einer Neubauerzählkammer bestimmt und schlussendlich $2 \cdot 10^6$ Zellen in 1 ml RPMI pro Kavität einer 6-Loch-Zellkulturplatte ausgesät. Nach 2-4 h, nachdem die Monozyten adhärent waren, wurde das RPMI-Medium entfernt und durch 1,5 ml Monozytenmedium ersetzt. Ein weiterer Medienwechsel erfolgte ebenfalls wieder mit Monozytenmedium nach 24 h. Während der nächsten 6-7 Tage erfolgte abschließend die Differenzierung zu primären, humanen Makrophagen durch im Medium befindliche Wachstumsfaktoren und Zytokine. Die Kultivierung der Monozyten bzw. Makrophagen erfolgte zu jeder Zeit und bei allen Folgeexperimenten im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit.

Monozytenpuffer

DPBS pH 7.4, 2 mM EDTA,

0.5 % (w/v) humanes Serumalbumin

6.3.2 Ablösen von adhärennten Makrophagen

Zur Subkultivierung oder Transfektion mit Plasmid-DNA der zuvor isolierten primären, humanen Makrophagen wurden diese von der Zellkulturplatte abgelöst. Hierfür wurde das Kulturmedium entfernt, die Zellen mit sterilem DPBS gewaschen und anschließend 500 µl Accutase pro Kavität hinzugegeben und für 20 min im Brutschrank inkubiert. Danach wurden 500 µl Monozytenmedium zugegeben und die Zellen durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren abgelöst und in einem 15 ml Reaktionsgefäß gesammelt. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 460 g und RT für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die sedimentierten Zellen in 5 ml sterilem DPBS resuspendiert. Die Zellkonzentration wurde mit Hilfe einer Neubauerzählkammer bestimmt und die benötigte Menge an Zellen für Folgeexperimente erneut zentrifugiert (460 g, RT, 5 min).

6.3.3 Transiente Transfektion von primären Makrophagen mit Plasmid-DNA

Die Transfektion ausdifferenzierter Makrophagen mit Plasmid-DNA erfolgte 6-8 Tage nach Präparation mit Hilfe des Neon Elektroporationssystems (Invitrogen). Transfizierte Makrophagen wurden entweder auf Deckgläschen mit 12 mm bzw. 18 mm Durchmesser oder in Zellkulturschalen mit Glasboden (12 mm bzw. 22 mm Durchmesser) ausgesät. Grundsätzlich erfolgte die Transfektion von 100.000 Zellen mit 0,5 µg hochreiner Plasmid-DNA, mit Ausnahme der Konstrukte RFP-SNX3, RFP-Rab5a, mCherry-SNX9 und Flotillin-2-mCherry da hierbei die Transfektionseffizienz durch Einsatz der doppelten Konzentration um ein Vielfaches höher gewesen ist (1 µg/100.000 Zellen).

Die zuvor abgelösten Zellen wurden sedimentiert und 100.000 Zellen in 12 µl R-Puffer resuspendiert sowie nachfolgend in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 0,5 µg DNA vermischt. Zusätzlich wurde eine mit 3 ml E2-Puffer gefüllte Transfektionsküvette in das Transfektionssystem eingesetzt. Die Aufnahme der Zell-DNA-Suspension erfolgte luftblasenfrei in 10 µl Transfektionsspitzen und diese wurde in die Küvette eingesetzt. Der anschließende Elektroimpuls erfolgte zweimal für 40 ms bei 1.000 V. Hierbei wird die Zellmembran permeabel, sodass eine Aufnahme der zuvor mit der Zellmembran assoziierten Plasmid-DNA sehr wahrscheinlich ist. Die transfizierten Zellen wurden anschließend sofort in 100 µl auf 37 °C vorgewärmtes Monozytenmedium gegeben und auf 12 mm Deckgläschen ausgesät. Nach 1 h wurden weiter 900 µl Medium dazugegeben. Für die Transfektion und Subkultivierung von Makrophagen auf Glasböden mit 18 mm und 22 mm Durchmesser wurden Zellzahl, Plasmidmenge, R-Puffer und Monozytenmedium verdoppelt.

6.3.4 Transfektion von primären Makrophagen mit siRNA (RNA-Interferenz)

Zur fast vollständigen Depletierung (Knockdown) bestimmter Zielproteine nutzt man die Methode der RNA-Interferenz, bei welcher mit Hilfe doppelsträngiger RNA (*small interfering* RNA, kurz: siRNA) die transkribierte mRNA vor der Translation abgebaut wird (Fire et al., 1998). Für die Transfektion von Makrophagen mit siRNA wurde Viromer Blue nach Herstellerangaben verwendet. Am Tag der Transfektion wurde das

Kulturmedium entfernt und die adhärennten Makrophagen mit DPBS gewaschen. Es erfolgte anschließend die Zugabe von 2 ml Monozytenmedium sowie die Zugabe des Viromer-siRNA-Gemisches mit siRNA in einer finalen Konzentration von 100 nM, welches zuvor für 15 min zusammen bei RT inkubierte. Die Transfektion mit SNX1- und SNX3-spezifischer siRNA erfolgte am Tag 0 einmal, dagegen wurden für die Depletion von Galectin-9 nach 48 h erneut 100 nM siRNA transfiziert. Alle Zellen wurden 72-76 h nach der ersten Transfektion gesichtet und für weiterführende Experimente subkultiviert.

6.3.5 Versuch zur Bestimmung der Kompaktierungsrate

Mit Hilfe dieser Versuchsart wurden Effekte bzw. Einflüsse von Zielproteinen und Phospholipiden auf die Kompaktierung von Borrelien untersucht, die durch Transfektion von Makrophagen mit Plasmid-DNA, siRNA oder Behandlung mit Inhibitoren hervorgerufen worden. Hierfür wurden behandelte Makrophagen auf 12 mm Deckgläschen subkultiviert, mit Borrelien infiziert (MOI 100:1) und mittels Immunfluoreszenzfärbung bestimmte Proteine und Kompartimente der Zelle gefärbt. Die Analyse erfolgte mittels Aufnahmen am konfokalen Laserscanningmikroskop Leica SP5 oder SP8 X (63x Immersionsöl-Objektiv). Es wurden pro Versuch drei oder vier Spender mit je 15 bis 30 Zellen analysiert, wobei in kompaktierte und gestreckte Borrelien unterschieden wurde.

6.3.6 DQ-BSA-Assay

Für den Test auf proteolytischer Aktivität mittels DQ-BSA-Substrat in Makrophagen nach SNX3- oder Gal9-Depletion wurden dreimal 200.000 mit SNX3- oder Gal9-spezifischer siRNA behandelte Zellen und dreimal 200.000 Zellen, mit Kontroll-siRNA transfiziert, auf 22 mm Zellkulturschalen subkultiviert und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend für eine Stunde mit 12,5 µg/ml Red DQ-BSA in Monozytenmedium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit DPBS gewaschen und mit GFP-exprimierenden Borrelien (MOI 100:1) in RPMI und 12,5 µg/ml Red DQ-BSA für 1 h infiziert. Danach wurden die Zellen erneut mit DPBS gewaschen und die

Zellen in frischen RPMI mit 12,5 µg/ml Red DQ-BSA supplementiert für eine weitere Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit DPBS gewaschen und mit 4 % Methanol-freien Formaldehyd für 10 min bei RT fixiert und in DPBS am *spinning disk*-Mikroskop (40x Immersionsöl-Objektiv) evaluiert. Es wurden insgesamt drei Spender mit je 30 Zellen analysiert und die Fluoreszenzintensität des DQ-BSAs an kompaktierten Borrelien gemessen. Die Aufnahmen erfolgten wie bei Lebendzellmikroskopien mittels VisiView Software, für die Auswertung wurde Volocity 6.1 verwendet. Die mittleren Intensitäten sowie Phagosomenvolumina wurden mit Hilfe des Plug-Ins „*finding, measuring and analysing*“ bestimmt. Zur Vergleichbarkeit wurden bei allen Messungen gleichbleibende Einstellungen verwendet:

5 % Laserintensität sowie 400 [-] Verstärkung (*gain*) für 488- und 561-Kanal; 200 ms Belichtungszeit für 488-Kanal und 150 ms für 561-Kanal. Der Abstand zwischen den konfokalen Ebenen betrug 0,3 µm.

6.3.7 Intrazellulärer Überlebens-Assay

Für den intrazellulären Überlebens-Assay wurden Makrophagen zu Beginn mit Kontroll- oder SNX3-spezifischer siRNA behandelt und mit Wildtyp-Borrelien mit einem MOI 100:1 im RPMI infiziert. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen 5-mal mit DPBS gewaschen und anschließend 2 ml warmes RPMI, welches 300 µg/ml Kanamycin und Gentamicin beinhaltet, auf die Zellen gegeben, um extrazelluläre Bakterien abzutöten. Die Ansätze wurden erneut für 1 h mit dem Antibiotika-haltigen Medium bei 37 °C inkubiert und anschließend 10-mal mit DPBS gewaschen. Im Anschluss wurden 400 µl DPBS auf die Proben pipettiert und anschließend zur Überprüfung auf extrazelluläres, bakterielles Wachstum in 3,6 ml BSK-H-Medium (BSK-II) mit 6 % Kaninchenserum übertragen. Anschließend wurden 400 µl DPBS auf die Zellen gegeben, mit Hilfe eines Zellschabers mechanisch lysiert und in 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 8 min bei 12.000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde erneut im Überstand resuspendiert und die Suspension in ein 15 ml Reaktionsgefäß mit 3,6 ml BSK-II-Medium überführt und unter mikroaerophilen

Bedingungen bei 33 °C und 1 % CO₂ kultiviert. Die Anzahl der Borrelien wurde von Tag 7 bis 10 nach Beginn der Kultivierung in einer Einweg-Neubauer-Zählkammer (C-Chip) mittels Dunkelfeldmikroskopie ermittelt.

6.3.8 Wortmannin-Assay

Zur Inhibition der PI3-Kinase (PI3K) wurden Makrophagen zunächst auf 12 mm Deckgläschen subkultiviert und anschließend für 1 h mit Monomedium, supplementiert mit 1 µM Wortmannin bzw. DMSO als Kontrolle, behandelt. Die Endkonzentration von DMSO in beiden Ansätzen betrug dabei 0,1 % (v/v). Im Anschluss daran wurden die Makrophagen mit dem GFP-SNX3-Konstrukt oder PI(3)P-Sensor p40phox-GFP transfiziert und anschließend mit Borrelien infiziert (MOI 100:1). Jeder Mediumswechsel beinhaltete frisches Mono- oder RPMI-Medium mit Wortmannin oder DMSO in o.g. Konzentration.

6.3.9 Herstellung von Zelllysaten

Die Lyse von Zellen über einen Lysepuffer ist, je nach Detergenzienkonzentration, eine schonende Aufschlussmethode. Die Zerstörung der Zellmembran erfolgte durch das im Puffer enthaltene Detergenz Triton X-100. Es wurde entweder das Zellpellet nach der Ernte in 1 ml Lysepuffer resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 14.000 g und 4 °C für 10 min abgetrennt.

Lysepuffer	50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1 % (v/v) Triton X-100, 1x Proteaseinhibitor
------------	---

6.4 Proteinbiochemische Methoden

6.4.1 SDS-PAGE

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli dient der Trennung von Proteinen ihrer Größe nach und eignet sich somit zur Analyse von Proteingemischen (Laemmli, 1970). Es wurden TGX FastCast SDS-Gele mit einer Acrylamid-Konzentration von 10 % (v/v) und 12 % (v/v) verwendet. Die Herstellung erfolgte nach Herstellerangaben in einer vertikalen Gelapparatur. Eine Übersicht über die Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel zeigt Tab. 22. Nach der vollständigen Polymerisation wurden die Gele entweder sofort verwendet oder bei 4 °C gelagert. Die elektrophoretische Trennung der Proteingemische erfolgte bei konstanten 200 V für 45 min.

Tab. 22: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel für die SDS-PAGE.

Zutaten	Trenngel	Sammelgel
Resolver A	3 ml	-
Resolver B	3 ml	-
Stacker A	-	1 ml
Stacker B	-	1 ml
TEMED	3 µl	2 µl
APS (10 % (w/v))	30 µl	10 µl

SDS-Laufpuffer (10x) 250 mM Tris-HCl pH 8.3, 1,92 M Glycin,
1 % SDS (w/v)

SDS-Ladepuffer (5x) 125 mM Tris-HCl pH 6.8, 4 % (w/v) SDS, 10 % (v/v)
Glycerin, 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol,
0.02% (w/v) Bromphenolblau

6.4.2 Coomassie Brillant-Blau-Färbung

Diese Methode dient der Anfärbung von Proteinbanden nach einer SDS-PAGE. Der eingesetzte Farbstoff Coomassie Brillant-Blau R-250 bindet dabei unspezifisch an die kationischen und nichtpolaren, hydrophoben Seitenketten der Proteine und macht sie somit als Banden sichtbar. Aufgrund der unspezifischen Anfärbung liefert die Coomassiefärbung sowohl ein quantitatives als auch qualitatives Ergebnis. Die Nachweisgrenze liegt bei etwa 200 ng Protein je Bande. Für die Färbung wurde das „NOVEX Colloidal Blue Staining“-Kit nach Herstellerangaben verwendet. Zur Färbung wurde das SDS-Polyacrylamidgel direkt nach der Elektrophorese in Coomassie-Färbelösung für 3-4 Stunden bei RT auf einem Schüttler gefärbt und über Nacht in Entfärbelösung teilweise entfärbt und fixiert.

6.4.3 Silberfärbung von SDS -Gelen

Die Silberfärbung wurde genau wie die Coomassie-Färbung zur Visualisierung von Proteinen im SDS-Polyacrylamidgel verwendet (Heukeshoven and Dernick, 1988). Die Nachweisgrenze liegt hierbei jedoch mit 5-30 ng je Bande deutlich niedriger. Somit ist diese Methode wesentlich sensitiver als die Coomassie-Färbung. Bei der Färbung werden dem Gel Ag^+ -Ionen zugeführt, die mit den Proteinseitenketten Glu, Asp und Cys komplexieren. Nach Zusatz von alkalischem Formaldehyd werden die Ag^+ -Ionen zu Ag^0 reduziert und fallen dabei als elementares Silber aus. Diese Art der Färbung wurde verwendet, um Proteinbanden in SDS-Gelen vor der Massenspektroskopie zu visualisieren. Hierfür wurde das „Pierce Silver Stain for Mass Spectrometry“-Kit von Thermo Fisher gemäß Herstelleranleitung verwendet und das gefärbte Gel im Anschluss an die Färbung in ddH_2O kurzzeitig gelagert.

6.4.4 Proteintransfer mittels Western Blotting

Diese Transfermethode dient der Fixierung von Proteinen auf einer Nitrocellulosemembran (NC) mit anschließender immunochemischer Färbung (Towbin et al., 1992). Proteine binden aufgrund von hydrophoben und

6.4.6 GST-Reinigung

Alle GST-Konstrukte (GST allein, GST-SNX3-WT und GST-SNX3-Y71A) wurden in L-Arabinose-induzierbaren *E. coli* BL21 als GST-Fusionsprotein exprimiert. Die GST-Fusionsproteine aus *E. coli*-Lysaten wurden durch Affinitätschromatographie unter Verwendung einer immobilisierten Glutathion-Sepharose 4B (GE Healthcare) gereinigt. Die resultierenden Eluate wurden gegen DPBS über Nacht dialysiert. Die erfolgreiche Expression wurde mittels SDS-PAGE, Western Blot sowie immunochemischer Färbung mit Anti-SNX3- und Anti-GST-spezifischen Antikörpern bestätigt. Die Reinheit wurde mit SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung bestimmt.

6.4.7 Proteinkonzentrationsbestimmungen nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford beruht auf der Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant-Blau G-250 an hydrophobe und kationische Seitenketten von Proteinen (Bradford, 1976). Das Absorptionsmaximum des Farbstoffs verschiebt sich dabei von 465 nm auf 595 nm und die Absorptionzunahme bei 595 nm wird anschließend photometrisch bestimmt. Dazu wurde das 5-fach konzentrierte Bradford-Reagenz 1:5 in ddH₂O verdünnt, 1 µl der zu untersuchenden Probe wurden mit 1 ml 1-fach-Reagenz versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen. Anhand einer zuvor angefertigten Kalibriergerade auf der Basis von BSA-Verdünnungen (0,1 – 1 mg/ml) ließ sich die Proteinkonzentration bestimmen. Lagen die Werte außerhalb des Bereichs, der durch die Kalibriergerade abgedeckt wurde, so erfolgte eine Verdünnung der Proben.

6.4.8 Bestimmung der Phosphatidylinositolspezifität von SNX3

Um die Spezifität der verwendeten SNX3-Konstrukte hinsichtlich ihrer Bindung an Phosphatidylinositolderivate zu überprüfen wurde ein kommerziell erhältliches Kit mit so genannten *PIP strips* (echelon Biosciences) verwendet. Hierbei sind jeweils 100 pmol von acht Phosphatidylinositolen und sieben weiteren biologisch wichtigen

Lipiden auf einer NC-Membran fixiert. Diese Membranen wurden zu Beginn mit 3 % BSA in PBS-T (0,1 % Tween-20) für 1 h bei RT geblockt und anschließend mit 1 µg/ml rekombinanten GST-SNX3wt und GST-SNX3-Y71A in gleichem Blockingpuffer ebenfalls für 1 h bei RT inkubiert. Die Detektion der gebundenen Proteine erfolgte mit GST- und SNX3-spezifischen Antikörpern und einem ECL-Substrat, analog zur immunochemischen Färbung und Entwicklung eines Western Blots.

6.5 Mikroskopie

6.5.1 Immunfluoreszenzfärbung

Die auf 12 mm oder 18 mm Deckgläschen adhärennten Makrophagen wurden mit 2-mal mit PBS gewaschen und die anschließend mit 3,7 %-igen Methanol-haltigen Formaldehyd für 10 min bei RT fixiert. Anschließend wurden die Deckgläschen erneut mit PBS gewaschen und mit 0,1 % Triton-X-100 (in PBS) für 10 min permeabilisiert. Es erfolgte ein weiterer Waschschrift mit PBS. Im Anschluss daran wurden die Deckgläschen für 30 Minuten mit 30 µl einer 5 %-igen (w/v) BSA-Blocklösung in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Blockierlösung wurde abgesaugt und 30 µl eines primären Antikörpers, welche in Blockierlösung verdünnt waren, auf die Zellen pipettiert und für 45-60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 2-mal mit PBS gewaschen und die Zellen mit 30 µl eines Lösung aus einem an einen Fluorophor gekoppelten sekundären Antikörpers (alle 1/200 in PBS) und Phalloidin (alle 1/50 in PBS) für 30-60 min abgedunkelt inkubiert. Der sekundäre Antikörper wurde nach Abschluss der Inkubationszeit durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Die fixierten Zellen wurden abschließend mit 6 µl Mowiol-Lösung auf einem Objektträger blasenfrei abgedeckt. Zum Aushärten des Mowiois fand die Lagerung über Nacht oder für mindestens 30 min bei RT abgedunkelt statt. Die Betrachtung der fixierten Präparate erfolgte im Anschluss mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops (CLSM).

Mowiol-Lösung	100 mM Tris-HCl pH 8.5, 10 % (w/v) Mowiol, 25 % (v/v) Glycerol, 2.5 % (w/v) Triethylendiamin
---------------	--

6.5.2 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Mit dem CLSM können Proteine bzw. Zellen, die mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, analysiert werden. Diese Methode ermöglicht es, gefärbte Proteine in einer definierten Schicht innerhalb einer Zelle zu detektieren. Das Licht eines Lasers wird über ein Objektiv auf einen Punkt in der zu untersuchenden Ebene der Probe fokussiert. Das von dort emittierte Licht wird auf eine als *pinhole* bezeichnete variable Lochblende fokussiert und dahinter von einem Detektor erfasst. Da der Fokuspunkt konfokal ist, kann nur Licht aus dem Fokuspunkt das *pinhole* passieren. Dabei wird das Präparat Zeile für Zeile gerastert, mit Licht einer spezifischen Wellenlänge angeregt und das detektierte, emittierte Licht an einen Computer übertragen. Die Aufnahmen fixierter Proben wurden mit Hilfe des Leica SP5 und SP8 X, Aufnahmen für Lebendzellmikroskopie erfolgte am Visitron *spinning disk*-Mikroskop. Tab. 23 zeigt die Ausstattung der Mikroskope hinsichtlich verwendeter Objektive, Laser und entsprechender Software.

Tab. 23: Übersicht über die Ausstattung der verwendeten konfokalen Mikroskope.

	Leica SP5	Leica SP8 X	Visitron SD-TIRF
Objektive			40x CFI Plan Fluor Oil NA: 1.30 WD (mm): 0.2
	63x HCX PL APO Lbd. Bl. Oil NA: 1.4-0.60 WD (mm): 0.1	63x HC PL APO Oil CS2 NA: 1.40 WD (mm): 0.14	60x Apo TIRF (corr.) Oil NA: 1.49 WD (mm): 0.13 (CS: 0.10- 0.22 @23 or 37°C)
			100x CFI Plan Apo Lambda NA: 1.45 WD (mm): 0.13
Laser	Diode: 405 Multi-Ar: 458/476/ 488/496/514 DPSS: 561 HeNe: 633 nm	White light laser, pulsed (WLL): 470-670 Diode: 405 Multi-Ar: 458/476/ 488/496/514 DPSS: 561 HeNe: 594 / 633 nm	Solid-state: 405/445/488/515/ 561/640 nm
Software	Leica LAS AF	Leica LAS X SP8	VisiView

7. Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde der Einfluss verschiedener Proteine auf die intrazelluläre Prozessierung von *Borrelia burgdorferi* in primären humanen Makrophagen untersucht. Insbesondere die Proteingruppe der Sorting Nexine (SNXe) stand hierbei im Fokus.

7.1 Sorting nexin-3 lokalisiert an Borrelien-haltigen Phagosomen

Zu Beginn erfolgte der Versuch der Identifizierung der potenziellen SNXe, welche einen Einfluss auf die Lokalisation an Borrelien-haltigen Phagosomen haben. Dazu wurden neun verschiedene Mitglieder der SNX-Familie gewählt, abhängig von ihren bereits beschriebenen Rollen wie Membranrecycling, Infektion oder Phagosomenreifung sowie ihrer Größe und Domänenzusammensetzung. Allen Vertretern gleich ist die PX-Domäne zur Bindung an Phosphatidylinositolen. Darüber hinaus sind BAR-, SH3-, PDZ- und FERM-Domänen charakteristisch für weitere Mitglieder der SNX-Gruppe (Abb. 8A). In einem ersten Versuch wurde die Lokalisation der jeweiligen fluoreszenzmarkierten, überexprimierten SNX-Konstrukte an Borrelien-haltigen Phagosomen in Makrophagen getestet. Primäre Makrophagen wurden mit dem entsprechenden Konstrukt transfiziert, anschließend mit *B. burgdorferi* infiziert und schließlich fixiert und immungefärbt. Die Auswertung erfolgte am konfokalen Laserscanningmikroskop. Auffallend war die hohe Akkumulation von GFP-SNX3 mit $73.3 \% \pm 10.1 \%$, ebenso wie GFP-SNX1, welches zu $48.3 \% \pm 4.4 \%$ an Phagosomen akkumulierte (Abb. 8B). Die GFP-Fusionskonstrukte von SNX4, SNX8, SNX17 und SNX31 zeigten Anreicherungen von 12-20 % während SNX9, SNX12 und SNX27 insgesamt 5 % oder weniger an Phagosomen akkumulierten (Abb. 8B). Zugehörige, repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen bestätigen die deutliche Anreicherung von SNX3 an Borrelien-haltigen Phagosomen (Abb. 8C-E). Eine entsprechende Übersicht über die übrigen acht Kandidaten in konfokalen Immunfluoreszenzaufnahmen bezüglich der Akkumulation an Phagosomen zeigt Abb. 9. Die eindeutige Anreicherung von SNX3 an internalisierten Borrelien war zudem nicht nur bei transient transfizierten Makrophagen zu erkennen. Die Immunfärbung

mit einem SNX3-spezifischen Antikörper zeigte darüber hinaus ebenfalls eindrucksvoll eine vergleichbare Akkumulation (Abb. 8F-H).

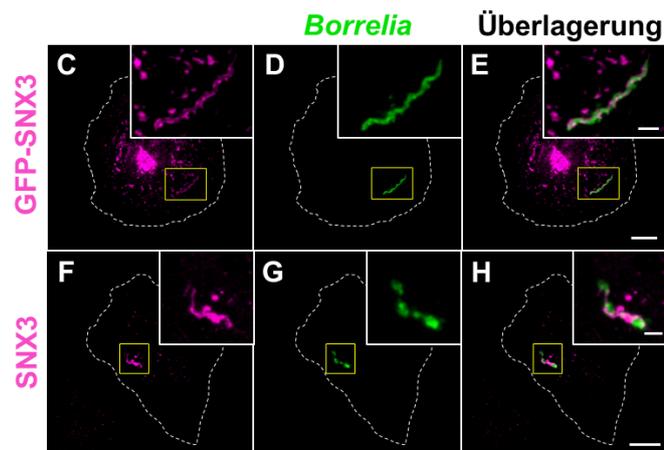
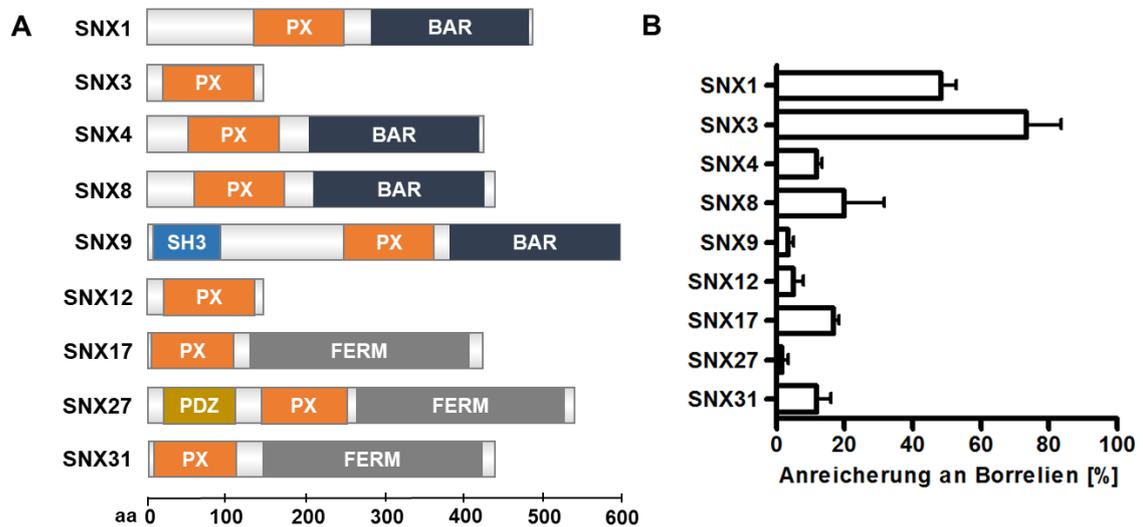


Abb. 8: Sorting Nexin-3 lokalisiert an internalisierten Borrelien. A: Übersicht über die Domänenstruktur der getesteten Sorting Nexine. BAR: BIN-, Amphiphysin-, Rvs167 Domäne; FERM: Protein 4.1-, Ezrin-, Radixin-, Moesin-Domäne; PX: phox homology-Domäne; SH3: Src homology 3-Domäne; PDZ: PSD95-, Dlg1-, ZO-1-Domäne. Die Größe der einzelnen Proteine ist auf der x-Achse in Aminosäuren (aa) dargestellt. B: Quantifizierung der Anreicherung der einzelnen Sorting Nexine an Borrelien-haltigen Phagosomen in primären Makrophagen (n=3x20). C-H: Immunfluoreszenzaufnahmen von mit Borrelien infizierten Makrophagen, die GFP-SNX3 überexprimieren (C-E) bzw. in welchen endogenes SNX3 mittels eines SNX3-spezifischen Antikörpers immunochemisch gefärbt wurde (F-H). Die Visualisierung der Borrelien erfolgte mittels eines Borrelien-spezifischen Antikörpers. Maßstabsbalken: 10 μ m, Vergrößerungen 1 μ m.

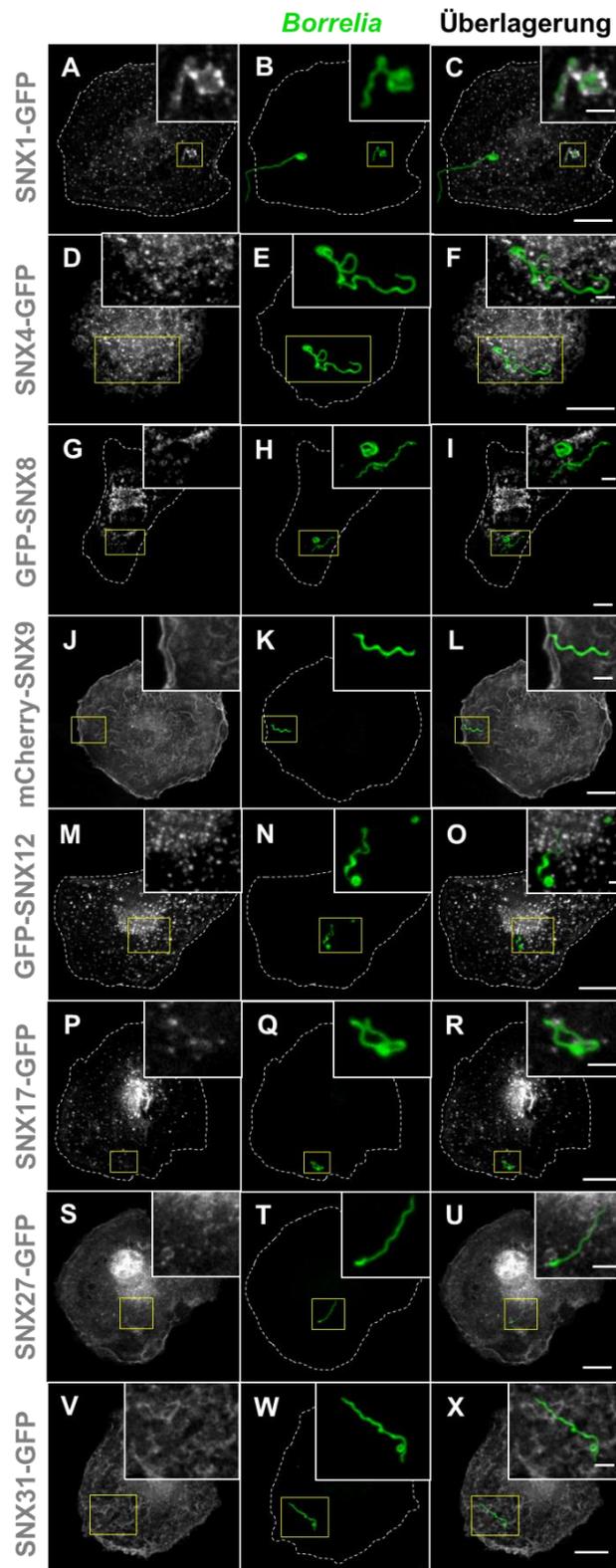


Abb. 9: Immunfluoreszenzaufnahmen zur Überprüfung der Lokalisation aller verwendeten Sorting nexin-Konstrukte, außer SNX3. Expression von GFP- und mCherry-fusionierten Sorting Nexin-Varianten in Makrophagen, infiziert mit Borrelien, welche mit spezifischen Antikörpern gefärbt wurden (B,E,H,K,N,Q,T,W). A: SNX1-GFP, D: SNX4-GFP, G: GFP-SNX8, J: mCherry-SNX9, M: GFP-SNX12, P: SNX17-GFP, S: SNX27-GFP, V: SNX31-GFP. Maßstabsbalken: 10 μ m, Vergrößerungen 1 μ m.

7.2 SNX3 reguliert die phagosomale Kompaktierung von Borrelien

Im vorangegangenen Screening-Versuch konnte gezeigt werden, dass SNX3 deutlich an Borrelien-haltigen Phagosomen lokalisiert. Darüber hinaus war auch eine Akkumulation von SNX1 an etwa der Hälfte der Borrelien-haltigen Phagosomen sichtbar (Abb. 8B, Abb. 9A-C). Daher wurde untersucht, ob SNX1 und SNX3 zusammen am Phagosom lokalisieren und welchen Einfluss ein Knockdown beider Proteine auf die Kompaktierung hat. Zunächst wurden Makrophagen mit Borrelien infiziert, fixiert und anschließend mit SNX1- und SNX3-spezifischen Antikörpern gefärbt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass beide SNX-Proteine nicht kolokalisieren und die Anreicherung von endogenem SNX1 sowohl an intermediär-gestreckten und insbesondere globulären Borrelienphagosomen nicht sehr stark war, was auf eine unterschiedliche Rolle bei der Regulation des Phagozytoseprozesses von Borrelien hindeutet (Abb. 10A,E). Endogenes SNX3 hingegen war wie in vorherigen Experimenten deutlich akkumuliert (Abb. 10B,F). Auch war durch Kolokalisationsanalysen mittels Mikroskopsoftware erkennbar, dass beide SNXe nicht kolokalisieren, was vermuten lässt, dass beiden Proteinen unterschiedliche regulatorische Funktionen zugeordnet werden können. Dagegen ist in Abb. 10D,H eine partielle Kolokalisation von SNX3 mit den Borrelienphagosomen erkennbar, welche sich in einem weißen Bildsignal durch Überlappung des grün- und magentafarbenen Kanals ergibt.

Als wichtiger Anhaltspunkt für eine erfolgreiche Prozessierung der Borrelien in Makrophagen gilt die zu Beginn der Arbeit erwähnte Kompaktierung der langgestreckten Spirochäten in eine eingerollte, globuläre Form. Werden in Experimenten nun beispielsweise Makrophagen mit siRNA oder Plasmid-DNA transfiziert, so wurde der Effekt einer Depletion bzw. einer Überexpression bestimmter Proteine anhand der Kompaktierung evaluiert. So wurde als nächster Schritt jeweils für SNX1 und SNX3 ein Knockdown mit zwei individuell verschiedenen siRNAs erfolgreich etabliert (Abb. 11A,C). Die Knockdowneffizienz war mit $91,23 \% \pm 3,12 \%$ bei SNX3 siRNA#1 und $73,77 \% \pm 7,61 \%$ bei SNX3 siRNA#2 hoch genug, um Aussagen über einen Effekt bzgl. der Kompaktierung machen zu können. Ebenso erfolgreich war der Knockdown von SNX1 mit siRNA#1 ($94,77 \% \pm 1,08 \%$) und siRNA#2 ($91,61 \% \pm 3,51 \%$). Um die potenziellen Effekte der Depletion auf die jeweils

andere Isoform zu überprüfen, wurden bei SNX1 Knockdown das SNX3-Expressionslevel quantifiziert sowie bei SNX3 Knockdown das SNX1-Expressionslevel. Die Quantifizierungen der jeweiligen Western Blots zeigte, dass der Knockdown eines Sorting Nexins keinen Einfluss auf das jeweils andere hatte und gegenregulierende Effekte somit ausgeschlossen werden konnten (Abb. 11B,D). Ein signifikanter Unterschied war beim SNX1-Expressionslevel bei Transfektion mit SNX3 siRNA#1 erkennbar (Abb. 11B), welcher mit $20,63 \% \pm 4,38 \%$ jedoch sehr gering war.

Nicht nur in ihrer Lokalisation, auch funktional unterscheiden sich beide SNXe. Die Kompaktierungsrate nach SNX3-Depletion zeigt eindeutig einen signifikanten Unterschied zwischen Kontroll- und SNX3-Knockdownzellen von 61 %, wohingegen eine SNX1-Depletion einen nicht-signifikanten Unterschied von 10 % ergab (Abb. 10I). Auch der kombinierte Knockdown beider SNXe zeigte mit 47 % einen vergleichbaren Knockdowneffekt wie mit SNX3 siRNA allein. Interessanterweise zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied bei den Kompaktierungsraten zwischen SNX1- und SNX3-Knockdownzellen, was zusätzlich auf SNX3 als wichtiger Regulator bei der Kompaktierung von Borrelien hindeutete.

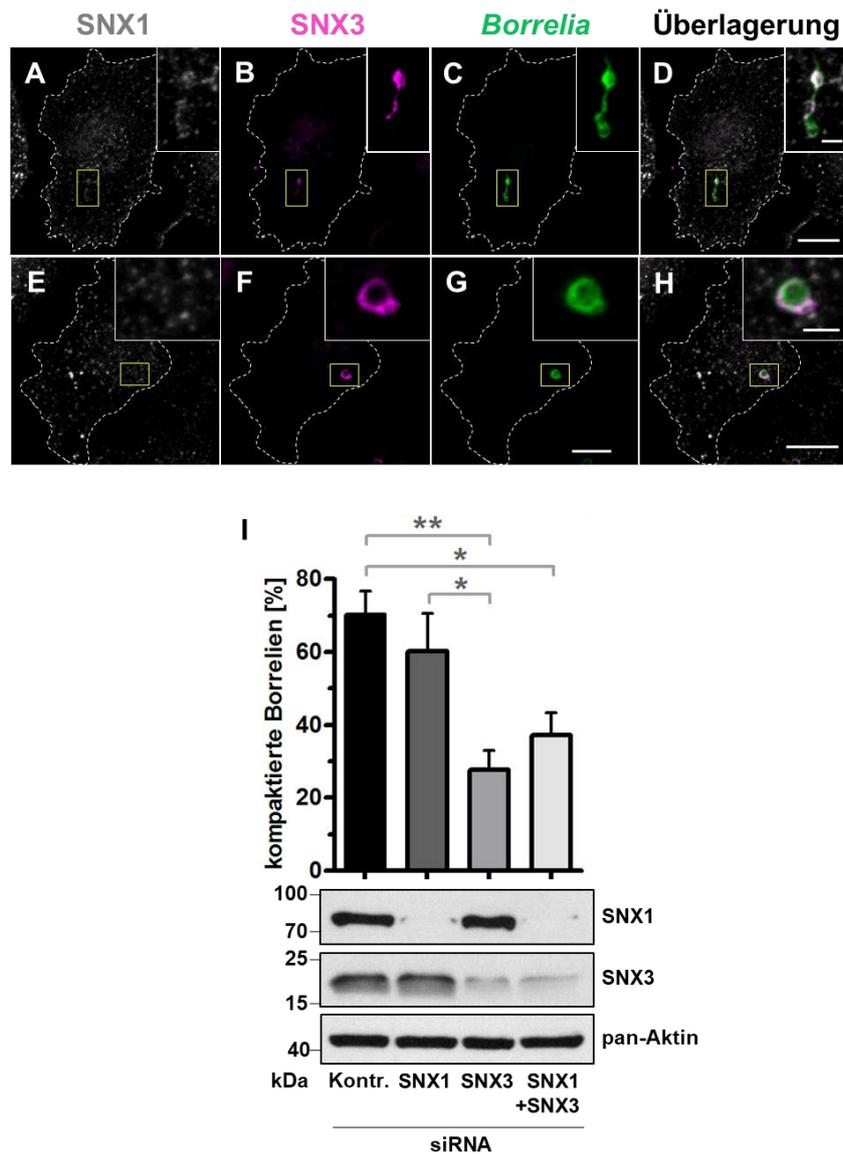


Abb. 10: SNX3 spielt eine Rolle bei der Kompaktierung von *Borrelia burgdorferi* in Makrophagen.

A-H: Immunfluoreszenzaufnahmen von mit Borrelien infizierten Makrophagen, die mit SNX1- (A,E), SNX3- (B,E) und Borrelien-spezifischen (C,G) Antikörpern gefärbt wurden. Maßstabsbalken: 10 μm, Vergrößerungen 1 μm. I: Oben: Statistische Auswertung der Kompaktierung von Borrelien nach Depletierung von SNX1, SNX3 oder beiden zusammen (Mittelwerte ± SEM, n=3x30). P-Werte wurden mittels *unpaired two-tailed Student's t-test* berechnet (* p < 0,05, ** p < 0,01). Unten: Western Blots von Makrophagenlysaten, welche mit SNX1- und SNX3-spezifischen siRNAs, einer Kombination aus beiden sowie einer Kontroll-siRNA (Luziferase) transfiziert wurden.

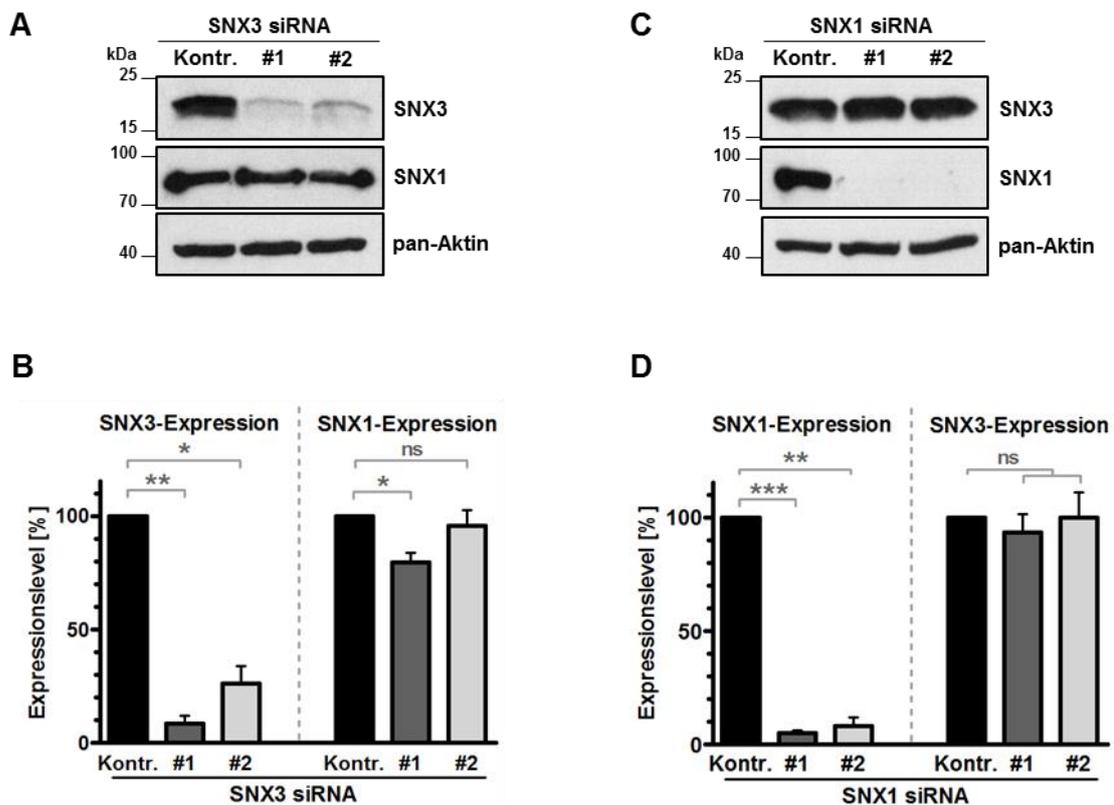


Abb. 11: Die Depletion von SNX1 und SNX3 hat keinen Einfluss auf die jeweils gegenseitige Expression. A: Western Blots von Makrophagenlysaten, welche mit zwei unabhängigen, SNX3-spezifischen siRNAs sowie einer Kontroll-siRNA (Luziferase) transfiziert wurden. Mittels pan-Aktin als Ladekontrolle konnte die (Rest-)Expression von SNX3 und SNX1 ermittelt werden (B). Der gleiche Versuch erfolgte mit zwei unabhängigen SNX1-spezifischen siRNAs *vice versa* (C), auch hier wurde der Effekt der SNX1-Depletion auf die Expression von SNX3 überprüft (D). B,D: Mittelwerte \pm SEM, $n=3$. P-Werte wurden mittels *unpaired two-tailed Student's t-test* berechnet (ns: nicht signifikant, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

7.3 SNX3-Vesikel akkumulieren bis zur vollständigen Kompaktierung an Borrelienphagosomen und sind positiv für Rab5a

In den vorherigen Experimenten wurde die Lokalisation von SNX3 an Borrelien-haltigen Phagosomen in fixierten Präparaten gezeigt. Als nächster Schritt erfolgte die Visualisierung von SNX3 in mit Borrelien infizierten primären humanen Makrophagen mittels Lebendzellmikroskopie. Hierfür wurden Makrophagen mit RFP-SNX3 transfiziert, mit GFP-exprimierenden Borrelien infiziert und mittels *spinning disk*-Mikroskop als Zeitraffervideo visualisiert. Abb. 12 zeigt eindrucksvoll die

Akkumulation von SNX3 (grau) am Borrelienphagosom direkt nach Aufnahme und bleibt bis zur vollständigen Kompaktierung des Spirochäten (grün) angereichert (Abb. 12). Die Vergrößerungen zeigen ein weiteres Borrelium am rechten, unteren Rand, welches ebenfalls mit SNX3 angereichert ist. Während der gesamten Aufnahme dieses Videos von der ganzen Zelle sind insgesamt elf Borrelien zu sehen, die mit SNX3 angereichert sind und größtenteils kompaktiert werden (Video V1).

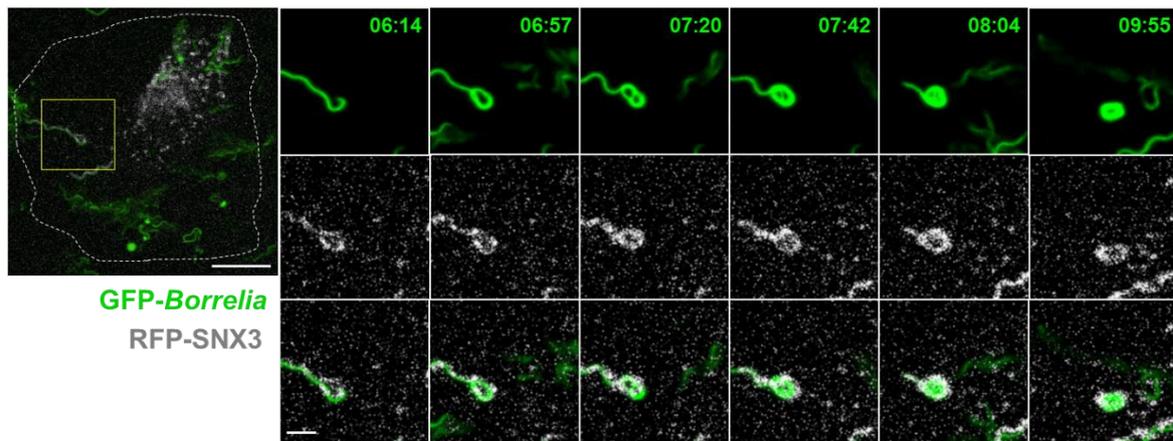


Abb. 12: Sorting Nexin-3 akkumuliert an Borrelien-haltigen Phagosomen in Makrophagen bis zur vollständigen Kompaktierung der Spirochäten. Einzelaufnahmen aus einem Video (V1) einer Lebendzellmikroskopie zeigen das sukzessive Einrollen des zuvor gestreckten Spirochäten in eine kompakte, globuläre Form. Primäre Makrophagen wurden mit RFP-SNX3 transfiziert und mit GFP-exprimierenden *B. burgdorferi* kurz vor Beginn der Lebendzellmikroskopie infiziert. Angabe der Zeit in min:sek, Maßstabsbalken: 10 μ m, Vergrößerungen 1 μ m.

Weitere Lebendzellmikroskopie-Aufnahmen zeigen, dass die überwiegende Mehrheit der SNX3-Vesikel darüber hinaus ebenfalls mit der RabGTPase Rab5a kolokalisiert (Abb. 13, Video V2), welche bereits in Arbeiten zuvor durch Lokalisation am Borrelienphagosom, insbesondere an Stellen von Membrantubulierungen sowie Spitzen der Windungen der Borrelien, auffällig war (Naj and Linder, 2015; Naj and Linder, 2017). In Fluoreszenzaufnahmen konnte dies auch für SNX3 gezeigt werden (Abb. 14, siehe Markierungen). Hierbei waren in vielen Makrophagen Borrelienphagosomen erkennbar, die eine stärkere Intensität von SNX3 an den Windungsspitzen zeigten.

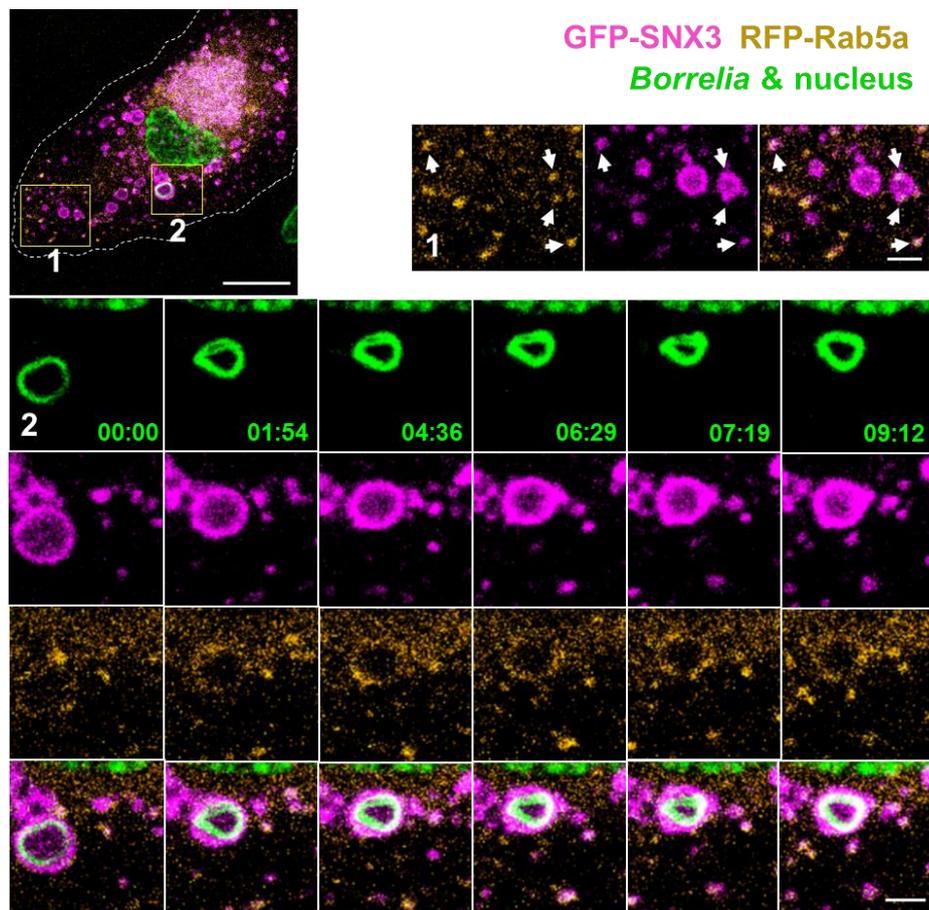


Abb. 13: Sorting Nexin-3 lokalisiert an Rab5a-positiven Vesikeln und wird am Phagosom während der Kompaktierung von Borrelien angereichert. Primäre Makrophagen wurden mit GFP-SNX3 und RFP-Rab5a kotransfiziert und mit Hoechst 33342-gefärbten Borrelien kurz vor Beginn der Lebendzell-mikroskopie infiziert. Einzelaufnahmen aus einem Video (V2) einer Lebendzellmikroskopie zeigen wie SNX3 und Rab5a kolokalisieren (1, Pfeile) und sich an Borrelienphagosomen anreichern (2). Angabe der Zeit in min:sek, Maßstabsbalken: 10 μ m, Vergrößerungen 1 μ m.

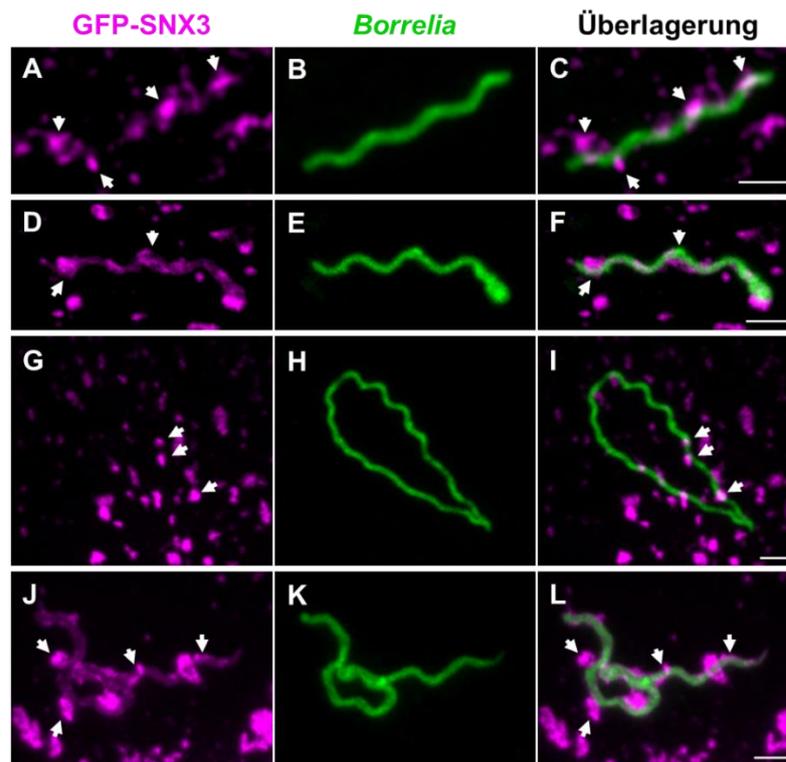


Abb. 14: SNX3 lokalisiert verstärkt an Wendungsspitzen von Borrelien-haltigen Phagosomen. Immunfluoreszenzaufnahmen von mit Borrelien infizierten Makrophagen, die GFP-SNX3 überexprimieren (A,D,G,J). Die Visualisierung der Borrelien (B,E,H,K) erfolgte mittels eines Borrelien-spezifischen Antikörpers. Pfeile deuten auf die Stellen am Borrelienphagosom, an denen überdurchschnittlich viel SNX3 angereichert ist. Maßstabsbalken: 1 μ m.

7.4 Sorting Nexin-3 wird für proteolytische Prozessierung von *Borrelia burgdorferi* benötigt

Die frühzeitige Lokalisierung von SNX3 am Borrelienphagosom direkt nach Internalisation bis zur vollständigen Kompaktierung konnte zuvor gezeigt werden. Nun wurde die weiterführende Reifung des Phagolysosoms betrachtet. Hierfür wurden mit Kontroll- und SNX3-spezifischer siRNA behandelte Makrophagen mit dem Substrat DQ-BSA (*dequenched* BSA) inkubiert. Dieses Substrat stellt einen sterisch inhibierten Komplex aus BSA und Fluorophoren dar, der eine Fluoreszenzlöschung bewirkt. Der Abbau von DQ-BSA in sauren, Hydrolase-aktiven Phagolysosomen führt zu kleinen Farbstoff-markierten Peptidfragmenten, die nun hell fluoreszieren (Abb. 15A,B). Nach

Infektion mit GFP-exprimierenden Borrelien wurde die Fluoreszenzintensität des DQ-BSA-Signals an Borrelien-haltigen Phagolysosomen gemessen und evaluiert, wobei kompaktierte Borrelien markiert wurden, welche mit DQ-BSA assoziiert waren. Die Auswertung für zwei unabhängige siRNAs zeigte, dass die Fluoreszenzintensität in beiden Fällen signifikant geringer war (siRNA #1: 19,3 %, siRNA #2: 13,4 %) als in Kontrollzellen, was auf eine Reduzierung von proteolytischer Aktivität im Phagolysosom hinweist (Abb. 15G). Darüber hinaus war eine Assoziation von Borrelien mit DQ-BSA in Knockdownzellen nur zu etwa 50 % sichtbar, wohingegen diese in Kontrollzellen bei zirka 90 % erkennbar war. Parallel wurde überprüft, ob der Knockdown mit beiden siRNAs Einfluss auf die allgemeine Fluoreszenzintensität in zuvor mit siRNA- und DQ-BSA-behandelten Makrophagen hatte (Abb. 15H). Ein genereller Effekt durch siRNA-Behandlung konnte aufgrund des Ergebnisses ausgeschlossen werden, da keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und Knockdownzellen sichtbar waren (Abb. 15H). Die Ergebnisse dieser Experimente deuten darauf hin, dass durch fehlende Degradation im Phagolysosom mehr Borrelien einem Abbau durch Makrophagen entgehen könnten. Um dies zu überprüfen, wurde ein Überlebensexperiment durchgeführt, welches überlebende, intrazelluläre Spirochäten in Makrophagen quantifiziert und mittels Wachstumskurve Unterschiede zwischen verschiedenen behandelten Zellen darstellt (Abb. 15I) (Naj and Linder, 2015). In beiden Fällen konnten Borrelien aus mechanisch aufgeschlossenen Makrophagen rekultiviert werden, jedoch nahm die Zahl der Borrelien in SNX3-depletierten Makrophagen über die Zeit stärker zu, als bei Borrelien aus Kontrollzellen. Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Wachstumskurven war am Tag 10 nach Infektion zu erkennen, bei welchem die Anzahl der Borrelien aus SNX3-Knockdownzellen 2,3-fach höher war, als bei Borrelien aus Kontrollzellen. Dies bestätigt erneut die Annahme, dass der (partielle) Verlust von SNX3 zu einer höheren Überlebensrate und Viabilität von Borrelien führt und SNX3 ein wichtiger Bestandteil des Phagozytoseprozesses in primären humanen Makrophagen bei der Elimination der Spirochäten ist.

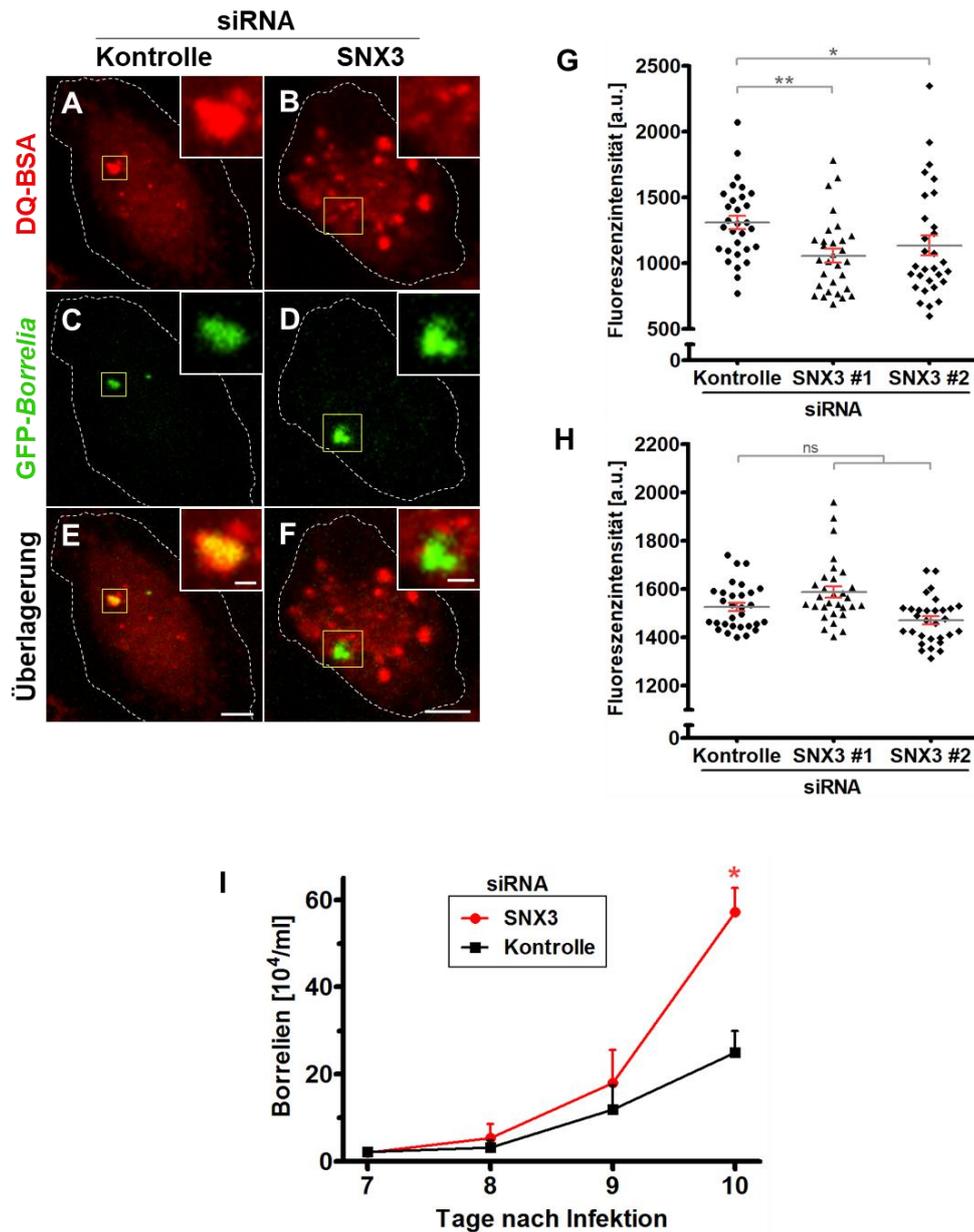


Abb. 15: Sorting Nexin 3 ist Voraussetzung für proteolytische Aktivität im Phagolysosom und verhindert intrazelluläres Überleben. A-F: Immunfluoreszenzaufnahmen von mit GFP-Borrelien (C,D) infizierten Makrophagen, die zuvor mit DQ-BSA (A,B) behandelt worden sind. G: Statistische Auswertung der DQ-BSA-basierten Fluoreszenzintensitäten an Borrelienphagosomen in Kontroll- (A,C,E) und SNX3-Knockdown- (B,D,F) Zellen. H: Statistische Auswertung der allgemeinen DQ-BSA-basierten Fluoreszenzintensitäten in nicht infizierten SNX3-Knockdown- und Kontrollzellen. G+H: Mittelwerte \pm SEM, $n=3 \times 30$, P-Werte wurden mittels *one-way ANOVA test* berechnet (ns: nicht signifikant, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). I: SNX3 reguliert intrazelluläres Überleben von Borrelien. Statistische Auswertung des intrazellulären Überlebens von Borrelien in Makrophagen, die mit Kontroll- und SNX3-spezifischer siRNA behandelt worden sind. Die Graphen zeigen Wachstumskurven der Spirochäten, welche von den zugehörigen Makrophagenlysaten rekultiviert wurden. Anzahl der rekultivierten Borrelien (10^4 /ml) ist auf der y-Achse und die Tage nach Beginn des Experiments auf der x-Achse dargestellt. Mittelwerte \pm SEM, $n=3$, P-Werte wurden mittels *unpaired two-tailed Student's t-test* berechnet (* $p < 0,05$).

7.5 Die SNX3-Bindung am Phagosom wird über die PX-Domäne vermittelt

Innerhalb der Gruppe der Sorting Nexine ist SNX3 mit 162 Aminosäuren einer der kleinsten Vertreter, welcher lediglich über eine einzelne, annotierte PX-Domäne verfügt, die an Phosphatidylinositole (PIPs) bindet. Um die molekulare Wirkweise hinsichtlich der PIP-Spezifität zu klären wurden Makrophagen mit Plasmiden transfiziert, die für verschiedene, fluoreszenzmarkierte Phosphatidylinositolsensoren kodieren und mit denen überprüft werden sollte, welche Phosphatidylinositole am Borrelienphagosom angereichert sind oder sogar mit SNX3 kolokalisieren. Hierfür wurden Makrophagen mit Phosphatidylinositolsensoren (alle GFP-markiert) und RFP-SNX3 kotransfiziert, anschließend mit Wildtyp-Borrelien infiziert und nach anschließender Immunfärbung mit dem Mikroskop betrachtet (Abb. 16). Insgesamt waren vier PIP-Vertreter am Phagosom angereichert und mit SNX3 (partiell) kolokalisiert: PI(3)P (Abb. 16A-D), PI(3,4)P₂ (Abb. 16E-H), PI(4)P (Abb. 16I-L) und PI(3,4,5)P₃ (Abb. 16Q-T). Auffällig dabei war eine deutlich hohe Anreicherung von PI(3)P am Borrelienphagosom und darüber hinaus insbesondere mit SNX3 zusammen an den Spitzen der Membrankurvatur der Borrelien (Abb. 16A,B, Pfeile in Vergrößerungen). Die übrigen Phosphatidylinositolsensoren zeigten dagegen weder eine Anreicherung am Phagosom noch eine Kolokalisation mit SNX3.

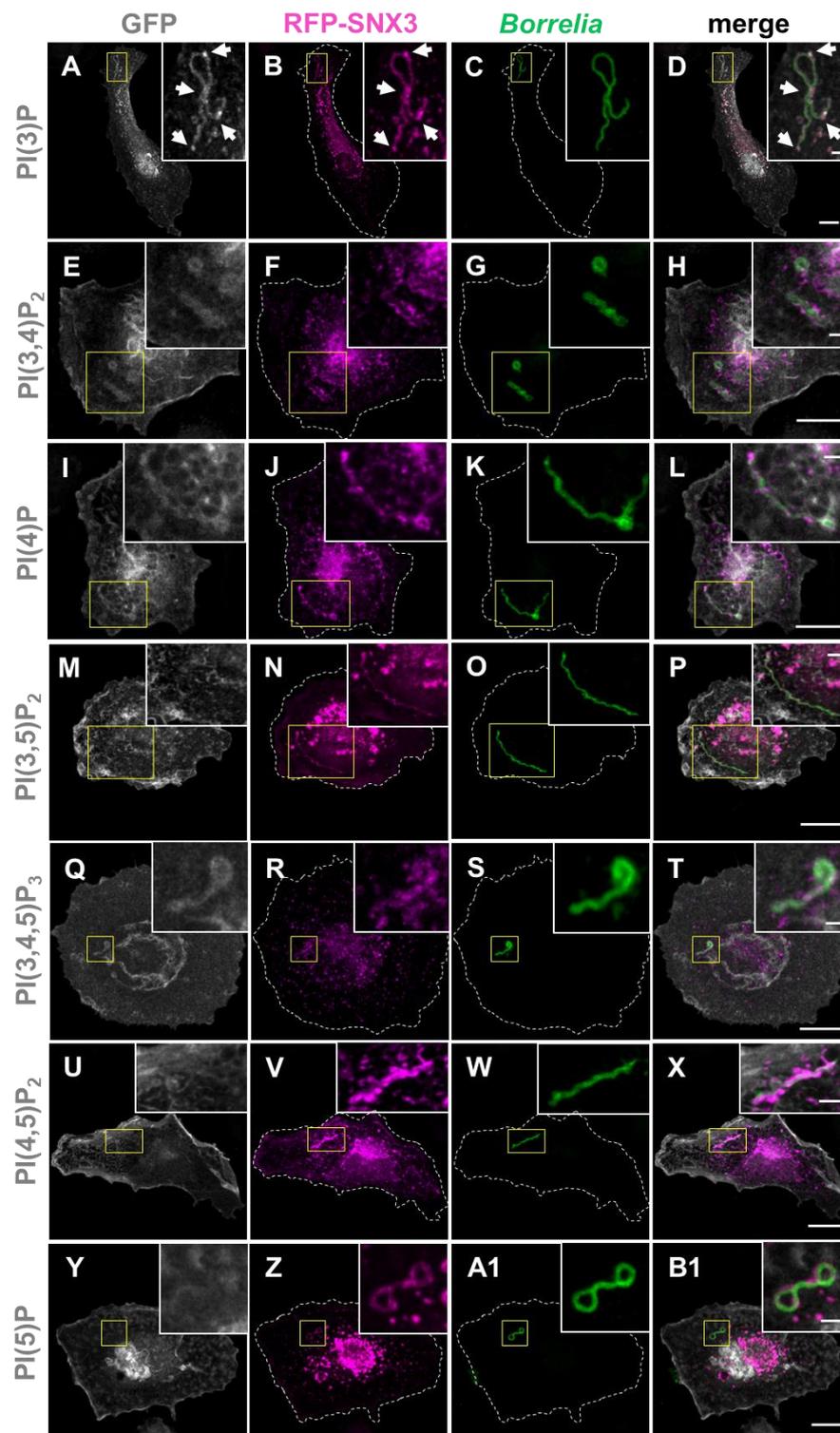


Abb. 16: SNX3 bindet an PI(3)P und ist an Borrelien-haltigen Phagosomen mit PI(3)P kolokalisiert. Immunfluoreszenzaufnahmen zeigen Expression von GFP-fusionierten Phosphatidylinositolsensoren sowie RFP-fusioniertes SNX3 in primären Makrophagen. A-D: PI(3)P-Sensor PX-p40phox, E-H: PI(3,4)P₂-Sensor TAPP1-PH, I-L: PI(4)P-Sensor P4M-SidM, M-P: PI(3,5)P₂-Sensor ML1Nx2, Q-T: PI(3,4,5)P₃-Sensor PH-AKT, U-X: PI(4,5)P₂-Sensor PH-PLCδ1, Y-B1: PI(5)P-Sensor PHD-Ing2x3. Makrophagen wurden mit *B. burgdorferi* infiziert und mit Borrelien-spezifischen Antikörpern gefärbt. Alle Maßstabsbalken: 10 µm, Vergrößerungen 1 µm.

Ob und wie SNX3 und PI(3)P direkt interagieren, wurde nachfolgend in einem biochemischen Versuch getestet, bei dem die Spezifität von Proteinen für bestimmte Phospholipide überprüft werden kann. Die PX-Domäne von SNX3 bindet vorrangig an PI(3)P und wie im vorangegangenen Immunfluoreszenzversuch (Abb. 16) gezeigt, potenziell auch PI(3,4)P₂, PI(4)P und PI(3,4,5)P₃. Die Bindung an PI(3)P erfolgt dabei über drei Aminosäuren: Arg⁷⁰, Tyr⁷¹ und Lys⁹⁵ (Teasdale and Collins, 2012), wobei die stärkste Bindung über das Tyrosin vermittelt wird, welche mit ihrem Benzol- und dem Inositolring des PI(3)P einen Stapel bildet. Wird diese mutiert, so ist die Bindung effektiv gestört (Xu et al., 2001a).

Für diesen sogenannten *PIP-strip*-Assay wurden rekombinante, GST-fusionierte SNX3-Proteine (WT und Y71A) sowie GST-Protein als Negativkontrolle benötigt. Hierfür wurden zunächst für eine PCR die DNA-Oligonukleotide (*primer*) P15 und P16 designt, welche mit den Schnittstellen *Bam*HI und *Eco*RI im nicht-hybridisierenden Bereich fusioniert waren. Mit Hilfe dieser und mit GFP-SNX3 als DNA-Matrize wurde das SNX3-Volllängekonstrukt mit den entsprechenden Restriktionsschnittstellen amplifiziert und anschließend zusammen mit dem GST-Leervektor pcDNA3.1+ mit *Bam*HI und *Eco*RI verdaut. Nach anschließender Ligation wurde das resultierende Plasmid sequenziert und für die Herstellung der PX-Mutante verwendet. Hierbei diente es als DNA-Matrize, bei welcher in einer so genannten QuikChange-PCR einzelne Nukleotide ausgetauscht werden können. In diesem Fall wurde das Basentriplett, welches für Tyrosin kodiert so verändert, dass an dieser Stelle ein Alanin translatiert wurde. Nach Fertigstellung der Plasmide konnten alle GST-Konstrukte rekombinant in *E. coli* BL21 hergestellt und gereinigt werden. Die final gereinigten und dialysierten Proteine sind im Coomassie-gefärbten SDS-PAGE-Gel in Abb. 17A zu sehen. Die Größen der markanten Proteinbanden entsprachen den gewünschten bzw. berechneten Molekulargewichten mit 25 kDa für GST und 44 kDa für GST-SNX3^{WT} und GST-SNX3^{Y71A}. Die Reinheit der GST-Proteinkontrolle war mit 95 % sehr hoch, die Qualität der Reinigung war bei beiden SNX3-Proteinen ausreichend hoch und mit Reinheiten von 66 % und 71 % für den folgenden Versuch untereinander gut vergleichbar. Auch wurden alle Konstrukte in immunochemischen Färbungen nach Western Blot von GST- und SNX3-spezifischen Antikörpern erkannt (Abb. 17B). Diese zeigten auch, dass viele scheinbare Verunreinigungen im Coomassie-Gel vermutlich Abbauprodukte der

eigentlichen SNX3-Proteine waren, da sie auch durch die beiden Antikörper erkannt wurden. Auffällig war auch, dass der SNX3-spezifische Antikörper ebenfalls das GST-Protein erkannte (Abb. 17B oben). Ein Sequenzvergleich der zur Immunisierung verwendeten Antigene der Antikörper zeigte teilweise Sequenzidentitäten, auf die dieser Effekt wohl zurückzuführen ist.

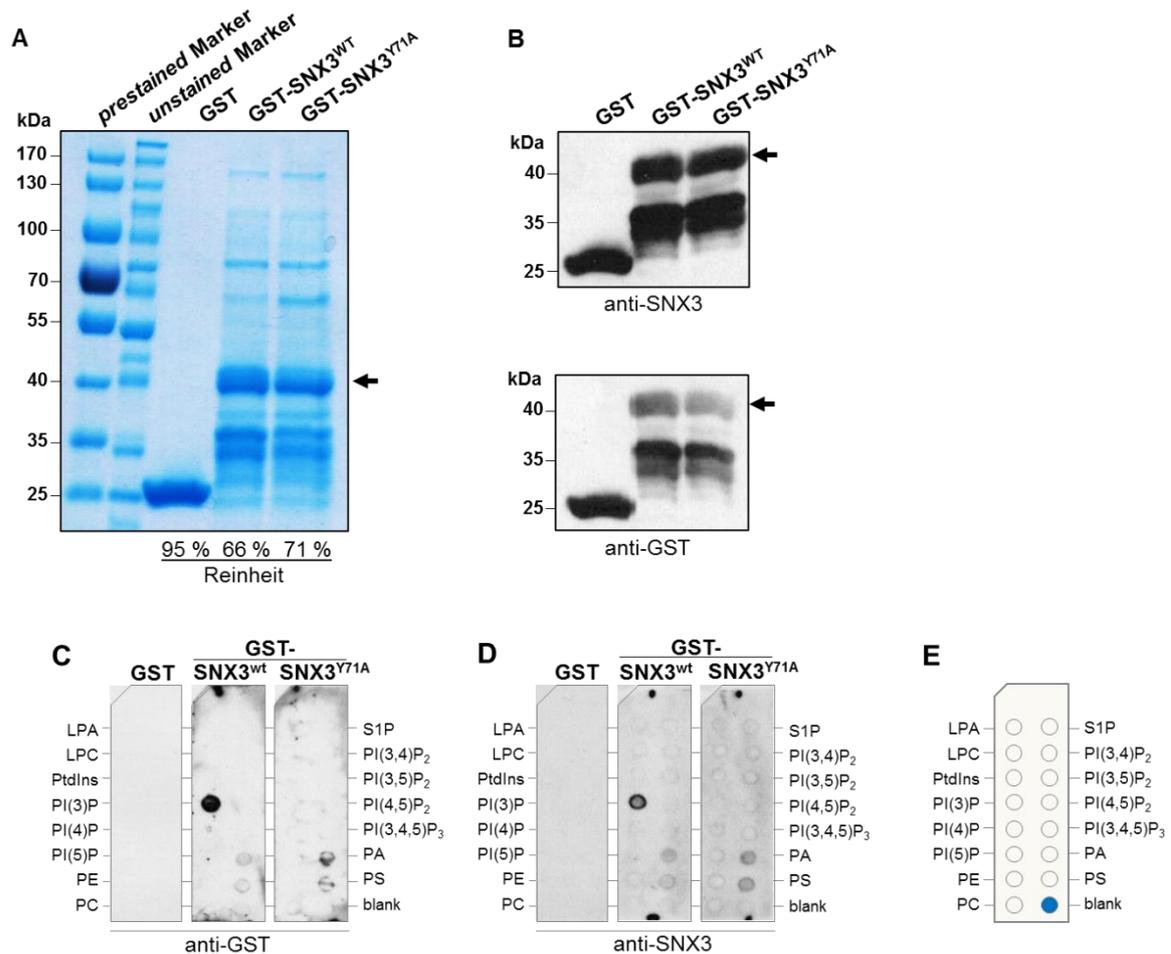


Abb. 17: Sorting Nexin-3 bindet über seine PX-Domäne an PI(3)P. Rekombinantes GST sowie die GST-fusionierten SNX3-Konstrukte SNX3^{WT} und PX-Mutante SNX3^{Y71A} wurden durch Expression in *E. coli* BL21-AI hergestellt und anschließend über Glutathion-Sepharose-Säulen aufgereinigt. A: Commassie-gefärbtes SDS-Gel (10 %) mit gereinigten und gegen DPBS dialysierten GST und GST-Fusionskonstrukten. B: Korrespondierende Western Blots zu A) mit GST- und SNX3-spezifischen primären Antikörpern gefärbt. Die Pfeile deuten auf die Banden, die rekombinantes GST-SNX3^{wt} und GST-SNX3^{Y71A} darstellen. C-D: *PIP-strip* Nitrocellulose-Membran, inkubiert mit rekombinanten GST-SNX3^{wt}, GST-SNX3^{Y71A} sowie GST als Kontrolle. Detektion von gebundenem SNX3 erfolgte mit GST-spezifischen (C) und SNX3-spezifischen (D) primären Antikörpern. E: Schema der auf den NC-Membranen aufgetragenen Phosphoinositole und anderen Lipide. LPA: Lysophosphatsäure, S1P: Sphingosin-1-Phosphat, LPC: Lysophosphocholin, PA: Phosphatsäure, PE: Phosphatidylethanolamin, PS: Phosphatidylserin, PC: Phosphatidylcholin.

Für den PIP-strip Assay wurden die rekombinanten GST-SNX3-Proteine sowie die GST-Negativkontrolle mit den Membranen inkubiert, auf welche verschiedene Phospholipide aufgetragen waren. Die Entwicklung der Membranen mit GST- und SNX3-spezifischen Antikörpern zeigte ein starkes Signal für PI(3)P beim Wildtypprotein, jedoch nicht bei der PX-Mutante, sowie keine weiteren detektierbaren Signale bei anderen Phosphatidylinositolen wie PI(3,4)P₂, PI(4)P oder PI(3,4,5)P₃, welche zuvor in der Immunfluoreszenz an Borrelien-haltigen Phagosomen sichtbar akkumulierten (Abb. 17C,D).

Diese bisherigen Daten zeigten, dass SNX3 *in vitro* spezifisch an PI(3)P bindet und überwiegend mit diesem Phospholipid an Borrelienphagosomen koloalisiert. Um festzustellen, ob die Anwesenheit von PI(3)P und seine Bindung durch SNX3 einen Einfluss auf die Kompaktierung von Borrelien hat, wurden die PI3-Kinase in Makrophagen durch Zugabe von Wortmannin inhibiert und das GFP-fusionierte PI(3)P-Reporterkonstrukt p40phox überexprimiert (Abb. 18A,B). Makrophagen, die nur mit DMSO behandelt wurden, zeigten die typische Anreicherung des PI(3)P-Sensors am Borrelienphagosom. Auch war zu erkennen, dass die Mehrheit der Borrelien eingerollt waren (Abb. 18A). Die Behandlung der Makrophagen mit Wortmannin (1 µM) dagegen zeigt deutlich, dass keine Lokalisation von PI(3)P an Phagosomen möglich war und dass das überexprimierte p40phox-Konstrukte ubiquitär in der Zelle verteilt war (Abb. 18B). Die Quantifizierung kompaktierter und gestreckter Borrelien machte hierbei ebenfalls deutlich, dass das Fehlen von PI(3)P in Makrophagen auch einen großen funktionellen Einfluss auf das Einrollen der Borrelien hat. Verglichen mit den Kontrollzellen zeigte sich in mit Wortmannin behandelten Makrophagen eine Reduktion der Kompaktierung von 57 % (49,9 % ± 9,3 % zu 21,56 % ± 2,51 %) (Abb. 18C). Parallel zur Expression des PI(3)P-Sensors erfolgte die Expression von GFP-fusioniertem SNX3 in den gleichen Zellen. In den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in Abb. 18D und E ist deutlich zu sehen, dass GFP-SNX3 in Kontrollzellen an Borrelien-haltigen Phagosomen und anderen Vesikeln lokalisiert, wohingegen eine Anreicherung in Wortmannin-behandelten Zellen nicht sichtbar gewesen ist. Auch ist GFP-SNX3 in diesen Zellen ähnlich zytosolisch verteilt, wie der PI(3)P-Sensor p40phox. Die Auszählung der GFP-SNX3-positiven Borrelienphagosomen stellt dies ebenfalls statistisch eindrucksvoll dar (Abb. 18F).

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse dieser Experimente, dass die Bildung von PI(3)P durch die PI3-Kinase und die Bindung dieses Phospholipids durch SNX3 am Borrelienphagosom wichtig für die Kompaktierung der Borrelien sind.

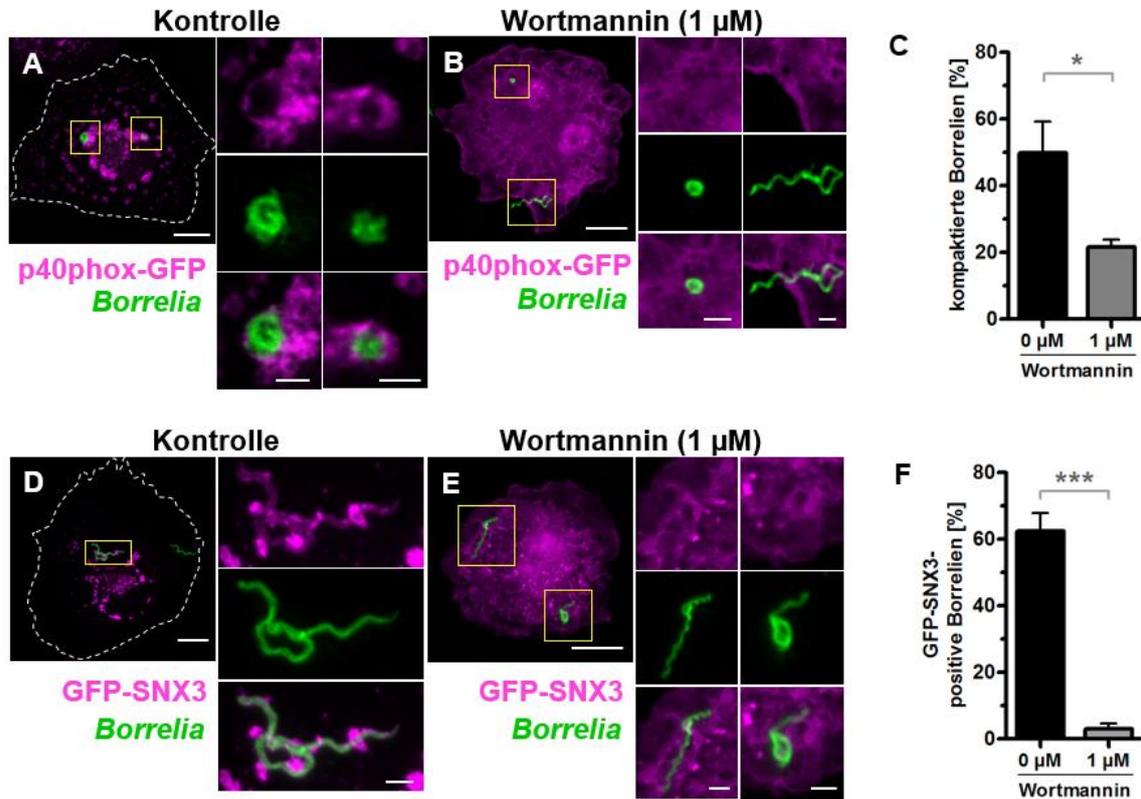


Abb. 18: PI3-Kinaseaktivität reguliert Kompaktierung von Borrelien. Konfokale Mikroskop-aufnahmen von Makrophagen, die PI(3)P-Sensor p40phox-GFP (A,B) oder GFP-SNX3 (C,D) exprimieren und mit *B. burgdorferi* infiziert worden sind, welche anschließend mit Borrelien-spezifischen Antikörpern gefärbt wurden. Zellen wurden zuvor entweder mit DMSO (A,D) oder mit PI3K-Inhibitor Wortmannin (B,E) behandelt. C: Statistische Auswertung der Kompaktierung von Borrelien nach Wortmanninbehandlung (Mittelwerte \pm SEM, n=3x30). P-Werte wurden mittels *unpaired two-tailed Student's t-test* berechnet (* p < 0,05). D: Statistische Auswertung der Akkumulation von GFP-SNX3 an Borrelien-haltigen Phagosomen nach Wortmanninbehandlung (Mittelwerte \pm SEM, n=3x30). P-Werte wurden mittels *unpaired two-tailed Student's t-test* berechnet (***) p < 0,001). Alle Maßstabsbalken: 10 μ m, Vergrößerungen 1 μ m.

7.6 PI3K-Aktivität und Bindung von PI(3)P durch SNX3 ist wichtig für Kompaktierung von Borrelien

Um den potenziellen Einfluss der PI(3)P-Bindung durch die PX-Domäne von SNX3 zu untersuchen, wurden siRNA-insensitive Konstrukte von GFP-SNX3^{WT} und GFP-SNX3^{Y71A} mittels QuikChange-PCR hergestellt. Dabei wurden an der siRNA-Bindestelle innerhalb der SNX3-Sequenz drei Nukleotide so verändert, dass eine Bindung der siRNA an die transkribierte mRNA nicht mehr erfolgen kann. Diese Konstrukte und GFP als Kontrolle wurden in Makrophagen, die mit SNX3-spezifischer und Kontroll-siRNA behandelt wurden, überexprimiert. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen, dass eine Anreicherung an Borrelien-haltigen Phagosomen nur durch das Wildtyp-Konstrukt von GFP-SNX3 erfolgt (Abb. 19B), wohingegen die Überexpression von GFP-SNX3^{Y71A} der GFP-Kontrolle ähnelt (Abb. 19A,C). Auch die vesikuläre Verteilung von GFP-SNX3 innerhalb der Makrophagen ist nur beim Wildtyp-Konstrukt zu erkennen. Die Überexpression beider siRNA-insensitiver Konstrukte zeigte eine nicht-signifikante Reduktion der Kompaktierung der Spirochäten in Kontrollzellen. Der Knockdown von SNX3 mit Überexpression von GFP allein zeigte wie erwartet die bereits bekannte Reduktion von zirka 50 % an kompaktierten Borrelien (71,3 % ± 4,8 % zu 34,7 % ± 6,4 %, Abb. 19D). Dieser Verlust an Kompaktierungsrate konnte zu 94 % durch die Überexpression von GFP-SNX3^{WT} fast vollständig wiederhergestellt werden (64,6 % ± 2,8 %). Die PX-Mutante GFP-SNX3^{Y71A} war jedoch nicht in der Lage, den Knockdowneffekt zu komplementieren und lag mit 31,7 % ± 3,4 % Kompaktierung etwa auf Niveau der GFP-Kontrolle. Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass die Bildung von PI(3)P durch die PI3-Kinase sowie die Bindung von SNX3 über seine PX-Domäne an ebendieses Phosphatidylinositol essenziell für die Kompaktierung der Borrelien in Phagosomen ist.

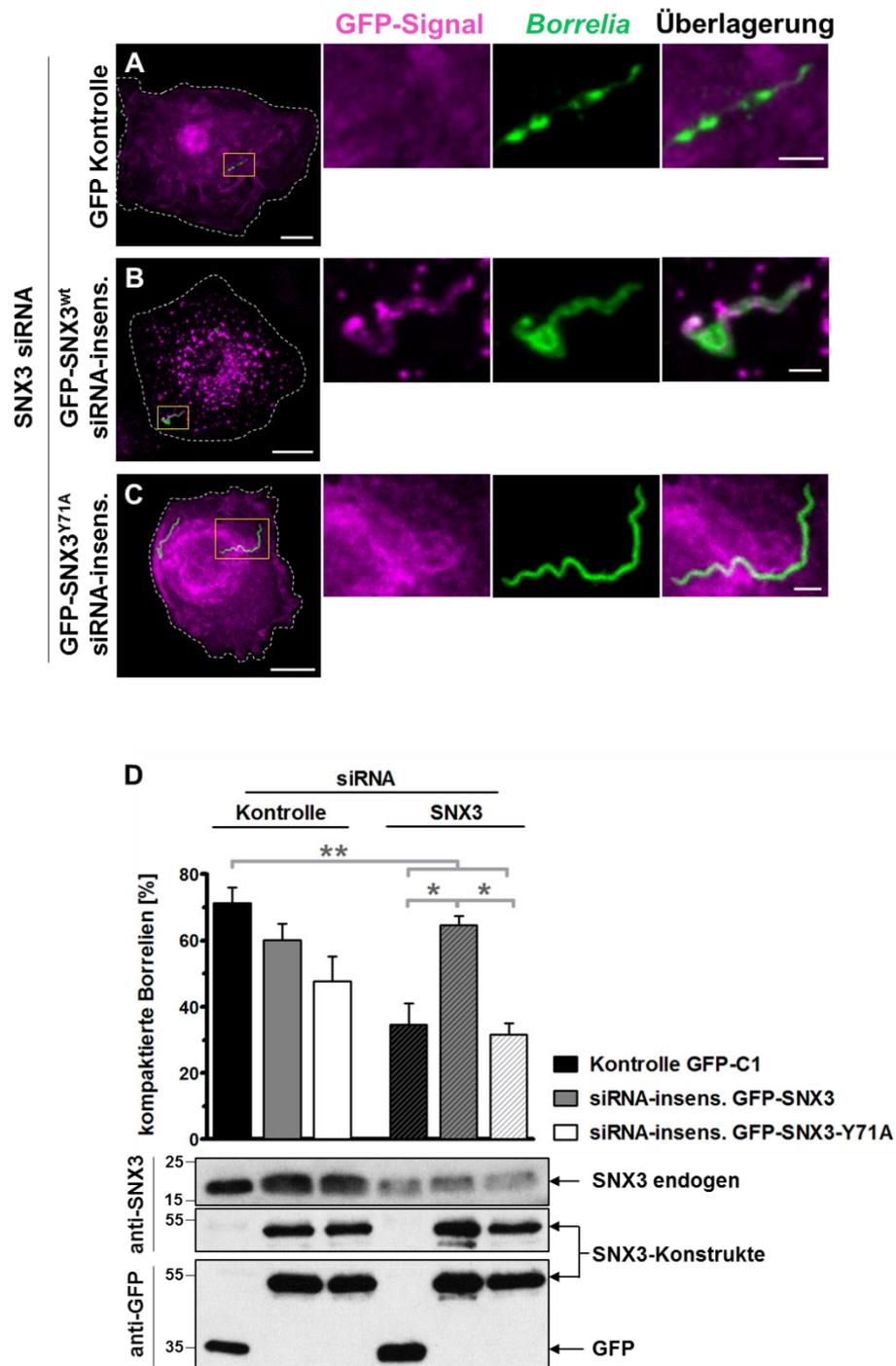


Abb. 19: Die Bindung von SNX3 an PI(3)P reguliert die Kompaktierung von Borrelien. A-C: Konfokale Immunfluoreszenzaufnahmen von Makrophagen, die GFP (A), Wildtyp GFP-SNX3 (B) und PX-Mutante SNX3^{Y71A} (C) exprimieren und mit *B. burgdorferi* infiziert wurden. Alle in A-C dargestellten Zellen sind SNX3-Knockdown-Zellen. D: Statistische Auswertung der Kompaktierung von Borrelien nach SNX3-Depletion und Überexpression von GFP-SNX3 und GFP-SNX3-Y71A als Versuch der Komplementierung (Mittelwerte \pm SEM, n=3x30). P-Werte wurden mittels *one-way ANOVA test* berechnet (* p < 0,05, ** p < 0,01).

7.7 Der C-terminale Teil von SNX3 ist für die Kompaktierung von Borrelien essenziell

Um systematisch den Einfluss der verschiedenen Regionen von SNX3 auf die Lokalisierung an Borrelienphagosomen und deren Kompaktierung zu untersuchen, wurden die folgenden GFP-Fusionskonstrukte von SNX3 kloniert und auf ihre Anreicherung an Borrelien-haltigen Phagosomen getestet: Ein Konstrukt ohne N-Terminus (ΔN), eines bestehend aus PX-Domäne und C-Terminus (PX+C), ein Konstrukt ohne C-Terminus (ΔC), ein weiteres bestehend aus der N-terminalen Region und der nachfolgenden α -Helix ($N+\alpha$) und ein Konstrukt bestehend aus der C-terminalen Region (C) (Abb. 20A). Verglichen mit dem Volllängekonstrukt wiesen sowohl SNX3- ΔN als auch SNX3-PX+C eine um zirka 30 % verringerte Lokalisierung auf, während Konstrukte, denen die PX-Domäne fehlte ($N+\alpha$ und C) nicht an Phagosomen lokalisierten (Abb. 20B). Diese Daten zeigten einen moderaten, nicht-signifikanten Einfluss der N-terminalen Region von SNX3 auf die Anreicherungen an Borrelien-haltigen Phagosomen sowie die absolute Notwendigkeit des Vorhandenseins der PX-Region für diese Funktion. Überraschenderweise zeigte das Konstrukt, bei welchem nur die aus elf Aminosäureresten bestehende C-terminale Region deletiert war, eine Verringerung der phagosomalen Lokalisierung um mehr als 80 %, was auf einen entscheidenden Einfluss dieser Region hinweist. Dieser Versuch zeigte mit seinen erstellten Teilkonstrukten, dass die Lokalisierung von SNX3 an Borrelienphagosomen mehrere Regionen von SNX3 umfasst, wobei die PX-Domäne und die C-terminale Region den stärksten Einfluss ausüben.

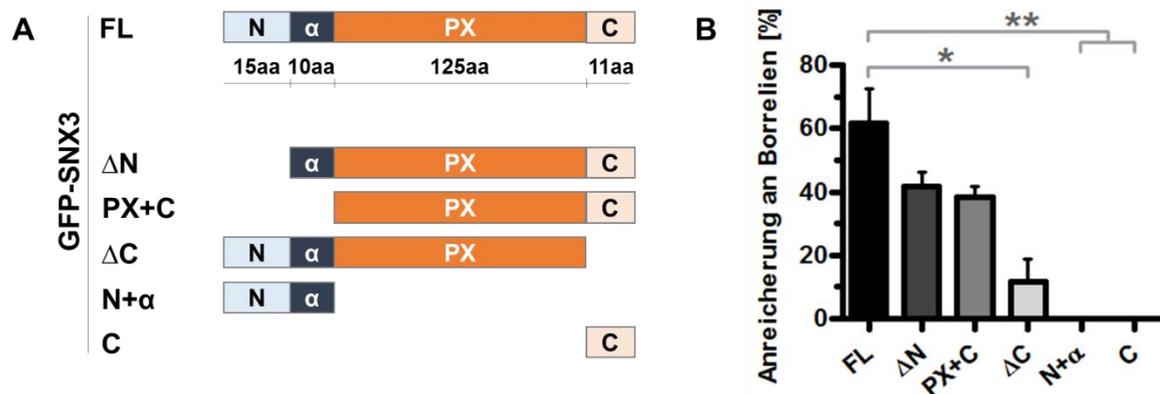


Abb. 20: Sorting Nexin-3 benötigt C-Terminus zur Lokalisation an Borrelien-haltigen Phagosomen. A: Schematische Übersicht der von SNX3-Volllänge abgeleiteten Teilkonstrukte. N: N-terminale Region von SNX3 (15 aa); α : alpha-helikaler Teil (10 aa), PX: phox-Domäne (125 aa), C: C-terminale Region (11 aa). Alle Teilkonstrukte sind wie das Volllängekonstrukt auch N-terminal mit GFP fusioniert. B: Statistische Auswertung der Akkumulierung aller GFP-SNX3-Konstrukte an Borrelien-haltigen Phagosomen in Makrophagen (Mittelwerte \pm SEM, $n=3 \times 30$). P-Werte wurden mittels *one-way ANOVA test* berechnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Inwiefern die entsprechenden Regionen die Kompaktierung von Borrelien in Makrophagen beeinflussen, wurde im Folgenden getestet. Dafür wurden die zuvor verwendeten Teilkonstrukte durch Einfügen von stillen Punktmutationen zu siRNA-insensitiven Konstrukten verändert. Dies betraf die GFP-fusionierten Teilkonstrukte SNX3- Δ N, SNX3-PX+C und SNX3- Δ C. Die Teilkonstrukte SNX3-N+ α sowie SNX3-C waren bereits *per se* siRNA-insensitiv, da sich die Zielsequenz der siRNA innerhalb der PX-Domäne befand. Diese siRNA-insensitiven Konstrukte inklusive dem Volllängekonstrukt und dem GFP-Leervektor wurden erneut mittels Elektroporation in Makrophagen eingebracht, welche zuvor mit Kontroll- sowie SNX3-spezifischer siRNA behandelt worden waren. Anschließend wurde die Kompaktierungsrate der Borrelien bestimmt (Abb. 21A-P1). Wie schon in vorherigen Experimenten deutlich wurde, zeigte der Knockdown von SNX3 in GFP-transfizierten Knockdownzellen eine signifikante Reduktion der Kompaktierung von Borrelien um zirka 50 %, welche durch das Volllängekonstrukt vollständig wiederhergestellt werden konnte (Abb. 22). Ebenso zeigten sowohl Teilkonstrukt SNX3- Δ N als auch SNX3-PX+C eine fast vollständige Wiederherstellung der Kompaktierungsrate, wenn auch teils reduziert (19,1 % und 17,2 % verglichen mit SNX3-FL). Dagegen war eine deutlich Reduzierung an kompaktierten Spirochäten bei den Teilkonstrukten zu sehen, denen die PX-

Domäne fehlte (SNX3-N+ α und SNX3-C), welche vergleichbar mit der GFP-Leervektorkontrolle war (rot-gestrichelte Linie). Diese Teilergebnisse bestätigten noch einmal die Bedeutung der PX-Domäne in Zusammenhang mit der Bindung von SNX3 an das Borrelienphagosom und der daraus resultierenden Kompaktierung (siehe Abb. 19). Das Konstrukt ohne C-Terminus (SNX3- Δ C) wies ein annähernd gleiches Level an Kompaktierung von Borrelien auf wie die Konstrukte ohne PX-Domäne und GFP-Kontrollvektor auf. Interessanterweise zeigte die Expression von SNX3- Δ C, SNX3-N+ α und SNX3-C in Kontrollzellen mit endogenem SNX3-Hintergrund eine ähnliche Reduzierung der phagosomalen Kompaktierung, was ebenfalls auf einen inhibitorischen Effekt dieser Konstrukte hindeutete. Diese Erkenntnisse über Lokalisation und Funktionalität der Teilkonstrukte zeigen, dass neben der PX-Domäne der C-terminale Abschnitt von SNX3 entscheidend für den Prozess des Einrollens der länglichen Spirochäten ist. Möglicherweise ist neben der Bindung der PX-Domäne an das phagosomale PI(3)P eine Bindung oder Interaktion des C-terminalen Teils mit einem weiteren Interaktor nötig, um die effektive Kompaktierung und Verkleinerung des Borrelienphagosoms zu ermöglichen.

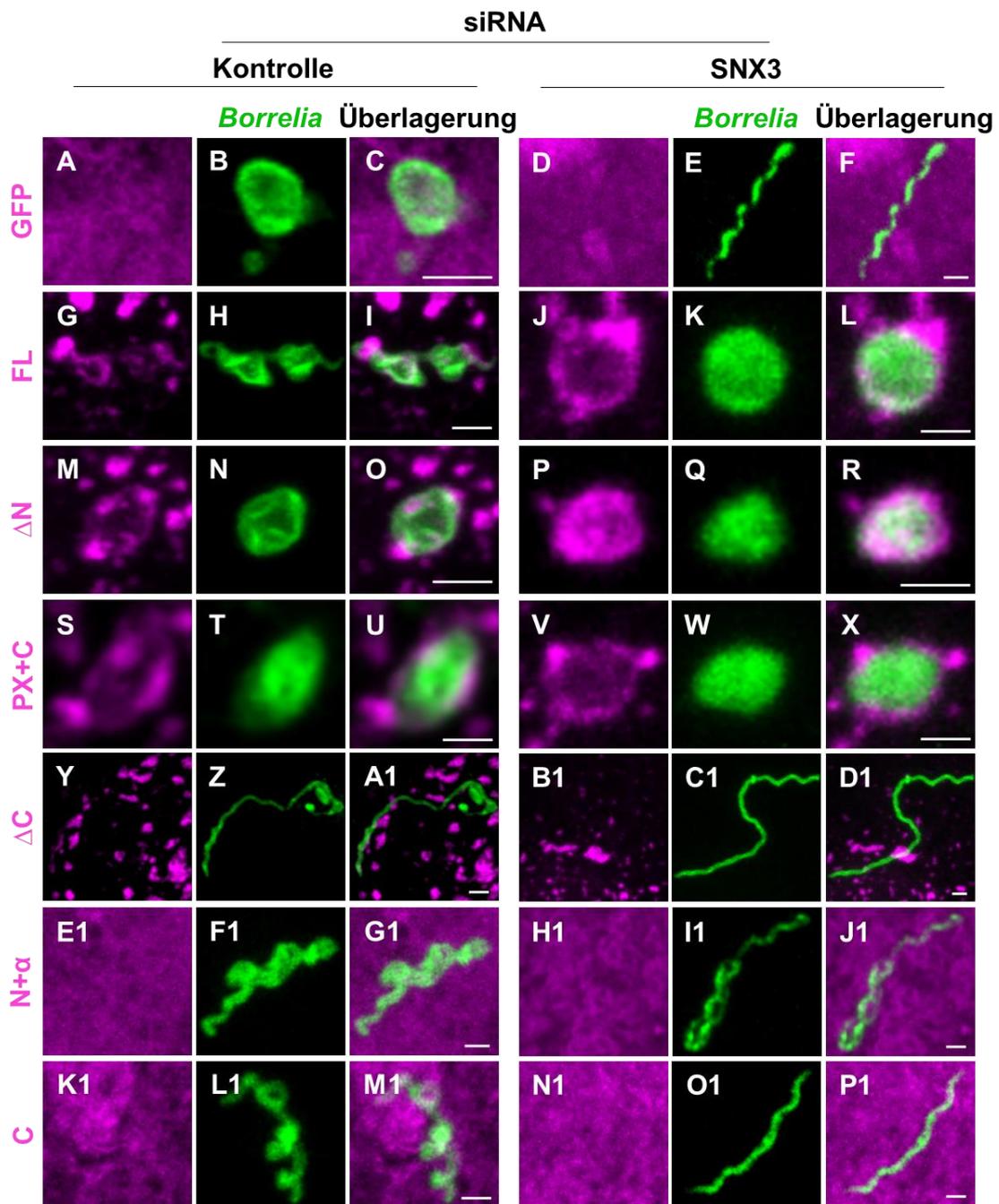


Abb. 21: Der C-Terminus von Sorting Nexin-3 ist für die Kompaktierung von Borrelien essenziell. Korrespondierende Immunfluoreszenzaufnahmen zu Abb. 22. Links: Makrophagen mit endogenem SNX3-Hintergrund, rechts; Makrophagen ohne endogenem SNX3-Hintergrund. A-F: GFP-Kontrolle; G-L: GFP-SNX3 (Volllänge); M-R: GFP-SNX3- ΔN ; S-X: GFP-SNX3-PX+C; Y-D1: GFP-SNX3- ΔC ; E1-J1: GFP-SNX3-N+ α ; K1-P1: GFP-SNX3-C. Die Infektion erfolgte mit Wildtyp-Borrelien, welche anschließend mit Borrelien-spezifischen Antikörpern gefärbt wurden. Alle Maßstabsbalken: 1 μm .

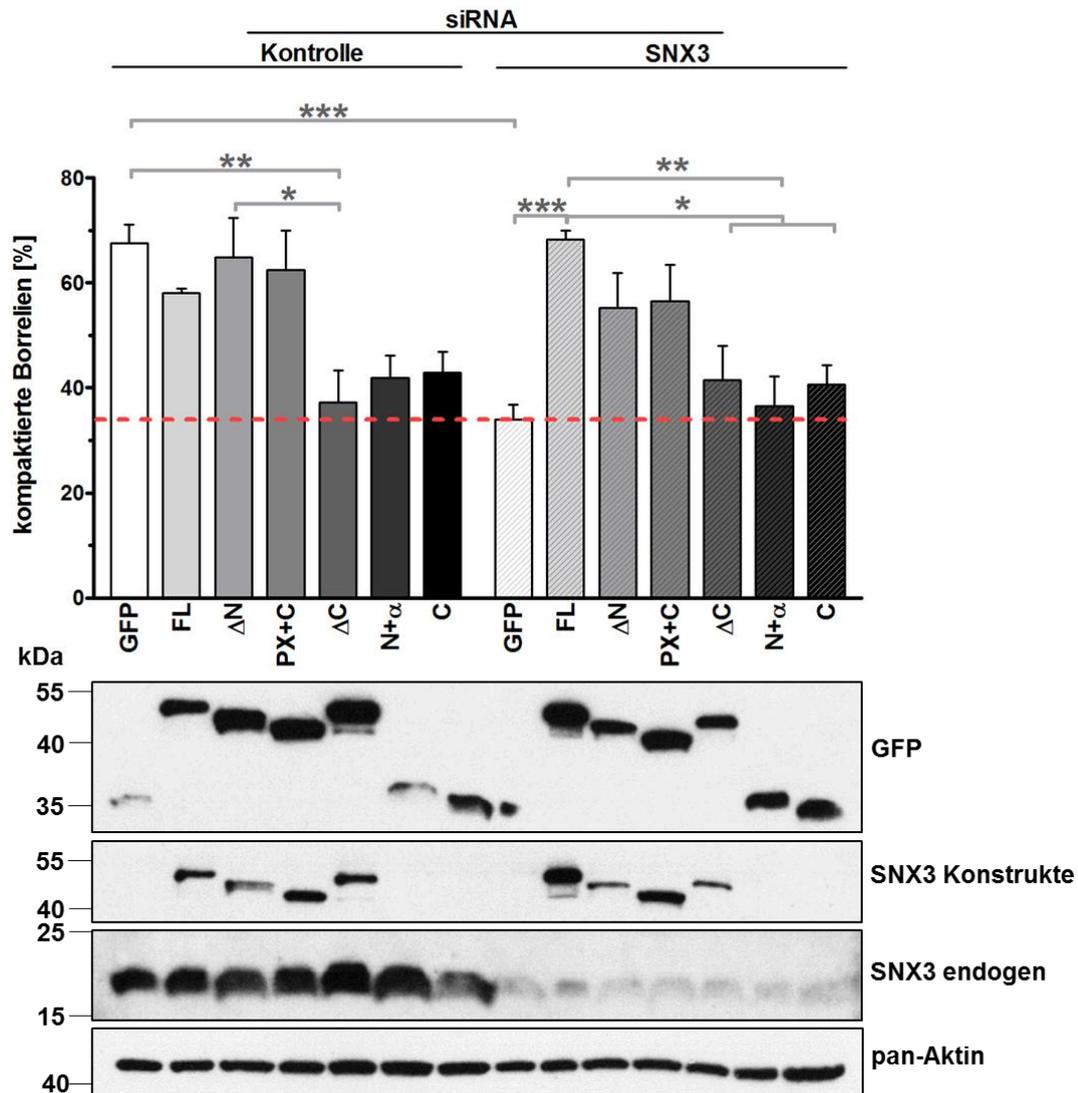


Abb. 22: Der C-Terminus von Sorting Nexin-3 ist für die Kompaktierung von Borrelien essenziell.

Oben: Statistische Auswertung der Kompaktierung von Borrelien in Makrophagen, welche mit Kontroll- und SNX3-spezifischer siRNA behandelt und entsprechenden GFP-SNX3-Teilkonstrukten sowie GFP transfiziert worden sind (Mittelwerte \pm SEM, $n=4 \times 30$). Die rote gestrichelte Linie stellt das bekannte endogene Depletionsniveau von SNX3 in Makrophagen in GFP-überexprimierenden Zellen dar. P-Werte wurden mittels *one-way ANOVA test* berechnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Unten: Western Blots von Makrophagenlysaten, mit welchen die Depletion von SNX3 sowie Überexpression der einzelnen Fusionskonstrukte überprüft wurde. Die Membran wurde mit Anti-GFP-, anti-SNX3- sowie Anti-pan-Aktin-Antikörpern immunochemisch gefärbt und entwickelt.

7.8 Galectin-9 ist ein Bindungspartner von SNX3 und beeinflusst die Kompaktierung von Borrelien

Die zuvor aufgestellte Hypothese, dass die Interaktion des C-terminalen Teils von SNX3 mit einem möglichen, unbekanntem Bindungspartner verantwortlich für eine erfolgreiche Kompaktierung ist, wurde mit Hilfe einer Bindungsstudie von GFP-SNX3 und einer anschließenden Massenspektroskopie überprüft. Hierfür wurde der C-terminale und GFP-fusionierte Teil von SNX3 (GFP-SNX3-C) in Makrophagen überexprimiert, nach Anti-GFP-Immunopräzipitation die resultierenden Lysate gelelektrophoretisch aufgetrennt und über LC-MS analysiert. Parallel erfolgte auch die Expression von GFP in einer anderen Makrophagenpopulation, welches bei der Immunopräzipitation als Negativkontrolle eingesetzt wurde, um potenzielle Bindungspartner, die nur an GFP binden, auszuschließen (Abb. 24A).

Die resultierenden Treffer der massenspektroskopischen Analyse wurden evaluiert und nach Abdeckung der eindeutigen Peptide sortiert. Die potenziell interessanten Kandidaten beinhalteten zytoskelettale Proteine wie CKAP4 und Myosin 1e, Vesikel-assoziierte Proteine wie SNX12, Galectin-9, Rab35 und die Kinesine KIF5A, KIF5B und KIF5C (Abb. 23A). Diese möglichen Interaktionspartner für SNX3 wurden mittels weiterer Immunopräzipitation und Immunfluoreszenzen auf ihre Lokalisation und Interaktion mit dem Borrelienphagosom und SNX3 untersucht.

A

Uniprot-Nr.	Protein	Beschreibung	Abdeckung [%]	Peptide [n]	Eindeutige Peptide [n]	MW [kDa]
O60493	SNX3	Sorting nexin-3	54.3	8	8	18.8
Q9UMY4	SNX12	Sorting nexin-12	9.3	2	2	19.7
Q07065	CKAP4	Cytoskeleton-associated protein 4	7.6	3	3	66.0
Q15286	RAB35	Ras-related protein Rab-35	7.5	1	1	23.0
O00182	LGALS9	Galectin-9	6.2	2	2	39.5
Q12965	MYO1E	Unconventional myosin-1e	5.4	5	2	127.0
Q12840	KIF5A	Kinesin heavy chain isoform 5A	0.7	1	1	117.3
P33176	KIF5B	Kinesin-1 heavy chain	0.7	1	1	109.6
O60282	KIF5C	Kinesin heavy chain isoform 5C	0.7	1	1	109.4

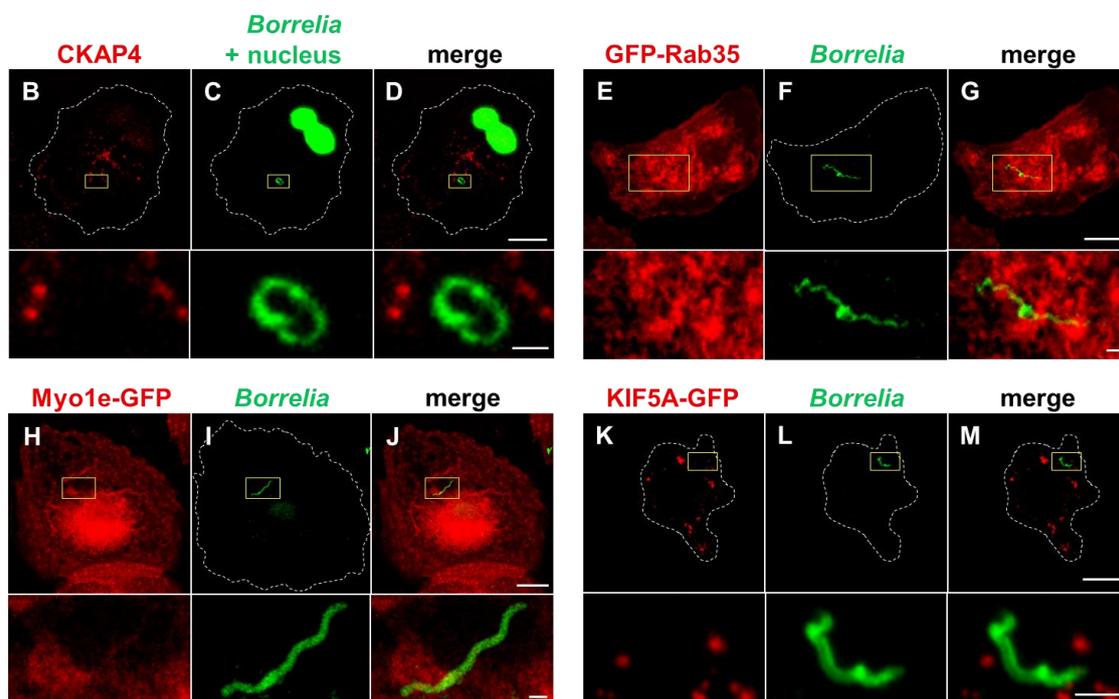


Abb. 23: Identifikation eines Bindungspartners an den C-Terminus von SNX3 mittels Massenspektroskopie. A: Tabelle mit potenziellen Kandidaten, die mittels Anti-GFP-SNX3-C Immunopräzipitation und Massenspektroskopie (MS) ermittelt worden sind. B-M: Immunfluoreszenz-aufnahmen ausgewählter Kandidaten der MS. CKAP4 (B), GFP-Rab35 (E), Myo1e-GFP (H), KIF5A-GFP (K). Makrophagen wurden mit Hoechst33342-gefärbten (C) oder mit Borrelien infiziert, die anschließend mittels Borrelien-spezifischen Antikörpern sichtbar gemacht wurden (F,I,L). Die Darstellung von CKAP4 erfolgte mit CKAP4-spezifischen Antikörpern. Maßstabsbalken: 10 μ m, Vergrößerungen 1 μ m.

Auffallend war hierbei, dass lediglich Galectin-9 kopräzipitiert werden konnte (Abb. 24A) und in Immunfluoreszenzen an Borrelien-haltigen Phagosomen lokalisierte und partiell auch mit SNX3 kolokalisierte (Abb. 24B-F3), wohingegen die anderen MS-Kandidaten keine (Ko-)Lokalisation zeigten (Abb. 23B-M). Der Vergleich der Spuren des Gels/des Blots in Abb. 24A zeigen, dass die Detektion von Galectin-9 in der

Elutionsfraktion von GFP-SNX3-C nicht aufgrund einer Verunreinigung durch das benachbarte Lysat erfolgte, da nach einer Neuentwicklung (*reprobing*) der Galectin-9-Membran mit einem Anti-Borrelien-Antikörper in diesem Blot kein detektierbares Signal erkennbar war. Die Anreicherung von Galectin-9 erscheint in den Immunfluoreszenzen stärker an kompaktierten Phagosomen sowie an Teilen des Borrelienphagosoms, welches anscheinend unmittelbar kompaktiert wird. Um dies detaillierter zu visualisieren, wurde ein GFP-fusioniertes Konstrukt von Galectin-9 kloniert, welches zusammen mit RFP-SNX3 in Makrophagen überexprimiert wurde. Die entsprechend transfizierten Makrophagen wurden mit Hoechst33342-gefärbten Borrelien infiziert und mittels Lebendzellmikroskopie analysiert (Abb. 24G-G4, Video V3). Auffällig war, dass Galectin-9 in einer motilen Vesikelpopulation präsent war, die sich von den SNX3-Vesikeln deutlich unterschied. Interessanterweise geschah die Anreicherung von Galectin-9 ebenfalls an Stellen des Borrelienphagosoms, welches eine starke Membrankurvatur aufwies (Abb. 24G3, gestrichelte Markierung), ebenso wie zeitlich versetzt zu der Anreicherung von SNX3, welches direkt zu Beginn am Phagosom präsent war, wie auch in Abb. 12 zuvor gezeigt. Diese Experimente zeigen, dass Galectin-9 scheinbar von SNX3 aus einem vesikulären Pool zur Oberfläche des Borrelienphagosoms rekrutiert wird.

Inwiefern Galectin-9 auch einen Einfluss auf den wichtigen Prozess der Kompaktierung der Spirochäten hat, wurde weiterführend in einem weiteren Kompaktierungsassay getestet. Hierfür wurden Makrophagen mit Kontroll-, Galectin-9- und SNX3-spezifischer siRNA transfiziert (Abb. 25A) und kompaktierte Borrelien wurden quantifiziert (Abb. 25B). Der Knockdown von Galectin-9 beeinflusste hierbei nicht das Expressionslevel von SNX3 und umgedreht (Abb. 25A). Wie schon zuvor gezeigt (Abb. 10, Abb. 19, Abb. 22), führte die Depletion von SNX3 zu einer Reduzierung der Kompaktierung von Borrelien um etwa 50 %. Deutlich zu erkennen war darüber hinaus, dass die Kompaktierungsrate der Borrelien in Galectin-9-Knockdownzellen ebenfalls signifikant niedriger war als bei Kontrollzellen. Der Doppelknockdown, also die gemeinsame Depletion von Galectin-9 und SNX3 zusammen, zeigte ebenfalls eine Kompaktierungsrate von zirka 50 % gegenüber der Kontrolle. Das Fehlen eines additiven Knockdowneffektes in Bezug auf die

Kompaktierung lässt ebenfalls darauf schließen, dass beide Proteine in einem gemeinsamen Verlauf der Prozessierung von Borrelien-haltigen Phagosomen wirken.

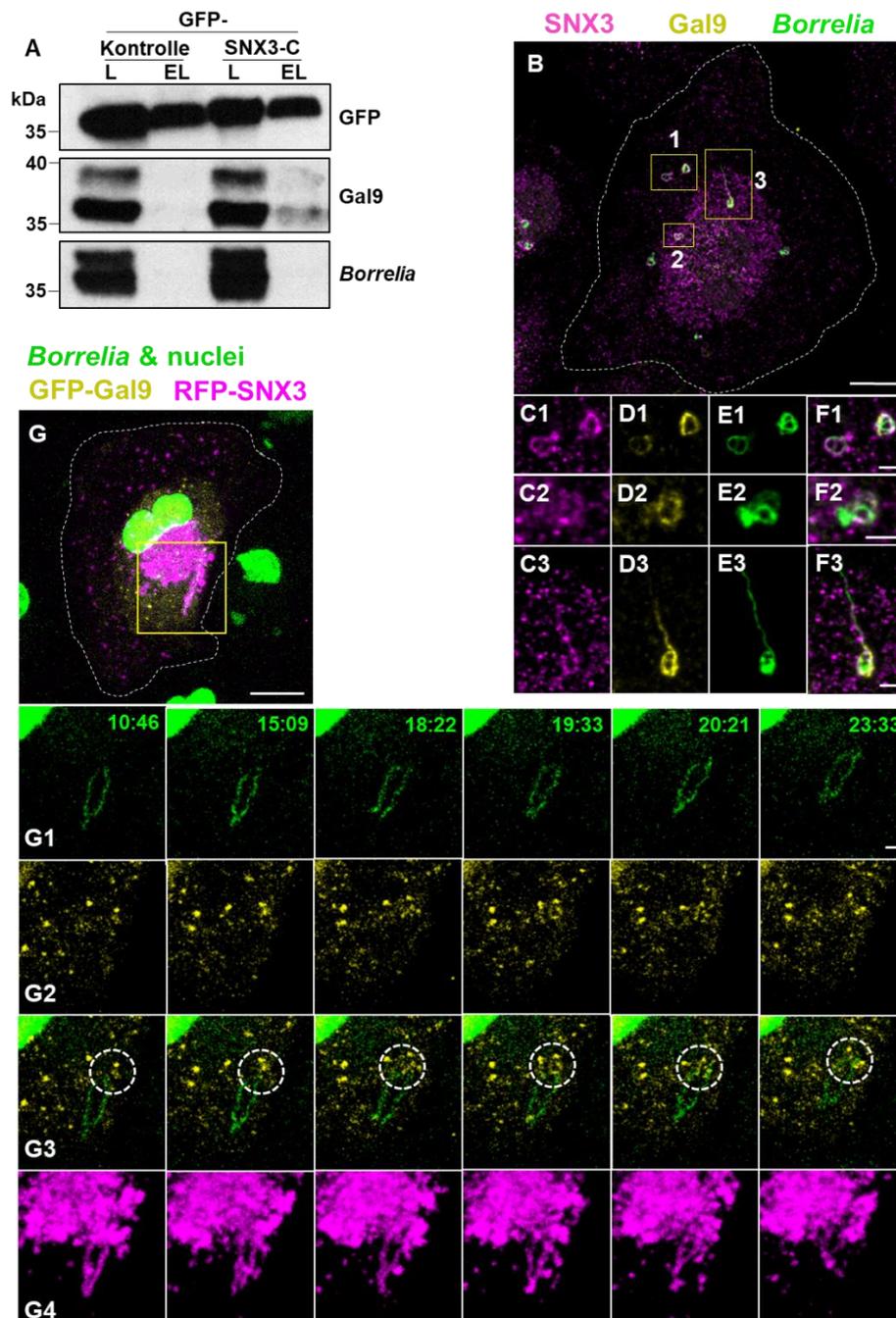


Abb. 24: Galectin-9 interagiert mit dem C-Terminus von SNX3 und reguliert Borrelienkompaktierung. A: Western Blots von Anti-GFP Immunopräzipitationen (IP) der Lysate von mit Borrelien infizierten Makrophagen, die GFP als Kontrolle und GFP-SNX3-C exprimieren. Blotmembran wurde für Gal9, SNX3 und Borrelien entwickelt. L: Lysate, EL: Elutionsfraktionen der IP. B-F: Immunfluoreszenzaufnahmen von mit Borrelien infizierten Makrophagen, die mit SNX3- (C1-3), Gal9 (D1-3) und Borrelien-spezifischer (E1-3) Antikörper gefärbt worden sind. Maßstabsbalken: 10 µm,

Vergrößerungen 1 μm . G: Einzelaufnahmen aus einem Video (V3) einer Lebendzellmikroskopie zeigen die späte Anreicherung von GFP-Gal9 an das Borrelienphagosom. Primäre Makrophagen wurden mit RFP-SNX3 und GFP-Gal9 kotransfiziert und mit Hoechst33342-gefärbten Borrelien kurz vor Beginn der Lebendzellmikroskopie infiziert. Angabe der Zeit in min:sek, Maßstabsbalken: 10 μm , Vergrößerungen 1 μm .

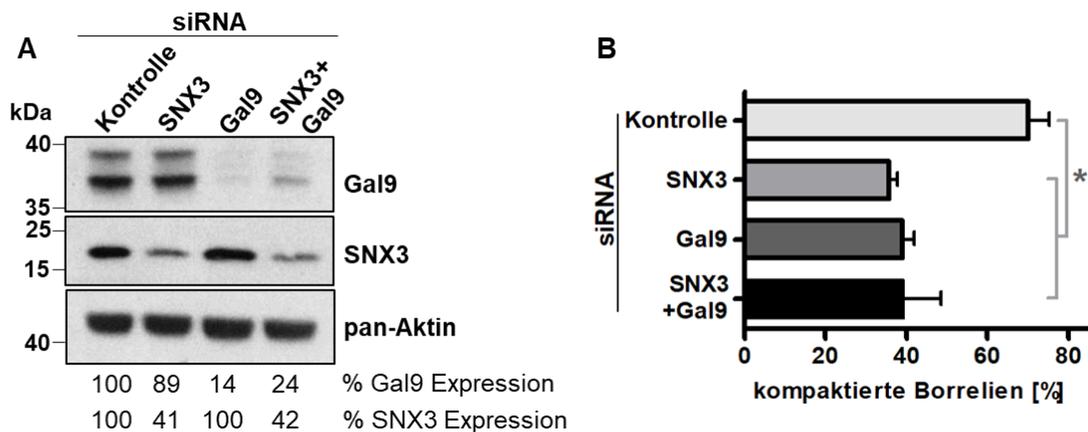


Abb. 25: Kombiniertes Knockdown von SNX3 und Galectin-9. A: Western Blots von Makrophagenlysaten, welche mit SNX3- und Gal9-spezifischen siRNAs, einer Kombination aus beiden sowie einer Kontroll-siRNA (Luziferase) transfiziert wurden. Mittels pan-Aktin als Ladekontrolle konnte die (Rest-) Expression von SNX3 und Gal9 ermittelt werden. B: Statistische Auswertung der Kompaktierung von Borrelien nach Depletierung von SNX3, Gal9 oder beiden zusammen (Mittelwerte \pm SEM, $n=3 \times 30$). P-Werte wurden mittels *one-way ANOVA test* berechnet (* $p < 0,05$).

Um den potenziellen Einfluss von Galectin-9 auf die Phagosomenreifung zu untersuchen, wurden Makrophagen erneut mit Galectin-9-spezifischer und Kontroll-siRNA behandelt sowie mit GFP-exprimierenden Borrelien und DQ-BSA koinkubiert und mit Hilfe des *spinning disk*-Mikroskops untersucht (Abb. 26A-F). Hierbei wurde das Fluoreszenzsignal von DQ-BSA an kompaktierten Borrelienphagosomen gemessen. Diese Messungen zeigten für beide Galectin-9-siRNAs eine signifikante Reduzierung des Fluoreszenzsignals von 18,1 % und 20,1 % im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 26G), was auf eine deutliche Reduzierung der proteolytischen Aktivität in Galectin-9-depletierten Zellen hindeutet. Wie schon im vorherigen DQ-BSA-Assay in SNX3-Knockdownzellen (Abb. 15H) hatte der jeweilige Knockdown keinen Einfluss auf die allgemeine Fluoreszenzintensität des DQ-BSAs in Makrophagen (Abb. 26H).

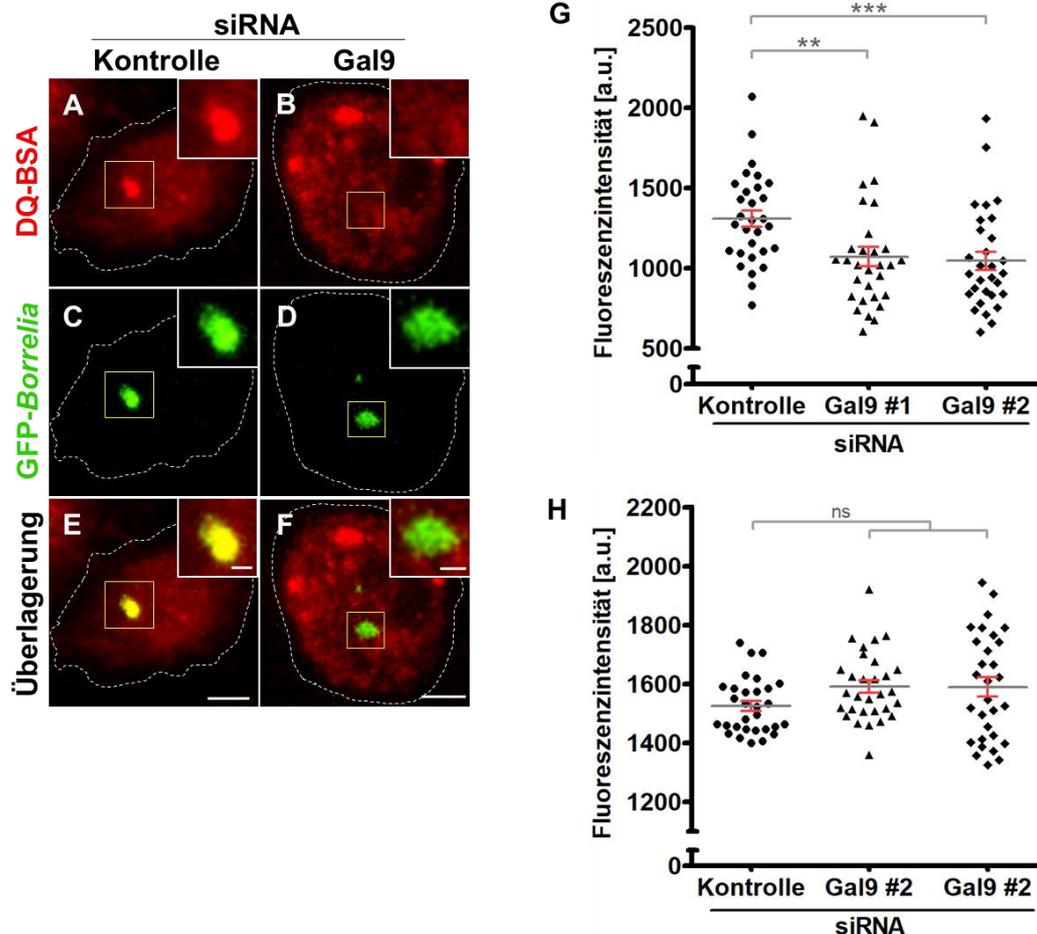


Abb. 26: Galectin-9 beeinflusst die proteolytische Aktivität im Borrelien-haltigen Phagolysosom. A-F: Immunfluoreszenzaufnahmen von mit GFP-Borrelien (C,D) infizierten Makrophagen, die zuvor mit DQ-BSA (A,B) behandelt worden sind. G: Statistische Auswertung der DQ-BSA-basierten Fluoreszenzintensitäten an Borrelienphagosomen in Kontroll- (A,C,E) und Gal9-Knockzellen (B,D,F). H: Statistische Auswertung der allgemeinen DQ-BSA-basierten Fluoreszenzintensitäten in nicht infizierten Gal9-Knockdown- und Kontrollzellen. G+H: Mittelwerte \pm SEM, $n=3 \times 20$, P-Werte wurden mittels *one-way ANOVA test* berechnet (ns: nicht signifikant, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Zur weiteren Charakterisierung der Galectin-9-Vesikelpopulation sowie zur Identifizierung von potenziellen Bindungspartnern wurden Anti-GFP-Immunopräzipitationen von in Makrophagen überexprimierten Volllänge-GFP-Galectin-9 durchgeführt. Die daraus resultierenden Elutionsfraktionen wurden mittels Gelelektrophorese und Massenspektroskopie untersucht. Die Ergebnisse der massenspektroskopischen Analyse wurden erneut nach Abdeckung der eindeutigen Peptide sortiert (Abb. 27A). Vielversprechende Kandidaten waren u.a. die RabGTPasen Rab8a, Rab10 und Rab18, Vesikelregulatoren der Flotillinfamilie (Flotillin-1 und -2) und das Vesikeldockingprotein SNAP23.

A

Uniprot-Nr.	Protein	Beschreibung	Abdeckung [%]	Peptide [n]	Eindeutige Peptide [n]	MW [kDa]
Q9NP72	RAB18	Ras-related protein Rab-18	26.7	4	4	23.0
O00161	SNAP23	Synaptosomal-associated protein 23	11.4	2	2	23.3
P61026	RAB10	Ras-related protein Rab-10	11.0	2	1	22.5
P61006	RAB8A	Ras-related protein Rab-8a	10.6	2	1	23.7
O75955	FLOT1	Flotillin-1	6.6	2	2	47.3
Q14254	FLOT2	Flotillin-2	3.3	1	1	47.0

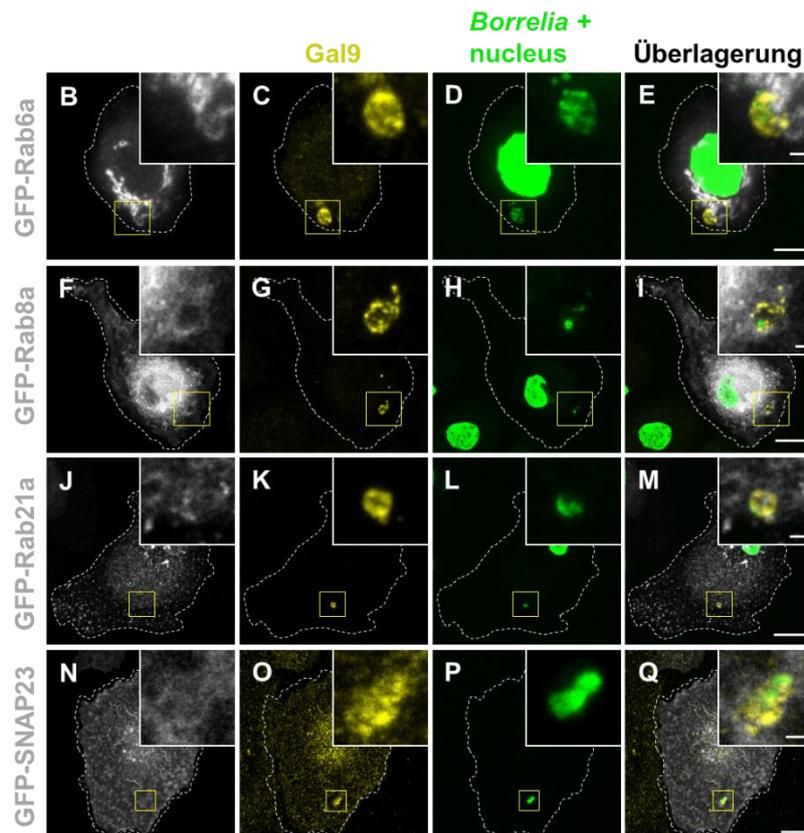


Abb. 27: Charakterisierung der Gal9-Vesikel mittels Massenspektroskopie. A: Tabelle mit potenziellen Kandidaten, die mittels Anti-GFP-Gal9 Immunopräzipitation und Massenspektroskopie (MS) ermittelt worden sind. B-Q: Immunfluoreszenzaufnahmen ausgewählter Kandidaten der MS sowie weiterer potenzieller Bindungspartner. GFP-Rab6a (B), GFP-Rab8a (F), GFP-Rab21a (J), GFP-SNAP23 (N). Alle Zellen wurden mit Anti-Gal9-Antikörper gefärbt (C,G,K,O) und mit Hoechst33342-gefärbten Borrelien infiziert. Maßstäbsbalken: 10 μ m, Vergrößerungen 1 μ m.

Die jeweiligen GFP- oder mCherry-fusionierten Kandidaten wurden in Makrophagen überexprimiert, mit Wildtypborrelien infiziert, und anschließend wurde das endogene Galectin-9 mittels spezifischer Antikörper immungefärbt. Darüber hinaus wurden mit Rab4a, Rab6a, Rab7, Rab11, Rab14, Rab21a, Rab22a, Rab27a und Rab43a weitere

RabGTPasen getestet, die potenziell Bindungspartner bzw. charakteristisch für Galectin-9-Vesikel sein könnten (Daten für Rab4a, Rab7, Rab11, Rab14, Rab22a, Rab27a und Rab43a nicht gezeigt). Von allen getesteten Kandidaten war eine Anreicherung von Rab6a, Rab8a und Rab21 an Borrelien-haltigen Phagosomen erkennbar (Abb. 27B-Q), welche jedoch nicht mit Galectin-9 kolokalisierten. Im Gegensatz dazu war erkennbar, dass mCherry-fusioniertes Flotillin-2 deutlich an Galectin-9-Vesikeln (ko-)lokalisiert war, was auch in der Lebendzellmikroskopie sichtbar gemacht werden konnte (Abb. 28).

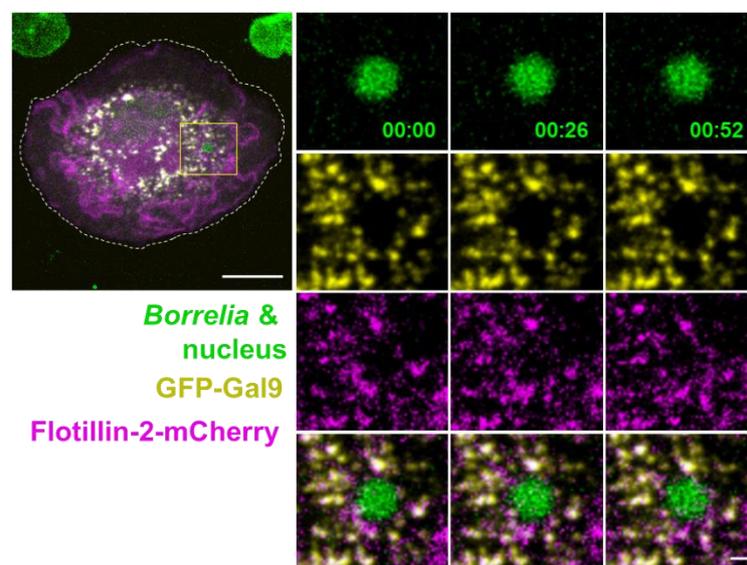


Abb. 28: Flotillin-2 kolokalisiert mit Galectin-9 an Borrelienphagosomen. Einzelaufnahmen aus einem Video einer Lebendzellmikroskopie zeigen die dynamische Kolokalisation von GFP-Gal9 mit Flotillin-2-mCherry am Borrelienphagosom. Primäre Makrophagen wurden mit GFP-Gal9 und Flotillin-2-mCherry kotransfiziert und mit Hoechst33342-gefärbten Borrelien kurz vor Beginn der Lebendzellmikroskopie infiziert. Angabe der Zeit in min:sek, Maßstabsbalken: 10 μ m, Vergrößerungen 1 μ m.

Nachdem die Galectin-9-Vesikel näher charakterisiert werden konnten, wurde untersucht, welche Teile des Proteins Einfluss auf den Prozess der Kompaktierung von Borrelien haben. Galectin-9 besteht aus zwei Kohlenhydrat-Bindedomänen (CRD1 und CRD2), die durch eine verbindende Domäne (linker) verknüpft sind. Darüber hinaus bilden 16 Aminosäuren vor der CRD1 den N-terminalen Teil des Proteins (Abb. 29A: FL). Mit Hilfe dieser Annotationen und Informationen über die einzelnen Abschnitte

von Galectin-9 wurden GFP-fusionierte Teilkonstrukte kloniert, welche zusätzlich siRNA-insensitiv waren (Abb. 29A). Analog zum Komplementierungsassay der SNX3-Teilkonstrukte (Abb. 20 bis Abb. 22) wurden diese GFP-fusionierten Teilkonstrukte zusammen mit GFP und dem Galectin-9-Volllängekonstrukt in Makrophagen überexprimiert, die zuvor mit Kontroll- und Galectin-9-spezifischer siRNA behandelt worden waren, und die Makrophagen anschließend mit Borrelien infiziert. Sowohl das Volllängekonstrukt von Galectin-9 als auch GFP-Gal9- Δ N konnten die Kompaktierungsrate von knapp 60 % wiederherstellen und zeigten zur GFP-Kontrolle einen signifikanten Unterschied auf. Ebenso konnte gezeigt werden, dass der Galectin-9-Knockdown in Makrophagen in diesem Experiment reproduzierbar war. Im Gegensatz zum Volllänge- und Δ N-Konstrukt waren die Teilkonstrukte, denen einerseits der N-Terminus und die CRD1 sowie der linker und CRD2 fehlten (linker+CRD2 und N+CRD1), auf einem Level mit der GFP-Kontrolle und konnten somit die Kompaktierung nicht wiederherstellen. Die beiden letzten Galectin-9-Teilkonstrukte (Δ CRD2 und CRD1+linker) zeigten eine durchschnittliche, nicht-signifikante Reduzierung der Kompaktierungsrate (Abb. 29B). Interessanterweise zeigte lediglich das Δ N-Konstrukt eine vollständige, vesikuläre Verteilung innerhalb der Zellen, vergleichbar mit dem Volllängekonstrukt (Abb. 30B). Das N+CRD1-Konstrukte zeigte eine gemischte, vesikulär-zytosolische Verteilung (Abb. 30D) wohingegen alle anderen überwiegend eine zyotosolische Verteilung aufwiesen (Abb. 30A,C,E). Diese vesikuläre Lokalisation innerhalb der Zellen korrespondierte ebenfalls mit der Fähigkeit der einzelnen Konstrukte, auf die Kompaktierung der Borrelien zu wirken. Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass sowohl die CRD1- als auch die CRD2-Domäne für ein normales Maß an Kompaktierung von Borrelienphagosomen sehr wichtig sind, wogegen der N-Terminus und die linker-Region nicht in diesem Prozess involviert sind.

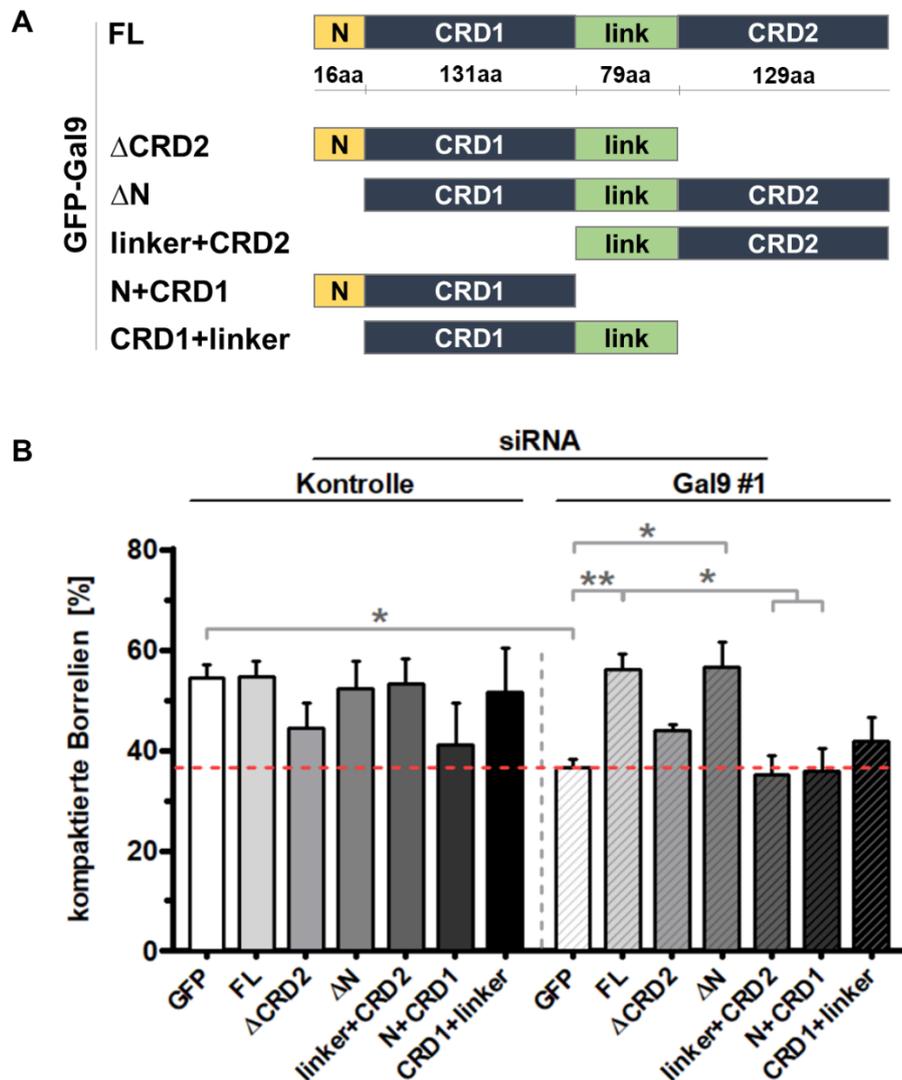


Abb. 29: Die CRD-Domänen sind für die Kompaktierung von Borrelien essenziell. A: Schematische Übersicht der von Gal9-Volllänge (FL) abgeleiteten Teilkonstrukte. N: N-terminale Region von Gal9 (16 aa); CRD1: Kohlenhydratbindedomäne 1 (131 aa), linker: Verbindende Domäne zwischen CRD1 und CRD2 (79 aa), CRD2: Kohlenhydratbindedomäne 2 (129 aa). Alle Teilkonstrukte sind wie das Volllängekonstrukt N-terminal mit GFP fusioniert. B: Statistische Auswertung der Kompaktierung von Borrelien in Makrophagen, welche mit Kontroll- und Gal9-spezifischer siRNA behandelt und entsprechenden GFP-Gal9-Teilkonstrukten sowie GFP transfiziert worden sind (Mittelwerte \pm SEM, $n=4 \times 20$). Die rote gestrichelte Linie stellt das endogene Depletionsniveau von Gal9 in Makrophagen in GFP-überexprimierenden Zellen dar. P-Werte wurden mittels *one-way ANOVA test* berechnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

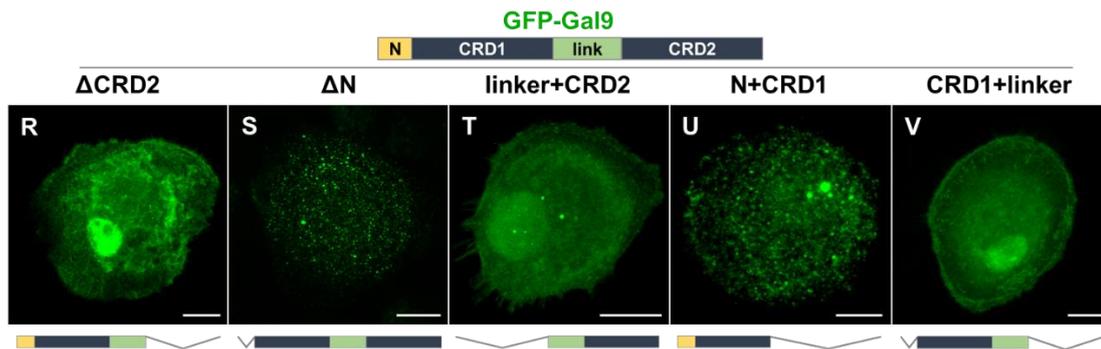


Abb. 30: Intrazelluläres Verteilungsmuster der Expression einzelner Galectin-9-Deletionsmutanten. Oben: Schematischer Überblick über die Domänen des Volllängekonstrukts von Galectin-9. Unterhalb der IF-Bilder sind die einzelnen Deletionskonstrukte zum Vergleich schematisch dargestellt. Maßstabsbalken: 10 μ m.

Die vorangegangenen Daten zeigten, dass höchstwahrscheinlich sowohl die CRD1-, als auch CRD2-Domäne wichtig für die Kompaktierung sind. Beide CRD-Domänen unterscheiden sich in ihrer Spezifität für bestimmte Kohlenhydrate. In vorherigen Arbeiten wurden bestimmte Aminosäuren identifiziert, die für die Bindung unterschiedlicher Kohlenhydrate verantwortlich sind. Dies ist zum einen Alanin-46, welche so genannte Forssmann-Pentasaccharide bindet (Nagae et al., 2008), Asparagin-137, welche Poly-N-Acetyllaktosamine bindet (Nagae et al., 2009) und Arginin-221 für sialysierte Oligosaccharide (Yoshida et al., 2010). In dem Galectin-9-Konstrukt, welches in dieser Arbeit verwendet wurde, befindet sich das verantwortliche Arginin an Position 252, da in der Studie von Yoshida et al. mit einem Galectin-9-Konstrukt gearbeitet wurde, welches eine kurze linker-Region besaß. Um zu überprüfen, ob die Lektinbindeaktivität der beiden Domänen für die Kompaktierung von Borrelien eine Rolle spielt wurden mittels Einfügen von Punktmutationen vier verschiedene Gal9-CRD-Mutanten konstruiert (Abb. 31A). Durch weitere QuikChange-PCR-Reaktionen wurde diese mittels Einfügen von stillen Punktmutationen zu siRNA-insensitiven (Gal9) Konstrukte verändert. Anschließend erfolgte erneut die Expression in Makrophagen, die zuvor mit Kontroll- und Gal9-spezifischer siRNA behandelt worden waren. Auf eine Expression in Makrophagen mit endogenem Gal9-Hintergrund, ausgenommen die GFP-Kontrolle, wurde hierbei diesmal allerdings verzichtet. Wieder wurde die Kompaktierung der Borrelienphagosomen betrachtet (Abb. 31B). Wie schon zuvor erkennbar, war das Volllängekonstrukt nach fast vollständiger Depletierung von Gal9 in der Lage, die

Kompaktierung wiederherzustellen. Alle CRD-Mutanten jedoch zeigten unterschiedliche Kompaktierungslevel, die sich nicht signifikant von den GFP-Kontrollen (mit oder ohne endogenem Gal9-Hintergrund) oder dem Volllängekonstrukt unterschieden. Es ist daher unwahrscheinlich, dass die Bindung verschiedener, spezifischer Kohlenhydrate maßgebend für eine Galectin-9-spezifische Kompaktierung von Borrelien in Makrophagen ist. Zusammengefasst zeigen die Daten für Galectin-9, dass dieses ein neuer Bindungspartner für den C-terminalen Teil von SNX3 ist, in späteren Stadien der Kompaktierung zu Borrelien-haltigen Phagosomen rekrutiert wird und zusammen mit SNX3 gemeinsam im Verlauf der Prozessierung von Borrelien wirkt.

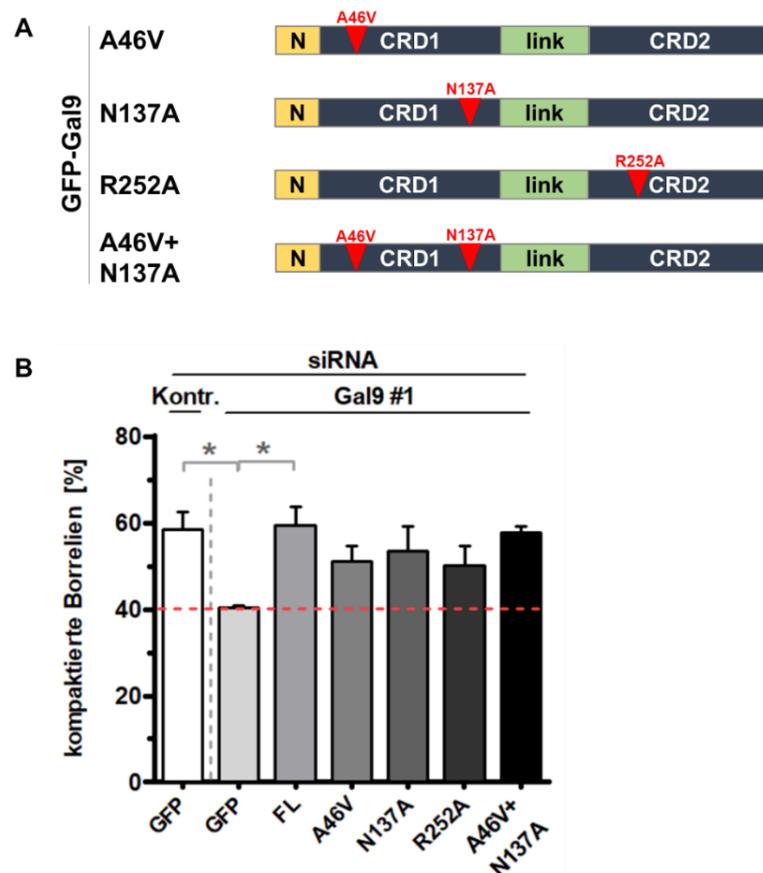


Abb. 31: Die Lektinbindeaktivität hat keinen Einfluss auf die Kompaktierung von Borrelien. A: Schematische Übersicht der CRD-Mutanten. Alle Kontrukte sind wie das Wildtypkonstrukt N-terminal mit GFP fusioniert. B: Statistische Auswertung der Kompaktierung von Borrelien in Makrophagen, welche mit Kontroll- und Gal9-spezifischer siRNA behandelt und entsprechenden GFP-Gal9-CRD-Mutanten sowie GFP transfiziert worden sind (Mittelwerte \pm SEM, $n=3 \times 15$). Die rote gestrichelte Linie stellt das endogene Depletionsniveau von Gal9 in Makrophagen in GFP-überexprimierenden Zellen dar. P-Werte wurden mittels *one-way ANOVA test* berechnet (* $p < 0,05$).

7.9 SNX3 ermöglicht die Rekrutierung von Rab5a und Gal9 an Borrelien-haltige Phagosomen

Alle Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass SNX3 den Kontakt zweier unterschiedlicher Vesikelpopulationen an Borrelien-haltigen Phagosomen ermöglicht, die entweder Rab5a oder Galectin-9 transportieren. Es wurde daher getestet, inwiefern SNX3 für die Rekrutierung von Rab5a und Gal9 wichtig ist. Für diesen Zweck wurden Fluoreszenzintensitäten der Vesikelkandidaten an Borrelienphagosomen in Kontroll- und SNX3-depletierten Makrophagen gemessen. Galectin-9 wurde mittels Gal9-spezifischer Antikörper gefärbt, wohingegen Rab5a als RFP-fusioniertes Konstrukt exprimiert wurde, da die Verwendung eines Rab5a-spezifischen Antikörpers in einem zu hohen Hintergrundrauschen resultierte (Abb. 32A,B). Die Signalintensitäten wurden mittels Phagosomenoberflächen-assoziierten Fluoreszenzsignalen in einem konfokalen Stack von 0,3 μm gemessen und analysiert. Die Intensität war in beiden Fällen deutlich und signifikant reduziert, bei RFP-Rab5a um 54 % (17497 a.u. \pm 2498 a.u. in SNX3-Knockdownzellen und 38078 a.u. \pm 5603 a.u. in Kontrollzellen) (Abb. 32C) und bei Gal9 um 41 % (1685 a.u. \pm 144,5 a.u. in SNX3-Knockdownzellen und 2837 a.u. \pm 291,2 a.u. in Kontrollzellen) (Abb. 32D). Zudem wurde zusätzlich das phagosomale Volumen gemessen und analysiert, um Signalunterschiede innerhalb der Experimente aufgrund unterschiedlicher Phagosomvolumina ausschließen zu können. Die Auswertung zeigte ein annähernd gleiches Volumen für Phagosomen in Kontroll- und SNX3-depletierten Makrophagen, welche sich nicht signifikant voneinander unterschieden. Diese abschließenden Ergebnisse bestätigen erneut die Wichtigkeit von SNX3 im Prozess der Rekrutierung von Rab5a und Galectin-9 an Borrelien-haltige Phagosomen zur weiteren Prozessierung ebendieser.

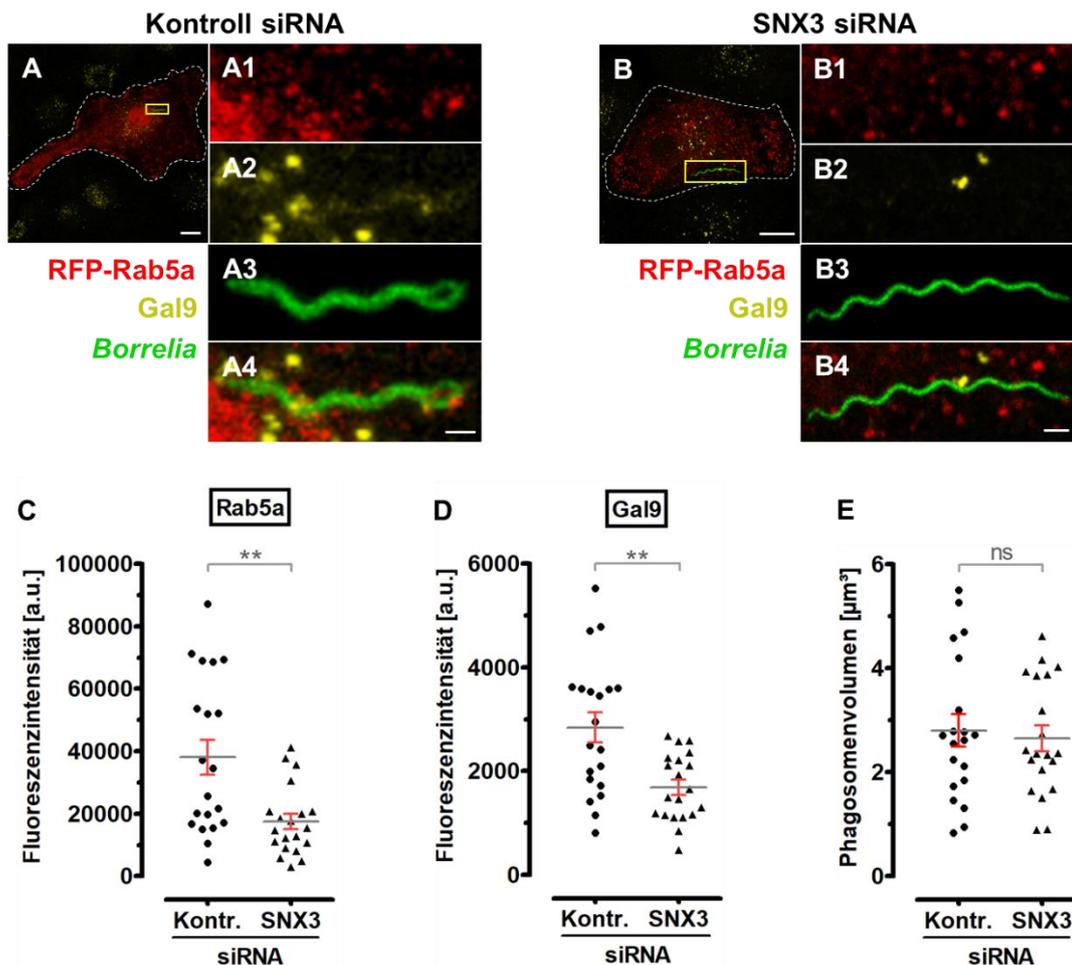


Abb. 32: SNX3 rekrutiert Rab5a und Gal9 zu Borrelien-haltigen Phagolysosomen. A-B4: Immunfluoreszenzaufnahmen von Makrophagen, die RFP-Rab5a überexprimieren (A1,B1) mit Borrelien infiziert worden sind und anschließend mit Gal9-spezifischen (A2,B2) und Borrelien-spezifischen (A3,B3) Antikörpern gefärbt worden sind. Statistische Auswertung der Rab5a- (C) und Gal9-Fluoreszenzintensitäten (D) an Borrelien-haltigen Phagosomen. E: Phagosomales Volumen in μm^3 . C-E: Mittelwerte \pm SEM, $n=3 \times 30$, P-Werte wurden mittels *one-way ANOVA test* berechnet (ns: nicht signifikant, ** $p < 0,01$).

8. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, Proteine und Mechanismen zu identifizieren, die an der Prozessierung und Reifung von Borrelien-haltigen Phagosomen in primären humanen Makrophagen beteiligt sind. Es konnte in einem Screen von ausgewählten Sorting Nexinen gezeigt werden, dass SNX3 als einziger der getesteten Vertreter ein weiterer Regulator der Kompaktierung von *Borrelia burgdorferi* ist. SNX3 ist auf Rab5a-positiven Vesikeln lokalisiert, welche das Borrelien-haltige Phagosom kontaktieren. Die Anreicherung am Phagosom erfolgt direkt nach Aufnahme bis zur vollständigen Kompaktierung der Spirochäten. Dagegen zeigte eine fast vollständige Depletierung von SNX3 eine stark reduzierte Kompaktierungsrate, eine verringerte proteolytische Aktivität in entsprechenden Phagolysosomen sowie ein erhöhtes intrazelluläres Überleben der Spirochäten in Makrophagen. Dies stellt die Bedeutung von SNX3 als wichtigem Regulator der intrazellulären Prozessierung von *Borrelia burgdorferi* in Makrophagen heraus. Zusätzlich ermöglicht SNX3 den Kontakt von Endosomen mit Phagosomen, in dem es Rab5a-positive Vesikel an Phagosomen rekrutiert. Die bedeutende Rolle bei der Kompaktierung von Borrelien und die Reifung der Phagolysosomen durch Rab5a wurde in vorherigen Arbeiten detailliert beschrieben (Naj and Linder, 2015; Naj and Linder, 2017).

8.1 Sorting Nexine – neue Regulatoren der Borrelien-Phagozytose?

Der initiale Screen von neun Vertretern der SNX-Familie zu Beginn zeigte, dass SNX3 mit Abstand am stärksten an Borrelien-haltigen Phagosomen akkumulierte. Sorting Nexin 3 ist einer der kleinsten Vertreter der SNX-Familie mit lediglich einer annotierten PX-Domäne. Viele Mitglieder dieser Familie besitzen zusätzlich noch eine BAR- oder andere Protein-Protein- oder Protein-Lipid-Interaktionsdomänen. Die hier gewählten neun Vertreter der SNX-Familie spiegeln einen kleinen Querschnitt durch die große Gruppe der Sorting Nexine mit insgesamt 33 Mitgliedern wider. Alle in diesem Screen verwendeten Konstrukte wurden aufgrund bestimmter Domänenkompositionen ausgewählt. So war das Vorhandensein einer BAR-Domäne ein Auswahlkriterium, da diese Domäne, wie etwa bei SNX9, Membrantubulierungen

induzieren kann (Park et al., 2014). Weiterhin wurde für SNX9 gezeigt, dass es die Aktinpolymerisierung durch direkte Bindung von N-WASP stimuliert und über Kontakt mit Phosphoinositolen an Membranamformungen während endozytotischer Prozesse mitwirkt (Yarar et al., 2008; Yarar et al., 2007). SNX1 ist, wie bereits beschrieben, an der Organisation des tubulären Netzwerks während Bildung der *Salmonella*-haltigen Vakuolen (SCVs) beteiligt (Bujny et al., 2008). SNX8 dagegen wurde im Zusammenhang mit retrogradem Transport von bakteriellen Shigatoxinen beschrieben (Dyve et al., 2009). Als weiterer SNX-Vertreter mit nur einer PX-Domäne wurde zum Vergleich SNX12 gewählt, welches zirka 80 % Sequenzidentität mit SNX3 besitzt und ebenfalls in Membrantransport- und endosomalen Reifeprozessen beschrieben wurde (Pons et al., 2012; Priya et al., 2017). Eine Anreicherung an Borrelien-haltigen Phagosomen konnte für SNX12 jedoch nicht gezeigt werden. Neben SNX3 zeigte SNX1 eine deutliche Akkumulation an Borrelien-haltigen Phagosomen, funktionelle Experimente wie Kompaktierungsraten nach SNX1- und SNX3-Depletion zeigte jedoch, dass SNX1 nicht funktionell zur Prozessierung von Borrelien in Bezug auf die Kompaktierung beiträgt. Dies bedeutet jedoch nicht, dass nicht noch andere SNXe bei diesem Prozess beteiligt sein könnten. Es kann spekuliert werden, dass von dieser Proteinklasse noch mehr Vertreter unmittelbar oder mit anderen Proteinen zusammen am Borrelienphagosom wirken. Untersuchungen mit noch mehr oder besser allen Vertretern zeigen einen spannenden Ausblick auf die Rolle der SNXe bei der Borrelien-Phagozytose.

Die Lokalisation von SNX3 an Phagosomen wurde sowohl für humane dendritische Zellen als auch für SCVs in HeLa-Zellen beschrieben (Braun et al., 2010; Chua and Wong, 2013). Die Arbeit von Braun et al. zeigte auch, dass PI(3)P und Rab5 eine Rolle in der Ausbildung von Membrantubulierungen spielen. Im Wesentlichen unterscheidet sich jedoch das Modell von Braun et al. von dieser Arbeit: Die SCVs werden von Salmonellen aktiv in den Wirtszellen mit dem Ziel gebildet, eine teilungs- und vermehrungsfähige Umgebung in Abgrenzung zur Wirtszelle zu schaffen. Die Ausbildung der Membrantubuli, die von SNX3 um die Vakuolen gebildet werden, unterstützen das Überleben von Salmonellen. Im Gegensatz dazu führt die Funktion von SNX3 in Borrelien-haltigen Phagosomen in Makrophagen zu einer Kompaktierung, einer Reifung zum Phagolysosom und damit final zum Abbau der Spirochäten. Die Depletion von SNX3 in *Salmonella*-infizierten Zellen führt somit zu einem verringerten

Überleben der Bakterien (Braun et al., 2010), während die Depletion von SNX3 in Borrelien-infizierten Makrophagen zu einer erhöhten Überlebensrate der Spirochäten führt.

Darüber hinaus zeigen sich auch Unterschiede bezüglich der subzellulären Lokalisation von Rab5 bei der Studie von Braun et al. und der vorliegenden Arbeit. Dementsprechend ist Rab5 am *Salmonella*-Phagosom vorhanden und reguliert die Bildung von PI(3)P, was zur Rekrutierung von SNX3 führt. Im Gegensatz dazu ist Rab5a nicht an Borrelien-haltigen Phagosomen präsent, und Vesikel, die sowohl Rab5a als auch SNX3 enthalten, docken an Borrelien-haltigen Phagosomen an, indem SNX3 PI(3)P an erhöhten Membrankrümmungen in der Phagosomenmembran bindet. Darüber hinaus zeigt die Arbeit von Braun et al., dass nicht zwischen den drei Isoformen von Rab5 (Rab5a, Rab5b und Rab5c) unterschieden wurde. So erfolgte die Depletion von Rab5 lediglich mit siRNAs gegen alle drei Isoformen gleichzeitig (Braun et al., 2010). Die vorliegende Arbeit und die Arbeit von Naj und Linder zeigen jedoch, dass spezifisch Rab5a am SNX3-Vesikel präsent ist (Naj and Linder, 2015). Eine Aussage über die anderen beiden Isoformen Rab5b und Rab5c in Bezug auf die Prozessierung von Borrelien-haltigen Phagosomen in Makrophagen kann dennoch zu diesem Zeitpunkt nicht getroffen werden.

8.2 Die PX-Domäne ist essenziell für die Kompaktierung von Borrelien

Rund 77 % der gesamten Aminosäuresequenz von SNX3 werden durch die PX-Domäne abgedeckt. Sie ist der bislang einzig bekannte funktionelle Bestandteil dieses Proteins, indem es Phosphoinositole wie PI(3)P und PI(3,5)P₂ bindet (Cozier et al., 2002). Die bevorzugte Bindung von PI(3)P durch die SNX3-PX-Domäne konnte mit Hilfe eines biochemischen Assays gezeigt werden. Für diesen wurden Membranen verwendet, auf die verschiedenen Phosphoinositole und andere wichtige Phospholipide aufgebracht wurden. Obwohl die Ergebnisse der Immunfluoreszenzaufnahmen eine Anreicherung der PIP-Sensoren von PI(3)P, PI(3,4)P₂, PI(3,4,5)P₃ und PI(4)P darstellten, so zeigte der biochemische *PIP-strip*-Assay, dass SNX3 spezifisch PI(3)P und kein anderes

Phosphatidylinositol bindet. Weiterhin wurde dies durch Versuche bestätigt, bei denen die PI3-Kinaseaktivität mit dem Inhibitor Wortmannin gehemmt und somit die Synthese von 3'-phosphoryliertem Phosphatidylinositol inhibiert wurde. Sowohl der PI(3)P-Sensor p40phox als auch SNX3 konnten in diesen Versuchen nicht mehr an Phagosomen lokalisieren, und die Kompaktierungsrate war ebenfalls stark reduziert. Ein siRNA-insensitives SNX3-Konstrukt, welches innerhalb der PX-Domäne an dem wichtigen Tyrosin-71 mutiert war (Xu et al., 2001a), konnte sowohl nicht an Borrelien-haltigen Phagosomen lokalisieren als auch die ursprüngliche Kompaktierungsrate wiederherstellen. Eine neuere Studie von Lenoir et al. zeigt, dass es neben den bereits bekannten Aminosäuren der PX-Domäne zur PIP-Bindung auch noch eine weitere hochkonservierte und potenziell funktionelle Aminosäure neben Tyrosin-71 gibt. Serin-72 soll hierbei als molekularer Schalter dienen, der als *PIP-stop* bezeichnet wird. Dieser löst SNX3 vom endosomalen Kompartiment nach Phosphorylierung und unterbindet somit die Membranbindung von Sorting Nexin oder Retromerkomplex (Lenoir et al., 2018). Die Daten der Versuche dieser vorliegenden Dissertation zur PX-Domäne zeigen jedoch, dass die Mutation Y71A innerhalb der PX-Domäne die ursprüngliche Kompaktierungsrate nicht wiederherstellen konnte und diese somit auf dem Niveau von fast vollständiger Depletion von endogenem SNX3 war. Eine weitere Mutation bei Serin-72 und damit ein weiterer Effekt durch den von Lenoir et al. gezeigten *PIP-stop*-Mechanismus in Bezug auf Kompaktierung und Prozessierung von Borrelien-haltigen Phagosomen kann vermutlich ausgeschlossen werden. Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass sowohl SNX3 als auch PI(3)P für die regelhafte Kompaktierung von Borrelien erforderlich sind und dass SNX3 nicht an Phagosomen rekrutiert werden kann, wenn kein PI(3)P in der Phagosomenmembran vorhanden ist.

Versuche zur Entstehung von PI(3)P an Borrelien-haltigen Phagosomen durch die PI3-Kinase (PI3K) legen die Vermutung nahe, dass eher Inositole phosphoryliert, anstatt Phosphoinositole wie PI(3,4)P₂ oder PI(3,5)P₂ dephosphoryliert werden. Dies konnte durch Lebendzellmikroskopie genauer betrachtet werden (Daten nicht gezeigt). In diesen Aufnahmen ist zu erkennen, dass sich PI(3)P graduell am Borrelienphagosom anreichert, Rab5a-Vesikel jedoch nur vereinzelt Kontakt mit der Phagosomenoberfläche haben. Es ist bekannt, dass die PI(3)P-Synthese lokal auch an

Rab5a-Vesikeln erfolgt und später durch Fusion mit der endosomalen Membran eingebracht werden kann (Kalin et al., 2016). Die Synthese von PI(3)P an Rab5a-Vesikeln ist unter anderem Voraussetzung für die Bindung des frühen Endosommarkers EEA1 (*early endosome antigen 1*), welcher wiederum für endosomale Fusionsprozesse in Säugerzellen notwendig ist (Lawe et al., 2002; Lawe et al., 2000). Die lokale Rekrutierung einer PI3K durch Rab5a erfolgt jedoch nur bei den p110 β -Untereinheiten der Klasse-I-PI3K, die PI(4,5)P₂ zu PI(3,4,5)P₃ phosphoryliert (Marat and Haucke, 2016). Die Anreicherung von PI(3)P durch Vesikeltransport und -fusion am Borrelienphagosom konnte durch diese Versuche jedoch ausgeschlossen werden. Dagegen konnte die Hypothese unterstützt werden, dass die Synthese von PI(3)P lokal durch die PI3K erfolgt.

PI(3)P selbst ist an Stellen mit hoher Membrankrümmung angereichert, da an diesen die PI3K vorrangig aktiv ist (Hubner et al., 1998; Marat and Haucke, 2016). Dies konnte in verschiedenen Immunfluoreszenzen auch mit dem PI(3)P-Sensor p40phox sowie dem GFP-SNX3-Konstrukt an den stark gekrümmten Stellen der Borrelienhaltigen Phagosomen gezeigt werden. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass diese Anreicherungen von PI(3)P eine Art Andockstelle für Vesikel mit SNX3 und Rab5a sein könnten. Dies würde zudem frühere Beobachtungen bestätigen, die eine Anreicherung von Rab5a an stark gekrümmten Stellen der Phagosomenmembran zeigen (Naj and Linder, 2015). Dies wirft die nächste naheliegende Hypothese auf, ob nicht die helikale Form der Spirochäten selbst für eine effektive Prozessierung in Phagosomen verantwortlich ist, indem sie an den Spitzen der Membrankurvatur lokale Anreicherungen von PI(3)P induziert, die anschließend als Andockstellen für SNX3-Rab5a-Vesikel dienen. Ein solcher Mechanismus würde zudem die Beobachtung erklären, dass SNX3 bis zur vollständigen Kompaktierung der Borrelien in eine globuläre Form dauerhaft am Phagosom akkumuliert ist.

Sorting Nexin 3 bildet, möglicherweise auch aufgrund der Abwesenheit von BAR-Domänen, keine Homodimere und verbleibt als Monomer. Die Heterodimerisierung mit anderen Vertretern der SNX-Familie wurde in einem Alpha-Screen (*Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay*) für SNX8 gezeigt (Sierecki et al., 2014). Die Daten des SNX-Screens dieser vorliegenden Arbeit zeigen jedoch, dass SNX8 kaum am Borrelienphagosom präsent war. Darüber hinaus zeigt die

Arbeit von Sierecki et al. keine anderen Versuche wie Koimmunopräzipitationen, um die Ergebnisse des Alpha-Screens zu unterstützen. Bislang ist bekannt, dass die Bindung von SNX3 an PI(3)P durch seine PX-Domäne eine Interaktion zu einem anderen SNX verhindert (Worby and Dixon, 2002). Die PX-Domäne der SNXe ist weniger in Bezug auf die Aminosäuresequenz hoch konserviert, sondern viel mehr bezüglich ihrer ausgebildeten Sekundär- und Tertiärstrukturen (Teasdale and Collins, 2012; Worby and Dixon, 2002). Es könnte daher auch sein, dass die PX-Domäne von SNX3 auch mit anderen Teilen der Phagosomenoberfläche interagiert. Angesichts der spezifischen Aktivität von SNX3 an Rab5a-positiven Vesikeln und des vergleichbaren Einflusses der SNX3- oder Rab5a-Depletion (jeweils 50-60 % Reduktion) auf die Kompaktierungsrate von Borrelien, scheint dies darauf hinzudeuten, dass SNX3 als einziges Sorting Nexin bei der Rab5a-vermittelten Prozessierung von Borrelien beteiligt ist (Naj and Linder, 2015). Die Bedeutung von Rab5a für die Prozessierung und sogar das intrazelluläre Überleben von Borrelien in Makrophagen wurde schon in früheren Arbeiten gezeigt. So konnte hierbei dargestellt werden, dass die Überlebensrate in Rab5a-depletierten Zellen um das 5-fache erhöht ist (Naj and Linder, 2015).

8.3 Der C-Terminus von SNX3 rekrutiert eine zweite Vesikelpopulation

Die Versuche mit SNX3-Depletierung und anschließender Überprüfung auf Kompaktierung zeigen, dass SNX3 eine spezifische und wichtige Rolle bei der Prozessierung von Borrelien einnimmt. Diese Funktion kann scheinbar auch durch eine andere SNX Isoform nicht ersetzt werden. Wie bereits erwähnt, besteht SNX3 zum größten Teil aus der PX-Domäne und besitzt weiterhin einen 25 Aminosäure langen N-Terminus sowie einen 11 Aminosäuren langen, unstrukturierten C-Terminus (Abb. 33 unten). Der N-Terminus zeigt von Aminosäure 16-25 eine kleine Alpha-Helix als Sekundärstruktur (Abb. 33 oben) (Lucas et al., 2016). Auf Basis dieser Sekundär- und Tertiärstrukturen des Röntgenkristalls von Lucas et al. sowie den Informationen aus den Versuchen zur PX-Domäne zuvor, wurden Teilkonstrukte von SNX3 kloniert und in Bezug auf Lokalisation und Funktion getestet.

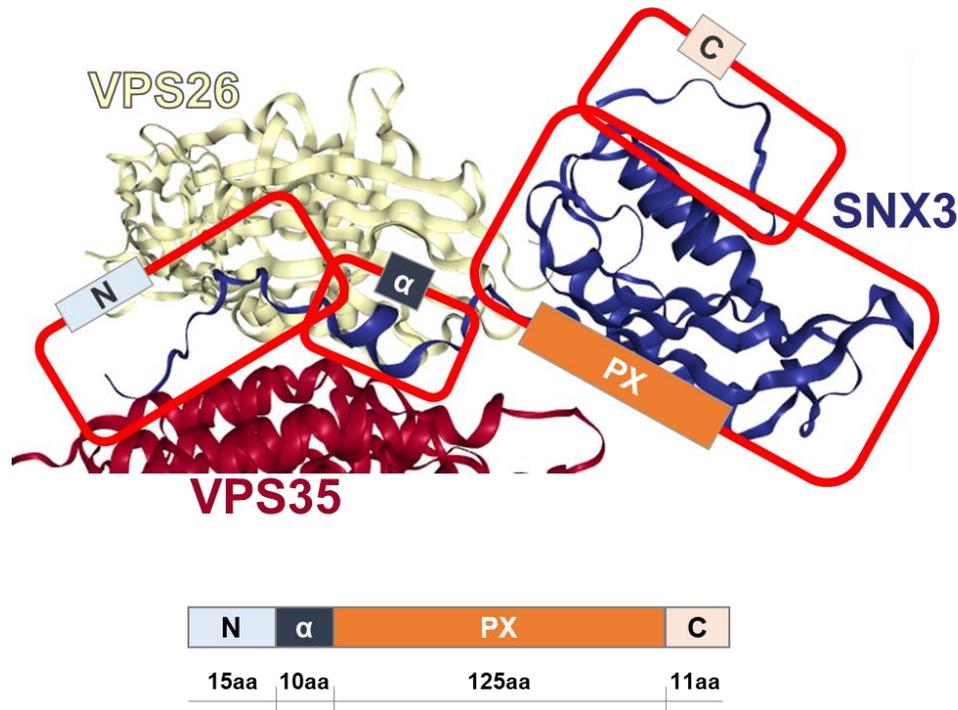


Abb. 33: Strukturelle Einteilung von SNX3 anhand von Röntgenkristallstrukturen und bereits annotierten Domänen. Oben: Die Kristallstruktur von Lucas et al. stellte die Basis für Domänen-Einteilung von SNX3 und die nachfolgende Klonierung der SNX3-Teilkonstrukte dar. Der N- und α -Teil ist für die Bindung des Retromerkomplexes verantwortlich (VPS26, creme und VPS35, rot). Der C-Terminus ist nicht Teil der SNX3-Retromer-Interaktion. Modifiziert nach Lucas et al. (2016). Unten: Schematische Darstellung der Einteilung von SNX3 analog zu Abb. 20 zur Übersicht.

Wie erwartet, ist die PX-Domäne absolut notwendig, um SNX3 an das Phagosom zu binden und damit die Kompaktierung der Borrelien innerhalb der Phagosomen voranzutreiben. Der N-Terminus bindet mit Aminosäuren des N- und α -Teils an den Retromerkomplex, bestehend aus VPS26 und VPS35, welcher kürzlich als wichtiger Regulator für das Recycling von Wntless-Proteinen an Endosomen gezeigt wurde (McGough et al., 2018). Ein ähnlicher Mechanismus könnte daher theoretisch auch für das Membranrecycling an Borrelien-haltigen Phagosomen verantwortlich sein. Der Verlust beider N-terminaler Teile (Konstrukte ΔN , PX+C) zeigte jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Kompaktierung von Borrelien. Es könnte daher sein, dass der SNX3-Retromerkomplex beim Membran- und Proteinrecycling von Borrelienphagosomen eine Rolle spielt. Zumindest scheint sein möglicher Einfluss auf die Kompaktierung und Prozessierung von Borrelien begrenzt zu sein.

Bemerkenswerterweise funktioniert der SNX3-Retromerkomplex unabhängig von solchen Retromerkomplexen, die SNX-PX-BAR-Proteine beinhalten (Lucas et al., 2016). Diese anderen Komplexe könnten daher möglicherweise eine Rolle bei der intrazellulären Prozessierung von Borrelien spielen.

Im Gegensatz zum N-Terminus ist der kurze C-Terminus von SNX3 für die Lokalisation und Funktion von SNX3 an Borrelien-haltigen Phagosomen von entscheidender Bedeutung. Mit Hilfe von vergleichenden Immunopräzipitationen von GFP und GFP-markiertem SNX3-C sowie anschließender Massenspektroskopie konnten mehrere potenzielle Bindungspartner der C-terminalen Region von SNX3 identifiziert werden. Dies umfasste die Kinesine KIF5A, KIF5B und KIF5C, zytoskelettale Proteine wie CKAP4 und Myosin 1e sowie Vesikel-assoziierte Proteine. Von allen in getesteten Kandidaten zeigte Galectin-9 als einziger Kandidat in Immunfluoreszenzfärbungen deutliche Akkumulationen an Borrelien-haltigen Phagosomen und konnte in Immunopräzipitationen zusammen mit SNX3 kopräzipitiert werden. Während mögliche Rollen für diese anderen Kandidatenproteine nicht ausgeschlossen werden können, so zeigen die ersten Versuche, dass alle anderen getesteten Kandidaten wohl keinen signifikanten Einfluss auf die SNX3-abhängige Prozessierung von Borrelien haben. Auffällig ist, dass nur ein kleiner Teil des gesamten zellulären Galectin-9-Pools mit dem SNX3-C-Terminus gemeinsam präzipitiert wurde, was höchstwahrscheinlich den Anteil an Galectin-9 darstellt, der an Borrelienphagosomen akkumuliertes SNX3 bindet.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Galectin-9 bei der Prozessierung von Borrelienphagosomen eine entscheidende Rolle einnimmt. Dies konnte beispielsweise mit siRNA-vermittelter Depletion von Galectin-9 in Bezug auf die Kompaktierung von Borrelien gezeigt werden. Zudem zeigten kombinierte Knockdowns von SNX3 und Galectin-9 keinen additiven Effekt, was auf eine Aktivität im gleichen Verlauf der Kompaktierung von Borrelien schließen lässt. Konfokale Aufnahmen von lebenden Makrophagen zeigen, dass Galectin-9 in einer Vesikelpopulation vorliegt, die sich deutlich von Rab5a-SNX3-Vesikeln unterscheidet. Galectin-9-Vesikel wurden größtenteils in späteren Stadien der Phagozytose von Borrelien zum Phagosom rekrutiert, wobei SNX3, wie zuvor schon gezeigt, bereits am

Phagosom akkumuliert war. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass Galectin-9 während der Prozessierung von Borrelien im Anschluss an die Rekrutierung von SNX3 wirkt.

Die Verwendung verschiedener Deletionskonstrukte zeigte, dass beide Kohlenhydratbindedomänen (CRDs) für die Lokalisierung von Galectin-9 an Vesikeln und auch für die Kompaktierung von Borrelien wichtig sind. Dagegen waren Galectin-9-Konstrukte mit Mutationen in beiden CRDs, bei denen die Bindung an bestimmte Kohlenhydrate gestört war, jedoch in der Lage, die ursprüngliche Kompaktierungsrate in Makrophagen wiederherzustellen. Dies deutet darauf hin, dass die Bindung dieser bestimmten Kohlenhydrate keine Bedeutung in Bezug auf die Kompaktierung von Borrelien hat. Es kann jedoch zu diesem Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden, dass Galectin-9 trotzdem durch seine Kohlenhydrat-bindenden Aktivitäten die Kompaktierung beeinflusst, beispielsweise durch die Bindung anderer Kohlenhydrate oder glykosylierter Proteine.

Galectine wurden ursprünglich als Bindungspartner von Kohlenhydraten auf der Zelloberfläche beschrieben, später wurden ihnen weitere Funktionen, z. B. als Regulatoren von intrazellulären Protein- und Membran-Transportprozessen zugeschrieben (Barondes et al., 1994a; Barondes et al., 1994b; Johannes et al., 2018). Es wurde beispielsweise gezeigt, dass Galectin-9 an der Reaktion auf lysosomale Membranschäden beteiligt ist, indem es AMPK aktiviert und Infektionen mit Mykobakterien in humanen Makrophagen mittels Induktion der IL-1 β -Sekretion begrenzt (Jia et al., 2019; Sada-Ovalle et al., 2012). Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die Oligomerisierung von Galectinen mit der Induzierung von Membrankrümmungen einhergeht (Johannes et al., 2016; Lakshminarayan et al., 2014). Daher wäre es sehr interessant zu untersuchen, inwiefern Galectin-9 am Kompaktierungs-Prozess von Borrelienphagosomen, der auch eng mit Membrantubulierungen verbunden ist, beteiligt ist.

Galectin-9 wurde in dieser vorliegenden Arbeit als Interaktionspartner für den C-Terminus von SNX3 identifiziert. Analog dazu wurde in einem ähnlichen Ansatz GFP-Galectin-9 in Makrophagen überexprimiert und mittels Anti-GFP-Immunopräzipitation und Massenspektroskopie nach Bindungspartnern für Galectin-9 gesucht. In anschließenden Immunfluoreszenzaufnahmen und Lebendzellmikroskop-Videos konnte gezeigt werden, dass die überwiegende Mehrheit

der Galectin-9-haltigen Vesikel ebenfalls positiv für Flotillin-2 ist, welches auch als Reggie-1 bekannt ist. Die Proteine Reggie-1 und Reggie-2 wurden ursprünglich in Bezug auf Axonenneubildung in Neuronen entdeckt. Anschließend wurden sie unabhängig voneinander als Marker von *lipid rafts* in sogenannten Flotationsassays identifiziert und daher als Flotilline bezeichnet (Stuermer, 2010). Flotillin-2 ist an Membran- und Proteinrecyclingprozessen beteiligt, und es wurde bereits gezeigt, dass Flotilline mit der Rab11a/SNX4-Recyclingmaschinerie assoziieren, um beispielsweise Transportprozesse von E-Cadherinen zu kontrollieren (Meister and Tikkanen, 2014; Solis et al., 2013). In MDA-MB-231-Zellen, einer Brustkrebszelllinie, sind Flotilline mit Rab7-positiven endosomalen Recycling-Untereinheiten assoziiert und regulieren dabei Transportprozesse der Matrixmetalloproteinase MT1-MMP (Planchon et al., 2018). Meister und Tikkanen beschreiben die Funktion von Flotillinen eher als „Flotillin-assoziierte“ anstatt „Flotillin-abhängige“ Endozytose, da Signalwege der Endo- bzw. Phagozytose streng genommen nicht mechanistisch von Flotillinen als struktureller Komponente abhängig sind (Meister and Tikkanen, 2014). Dies bedarf ebenfalls weiterer Untersuchungen, um die Rolle der Flotilline in Bezug auf phagozytotische Prozesse und hier speziell im Fall der intrazellulären Prozessierung von Borrelien durch Immunzellen darzustellen.

Kurz zusammengefasst zeigen die Daten dieser vorliegenden Arbeit, dass

1. SNX3 den Kontakt von Rab5a-positiven Endosomen und Borrelien-haltigen Phagosomen über Bindung von PI(3)P ermöglicht
2. SNX3 eine Plattform für die Rekrutierung eines weiteren Interaktors über den bislang nicht charakterisierten C-Terminus bietet
3. SNX3 gemeinsam mit Galectin-9 bei der intrazellulären Kompaktierung von Borrelien eine wichtige Rolle spielt
4. die Proteingruppen der Galectine und Flotilline genauer in Bezug auf die intrazelluläre Prozessierung von Borrelien in Immunzellen weiter untersucht werden sollten
5. die Morphologie der helikal-gewundenen Spirochäten *Borrelia burgdorferi* möglicherweise die phagosomale Prozessierung begünstigt und die Borrelie damit sogar ihren eigenen Abbau während der Phagozytose in Makrophagen begünstigt.

Eine schematische Darstellung des Modells der Prozessierung von *Borrelia burgdorferi* in primären humanen Makrophagen durch SNX3, Rab5a und Galectin-9 zeigt Abb. 34.

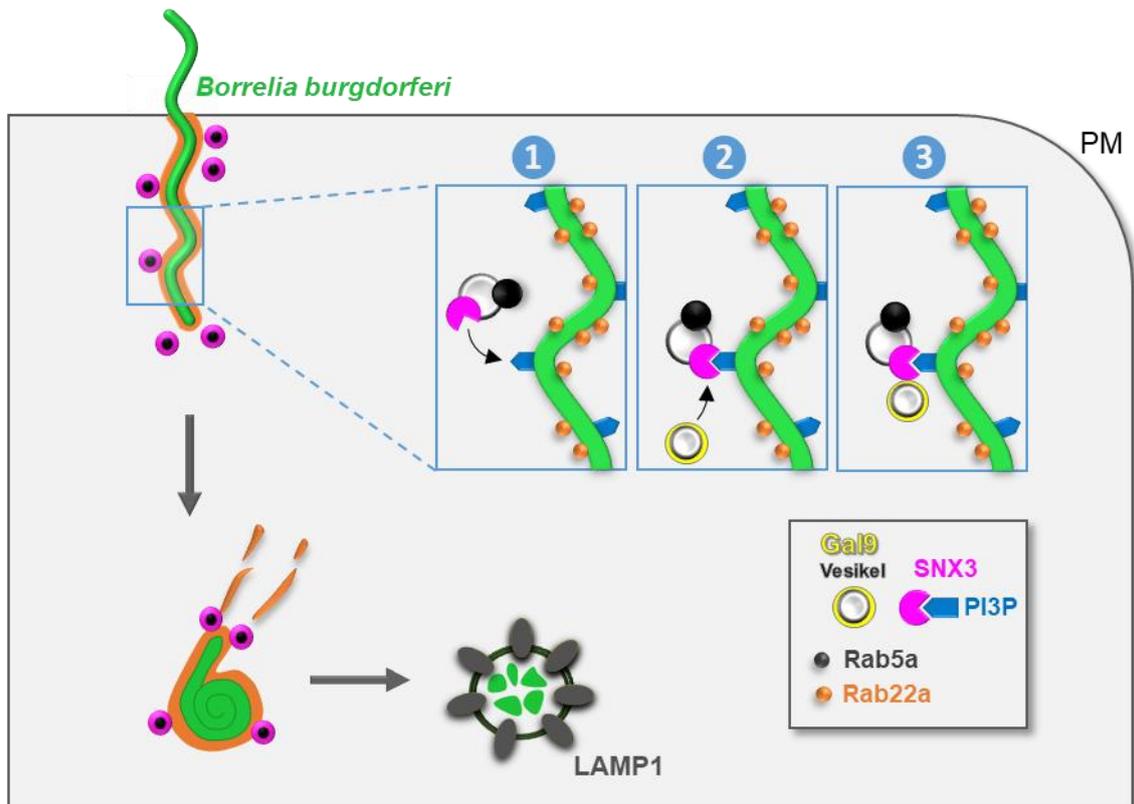


Abb. 34: Zusammenfassendes Modell zum Mechanismus der Prozessierung von *Borrelia burgdorferi* in primären humanen Makrophagen durch SNX3, Rab5a und Galectin-9. Borrelien werden durch Makrophagen direkt in ein mit Rab22a-besetztes Phagosom internalisiert, welches von Rab5a-Vesikeln, die ebenfalls SNX3 tragen, kontaktiert wird. SNX3 ermöglicht die Bindung von Rab5a-Vesikeln an das Borrelienphagosom durch Bindung von PI(3)P, welches aufgrund der helikalen Morphologie der Borrelien an Membrankrümmungen stark angereichert ist (1). SNX3 rekrutiert dann über seinen C-Terminus eine zweite Vesikelpopulation mit Galectin-9 (2,3). Sowohl Rab5a als auch Galectin-9 tragen zur Kompaktierung der Spirochäten, zur phagolysosomalen Reifung und dem finalen Abbau in LAMP1-positiven Phagolysosomen der Borrelien in Makrophagen bei. PM: Plasmamembran der Makrophagen.

9. Literaturverzeichnis

- Aberer, E., and P.H. Duray. 1991. Morphology of *Borrelia burgdorferi*: structural patterns of cultured borreliae in relation to staining methods. *J Clin Microbiol.* 29:764-772.
- Barondes, S.H., V. Castronovo, D.N. Cooper, R.D. Cummings, K. Drickamer, T. Feizi, M.A. Gitt, J. Hirabayashi, C. Hughes, K. Kasai, and et al. 1994a. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell.* 76:597-598.
- Barondes, S.H., D.N. Cooper, M.A. Gitt, and H. Leffler. 1994b. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem.* 269:20807-20810.
- Baumann, T., S. Affentranger, and V. Niggli. 2012. Evidence for chemokine-mediated coalescence of preformed flotillin hetero-oligomers in human T-cells. *J Biol Chem.* 287:39664-39672.
- Benach, J.L., H.B. Fleit, G.S. Habicht, J.L. Coleman, E.M. Bosler, and B.P. Lane. 1984. Interactions of phagocytes with the Lyme disease spirochete: role of the Fc receptor. *J Infect Dis.* 150:497-507.
- Berger, B.W. 1984. Erythema chronicum migrans of Lyme disease. *Arch Dermatol.* 120:1017-1021.
- Borchers, A.T., C.L. Keen, A.C. Huntley, and M.E. Gershwin. 2015. Lyme disease: a rigorous review of diagnostic criteria and treatment. *J Autoimmun.* 57:82-115.
- Bottcher, R.T., C. Stremmel, A. Meves, H. Meyer, M. Widmaier, H.Y. Tseng, and R. Fassler. 2012. Sorting nexin 17 prevents lysosomal degradation of beta1 integrins by binding to the beta1-integrin tail. *Nature cell biology.* 14:584-592.
- Bowman, A.S., J.R. Sauer, K. Zhu, and J.W. Dillwith. 1995. Biosynthesis of salivary prostaglandins in the lone star tick, *Amblyomma americanum*. *Insect Biochem Mol Biol.* 25:735-741.
- 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.
- Braun, V., A. Wong, M. Landekic, W.J. Hong, S. Grinstein, and J.H. Brumell. 2010. Sorting nexin 3 (SNX3) is a component of a tubular endosomal network induced by *Salmonella* and involved in maturation of the *Salmonella*-containing vacuole. *Cell Microbiol.* 12:1352-1367.
- Bujny, M.V., P.A. Ewels, S. Humphrey, N. Attar, M.A. Jepson, and P.J. Cullen. 2008. Sorting nexin-1 defines an early phase of *Salmonella*-containing vacuole-remodeling during *Salmonella* infection. *J Cell Sci.* 121:2027-2036.
- Burgdorfer, W., A.G. Barbour, S.F. Hayes, J.L. Benach, E. Grunwaldt, and J.P. Davis. 1982. Lyme disease-a tick-borne spirochetosis? *Science.* 216:1317-1319.
- Caimano, M.J., R. Iyer, C.H. Eggers, C. Gonzalez, E.A. Morton, M.A. Gilbert, I. Schwartz, and J.D. Radolf. 2007. Analysis of the RpoS regulon in *Borrelia burgdorferi* in response to mammalian host signals provides insight into RpoS function during the enzootic cycle. *Mol Microbiol.* 65:1193-1217.
- Carman, C.V. 2009. Mechanisms for transcellular diapedesis: probing and pathfinding by 'invadosome-like protrusions'. *J Cell Sci.* 122:3025-3035.
- Carroll, J.A., C.F. Garon, and T.G. Schwan. 1999. Effects of environmental pH on membrane proteins in *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun.* 67:3181-3187.
- Casjens, S. 1998. The diverse and dynamic structure of bacterial genomes. *Annu Rev Genet.* 32:339-377.

- Casjens, S., N. Palmer, R. van Vugt, W.M. Huang, B. Stevenson, P. Rosa, R. Lathigra, G. Sutton, J. Peterson, R.J. Dodson, D. Haft, E. Hickey, M. Gwinn, O. White, and C.M. Fraser. 2000. A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Mol Microbiol.* 35:490-516.
- Chabot, S., Y. Kashio, M. Seki, Y. Shirato, K. Nakamura, N. Nishi, T. Nakamura, R. Matsumoto, and M. Hirashima. 2002. Regulation of galectin-9 expression and release in Jurkat T cell line cells. *Glycobiology.* 12:111-118.
- Charon, N.W., and S.F. Goldstein. 2002. Genetics of motility and chemotaxis of a fascinating group of bacteria: the spirochetes. *Annu Rev Genet.* 36:47-73.
- Chou, F.C., H.Y. Chen, C.C. Kuo, and H.K. Sytwu. 2018. Role of Galectins in Tumors and in Clinical Immunotherapy. *Int J Mol Sci.* 19.
- Chua, R.Y., and S.H. Wong. 2013. SNX3 recruits to phagosomes and negatively regulates phagocytosis in dendritic cells. *Immunology.* 139:30-47.
- Cozier, G.E., J. Carlton, A.H. McGregor, P.A. Gleeson, R.D. Teasdale, H. Mellor, and P.J. Cullen. 2002. The phox homology (PX) domain-dependent, 3-phosphoinositide-mediated association of sorting nexin-1 with an early sorting endosomal compartment is required for its ability to regulate epidermal growth factor receptor degradation. *J Biol Chem.* 277:48730-48736.
- Cullen, P.J. 2008. Endosomal sorting and signalling: an emerging role for sorting nexins. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9:574-582.
- Cullen, P.J., and H.C. Korswagen. 2011. Sorting nexins provide diversity for retromer-dependent trafficking events. *Nature cell biology.* 14:29-37.
- Cutler, S.J. 2010. Relapsing fever--a forgotten disease revealed. *J Appl Microbiol.* 108:1115-1122.
- Dolan, M.C., J. Piesman, M.L. Mbow, G.O. Maupin, O. Peter, M. Brossard, and W.T. Golde. 1998. Vector competence of *Ixodes scapularis* and *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) for three genospecies of *Borrelia burgdorferi*. *J Med Entomol.* 35:465-470.
- Dombrowski, C., W. Kan, M.A. Motaleb, N.W. Charon, R.E. Goldstein, and C.W. Wolgemuth. 2009. The elastic basis for the shape of *Borrelia burgdorferi*. *Biophys J.* 96:4409-4417.
- Dyve, A.B., J. Bergan, A. Utskarpen, and K. Sandvig. 2009. Sorting nexin 8 regulates endosome-to-Golgi transport. *Biochem Biophys Res Commun.* 390:109-114.
- Elwell, C.A., N. Czudnochowski, J. von Dollen, J.R. Johnson, R. Nakagawa, K. Mirrashidi, N.J. Krogan, J.N. Engel, and O.S. Rosenberg. 2017. Chlamydia interfere with an interaction between the mannose-6-phosphate receptor and sorting nexins to counteract host restriction. *Elife.* 6.
- Enkelmann, J., M. Bohmer, V. Fingerle, C. Siffczyk, D. Werber, M. Littmann, S.S. Merbecks, C. Helmeke, S. Schroeder, S. Hell, U. Schlotthauer, F. Burckhardt, K. Stark, A. Schielke, and H. Wilking. 2018. Incidence of notified Lyme borreliosis in Germany, 2013-2017. *Sci Rep.* 8:14976.
- Fairn, G.D., and S. Grinstein. 2012. How nascent phagosomes mature to become phagolysosomes. *Trends Immunol.* 33:397-405.
- Fire, A., S. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver, and C.C. Mello. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 391:806-811.

- Fortuna-Costa, A., A.M. Gomes, E.O. Kozlowski, M.P. Stelling, and M.S. Pavao. 2014. Extracellular galectin-3 in tumor progression and metastasis. *Front Oncol.* 4:138.
- Fraser, C.M., S. Casjens, W.M. Huang, G.G. Sutton, R. Clayton, R. Lathigra, O. White, K.A. Ketchum, R. Dodson, E.K. Hickey, M. Gwinn, B. Dougherty, J.F. Tomb, R.D. Fleischmann, D. Richardson, J. Peterson, A.R. Kerlavage, J. Quackenbush, S. Salzberg, M. Hanson, R. van Vugt, N. Palmer, M.D. Adams, J. Gocayne, J. Weidman, T. Utterback, L. Watthey, L. McDonald, P. Artiach, C. Bowman, S. Garland, C. Fuji, M.D. Cotton, K. Horst, K. Roberts, B. Hatch, H.O. Smith, and J.C. Venter. 1997. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature.* 390:580-586.
- Freeman, G.J., J.M. Casasnovas, D.T. Umetsu, and R.H. DeKruyff. 2010. TIM genes: a family of cell surface phosphatidylserine receptors that regulate innate and adaptive immunity. *Immunol Rev.* 235:172-189.
- Goldstein, S.F., N.W. Charon, and J.A. Kreiling. 1994. *Borrelia burgdorferi* swims with a planar waveform similar to that of eukaryotic flagella. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:3433-3437.
- Gordon, S. 2016. Phagocytosis: An Immunobiologic Process. *Immunity.* 44:463-475.
- Hammond, G.R., and T. Balla. 2015. Polyphosphoinositide binding domains: Key to inositol lipid biology. *Biochim Biophys Acta.* 1851:746-758.
- Hammond, G.R., M.P. Machner, and T. Balla. 2014. A novel probe for phosphatidylinositol 4-phosphate reveals multiple pools beyond the Golgi. *J Cell Biol.* 205:113-126.
- Hanahan, D., J. Jessee, and F.R. Bloom. 1991. Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol.* 204:63-113.
- Hawley, K.L., C.M. Olson, Jr., J.M. Iglesias-Pedraz, N. Navasa, J.L. Cervantes, M.J. Caimano, H. Izadi, R.R. Ingalls, U. Pal, J.C. Salazar, J.D. Radolf, and J. Anguita. 2012. CD14 cooperates with complement receptor 3 to mediate MyD88-independent phagocytosis of *Borrelia burgdorferi*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109:1228-1232.
- Henry, L., and D.R. Sheff. 2008. Rab8 regulates basolateral secretory, but not recycling, traffic at the recycling endosome. *Mol Biol Cell.* 19:2059-2068.
- Heukeshoven, J., and R. Dernick. 1988. Increased sensitivity for Coomassie staining of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using PhastSystem Development Unit. *Electrophoresis.* 9:60-61.
- Hirabayashi, J., T. Hashidate, Y. Arata, N. Nishi, T. Nakamura, M. Hirashima, T. Urashima, T. Oka, M. Futai, W.E. Muller, F. Yagi, and K. Kasai. 2002. Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. *Biochim Biophys Acta.* 1572:232-254.
- Hirashima, M. 1999. Ecalectin as a T cell-derived eosinophil chemoattractant. *Int Arch Allergy Immunol.* 120 Suppl 1:7-10.
- Hoepfner, S., F. Severin, A. Cabezas, B. Habermann, A. Runge, D. Gillyooly, H. Stenmark, and M. Zerial. 2005. Modulation of receptor recycling and degradation by the endosomal kinesin KIF16B. *Cell.* 121:437-450.
- Hoffmann, A.K., X. Naj, and S. Linder. 2014. Daam1 is a regulator of filopodia formation and phagocytic uptake of *Borrelia burgdorferi* by primary human macrophages. *FASEB J.* 28:3075-3089.
- Hollinger, S., and J.R. Hepler. 2002. Cellular regulation of RGS proteins: modulators and integrators of G protein signaling. *Pharmacol Rev.* 54:527-559.

- Horwitz, M.A. 1984. Phagocytosis of the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) occurs by a novel mechanism: engulfment within a pseudopod coil. *Cell*. 36:27-33.
- Hubner, S., A.D. Couvillon, J.A. Kas, V.A. Bankaitis, R. Vegners, C.L. Carpenter, and P.A. Janmey. 1998. Enhancement of phosphoinositide 3-kinase (PI 3-kinase) activity by membrane curvature and inositol-phospholipid-binding peptides. *Eur J Biochem*. 258:846-853.
- Hutagalung, A.H., and P.J. Novick. 2011. Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiol Rev*. 91:119-149.
- Imaizumi, T., H. Yoshida, N. Nishi, H. Sashinami, T. Nakamura, M. Hirashima, C. Ohyama, K. Itoh, and K. Satoh. 2007. Double-stranded RNA induces galectin-9 in vascular endothelial cells: involvement of TLR3, PI3K, and IRF3 pathway. *Glycobiology*. 17:12C-15C.
- Ishikawa, A., T. Imaizumi, H. Yoshida, N. Nishi, T. Nakamura, M. Hirashima, and K. Satoh. 2004. Double-stranded RNA enhances the expression of galectin-9 in vascular endothelial cells. *Immunol Cell Biol*. 82:410-414.
- Jayaraman, P., I. Sada-Ovalle, S. Beladi, A.C. Anderson, V. Dardalhon, C. Hotta, V.K. Kuchroo, and S.M. Behar. 2010. Tim3 binding to galectin-9 stimulates antimicrobial immunity. *J Exp Med*. 207:2343-2354.
- Jia, J., Y.P. Abudu, A. Claude-Taupin, Y. Gu, S. Kumar, S.W. Choi, R. Peters, M.H. Mudd, L. Allers, M. Salemi, B. Phinney, T. Johansen, and V. Deretic. 2019. Galectins control MTOR and AMPK in response to lysosomal damage to induce autophagy. *Autophagy*. 15:169-171.
- Johannes, L., R. Jacob, and H. Leffler. 2018. Galectins at a glance. *J Cell Sci*. 131.
- Johannes, L., C. Wunder, and M. Shafaq-Zadah. 2016. Glycolipids and Lectins in Endocytic Uptake Processes. *J Mol Biol*.
- Johnson, R.C., N. Marek, and C. Kodner. 1984. Infection of Syrian hamsters with Lyme disease spirochetes. *J Clin Microbiol*. 20:1099-1101.
- Kalin, S., D.P. Buser, and M. Spiess. 2016. A fresh look at the function of Rabaptin5 on endosomes. *Small GTPases*. 7:34-37.
- Kimber, W.A., L. Trinkle-Mulcahy, P.C. Cheung, M. Deak, L.J. Marsden, A. Kieloch, S. Watt, R.T. Javier, A. Gray, C.P. Downes, J.M. Lucocq, and D.R. Alessi. 2002. Evidence that the tandem-pleckstrin-homology-domain-containing protein TAPP1 interacts with Ptd(3,4)P2 and the multi-PDZ-domain-containing protein MUPP1 in vivo. *Biochem J*. 361:525-536.
- Klinkert, K., and A. Echard. 2016. Rab35 GTPase: A Central Regulator of Phosphoinositides and F-actin in Endocytic Recycling and Beyond. *Traffic*. 17:1063-1077.
- Kurten, R.C., D.L. Cadena, and G.N. Gill. 1996. Enhanced degradation of EGF receptors by a sorting nexin, SNX1. *Science*. 272:1008-1010.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.
- Lakshminarayan, R., C. Wunder, U. Becken, M.T. Howes, C. Benzing, S. Arumugam, S. Sales, N. Ariotti, V. Chambon, C. Lamaze, D. Loew, A. Shevchenko, K. Gaus, R.G. Parton, and L. Johannes. 2014. Galectin-3 drives glycosphingolipid-dependent biogenesis of clathrin-independent carriers. *Nature cell biology*. 16:595-606.

- Lane, R.S., J. Piesman, and W. Burgdorfer. 1991. Lyme borreliosis: relation of its causative agent to its vectors and hosts in North America and Europe. *Annu Rev Entomol.* 36:587-609.
- Lawe, D.C., A. Chawla, E. Merithew, J. Dumas, W. Carrington, K. Fogarty, L. Lifshitz, R. Tuft, D. Lambright, and S. Corvera. 2002. Sequential roles for phosphatidylinositol 3-phosphate and Rab5 in tethering and fusion of early endosomes via their interaction with EEA1. *J Biol Chem.* 277:8611-8617.
- Lawe, D.C., V. Patki, R. Heller-Harrison, D. Lambright, and S. Corvera. 2000. The FYVE domain of early endosome antigen 1 is required for both phosphatidylinositol 3-phosphate and Rab5 binding. Critical role of this dual interaction for endosomal localization. *J Biol Chem.* 275:3699-3705.
- Lenoir, M., C. Ustunel, S. Rajesh, J. Kaur, D. Moreau, J. Gruenberg, and M. Overduin. 2018. Phosphorylation of conserved phosphoinositide binding pocket regulates sorting nexin membrane targeting. *Nature communications.* 9:993.
- Li, C., A. Motaleb, M. Sal, S.F. Goldstein, and N.W. Charon. 2000. Spirochete periplasmic flagella and motility. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2:345-354.
- Linder, S., C. Heimerl, V. Fingerle, M. Aepfelbacher, and B. Wilske. 2001. Coiling phagocytosis of *Borrelia burgdorferi* by primary human macrophages is controlled by CDC42Hs and Rac1 and involves recruitment of Wiskott-Aldrich syndrome protein and Arp2/3 complex. *Infect Immun.* 69:1739-1746.
- Liu, F.T., R.J. Patterson, and J.L. Wang. 2002. Intracellular functions of galectins. *Biochim Biophys Acta.* 1572:263-273.
- Lou, J., X. Li, W. Huang, J. Liang, M. Zheng, T. Xu, J. Lyu, D. Li, Q. Xu, X. Jin, G. Fu, D. Wang, and L. Lu. 2017. SNX10 promotes phagosome maturation in macrophages and protects mice against *Listeria monocytogenes* infection. *Oncotarget.* 8:53935-53947.
- Lucas, M., D.C. Gershlick, A. Vidaurrazaga, A.L. Rojas, J.S. Bonifacino, and A. Hierro. 2016. Structural Mechanism for Cargo Recognition by the Retromer Complex. *Cell.* 167:1623-1635 e1614.
- Marat, A.L., and V. Haucke. 2016. Phosphatidylinositol 3-phosphates-at the interface between cell signalling and membrane traffic. *EMBO J.* 35:561-579.
- Matsumoto, R., H. Matsumoto, M. Seki, M. Hata, Y. Asano, S. Kanegasaki, R.L. Stevens, and M. Hirashima. 1998. Human ecalectin, a variant of human galectin-9, is a novel eosinophil chemoattractant produced by T lymphocytes. *J Biol Chem.* 273:16976-16984.
- McGough, I.J., R.E.A. de Groot, A.P. Jellett, M.C. Betist, K.C. Varandas, C.M. Danson, K.J. Heesom, H.C. Korswagen, and P.J. Cullen. 2018. SNX3-retromer requires an evolutionary conserved MON2:DOPEY2:ATP9A complex to mediate Wntless sorting and Wnt secretion. *Nature communications.* 9:3737.
- Meister, M., and R. Tikkanen. 2014. Endocytic trafficking of membrane-bound cargo: a flotillin point of view. *Membranes (Basel).* 4:356-371.
- Moriarty, T.J., M.U. Norman, P. Colarusso, T. Bankhead, P. Kubes, and G. Chaconas. 2008. Real-time high resolution 3D imaging of the lyme disease spirochete adhering to and escaping from the vasculature of a living host. *PLoS Pathog.* 4:e1000090.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 51 Pt 1:263-273.

- Nagae, M., N. Nishi, T. Murata, T. Usui, T. Nakamura, S. Wakatsuki, and R. Kato. 2009. Structural analysis of the recognition mechanism of poly-N-acetyllactosamine by the human galectin-9 N-terminal carbohydrate recognition domain. *Glycobiology*. 19:112-117.
- Nagae, M., N. Nishi, S. Nakamura-Tsuruta, J. Hirabayashi, S. Wakatsuki, and R. Kato. 2008. Structural analysis of the human galectin-9 N-terminal carbohydrate recognition domain reveals unexpected properties that differ from the mouse orthologue. *J Mol Biol*. 375:119-135.
- Naj, X., A.K. Hoffmann, M. Himmel, and S. Linder. 2013. The formins FMNL1 and mDia1 regulate coiling phagocytosis of *Borrelia burgdorferi* by primary human macrophages. *Infect Immun*. 81:1683-1695.
- Naj, X., and S. Linder. 2015. ER-Coordinated Activities of Rab22a and Rab5a Drive Phagosomal Compaction and Intracellular Processing of *Borrelia burgdorferi* by Macrophages. *Cell Rep*. 12:1816-1830.
- Naj, X., and S. Linder. 2017. Actin-Dependent Regulation of *Borrelia burgdorferi* Phagocytosis by Macrophages. *Curr Top Microbiol Immunol*. 399:133-154.
- Ouderkirk, J.L., and M. Krendel. 2014. Myosin 1e is a component of the invadosome core that contributes to regulation of invadosome dynamics. *Exp Cell Res*. 322:265-276.
- Overduin, M., S. Rajesh, J. Gruenberg, and M. Lenoir. 2015. Secondary structure and (1)H, (13)C, (15)N resonance assignments of the endosomal sorting protein sorting nexin 3. *Biomol NMR Assign*. 9:355-358.
- Park, J., H. Zhao, and S. Chang. 2014. The unique mechanism of SNX9 BAR domain for inducing membrane tubulation. *Mol Cells*. 37:753-758.
- Pelletier, I., T. Hashidate, T. Urashima, N. Nishi, T. Nakamura, M. Futai, Y. Arata, K. Kasai, M. Hirashima, J. Hirabayashi, and S. Sato. 2003. Specific recognition of *Leishmania major* poly-beta-galactosyl epitopes by galectin-9: possible implication of galectin-9 in interaction between *L. major* and host cells. *J Biol Chem*. 278:22223-22230.
- Planchon, D., E. Rios Morris, M. Genest, F. Comunale, S. Vacher, I. Bieche, E.V. Denisov, L.A. Tashireva, V.M. Perelmuter, S. Linder, P. Chavrier, S. Bodin, and C. Gauthier-Rouviere. 2018. MT1-MMP targeting to endolysosomes is mediated by upregulation of flotillins. *J Cell Sci*. 131.
- Pons, V., P.P. Luyet, E. Morel, L. Abrami, F.G. van der Goot, R.G. Parton, and J. Gruenberg. 2008. Hrs and SNX3 functions in sorting and membrane invagination within multivesicular bodies. *PLoS Biol*. 6:e214.
- Pons, V., C. Ustunel, C. Rolland, E. Torti, R.G. Parton, and J. Gruenberg. 2012. SNX12 role in endosome membrane transport. *PloS one*. 7:e38949.
- Posor, Y., M. Eichhorn-Gruenig, D. Puchkov, J. Schoneberg, A. Ullrich, A. Lampe, R. Muller, S. Zerbakhsh, F. Gulluni, E. Hirsch, M. Krauss, C. Schultz, J. Schmoranzler, F. Noe, and V. Haucke. 2013. Spatiotemporal control of endocytosis by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Nature*. 499:233-237.
- Pritt, B.S., P.S. Mead, D.K.H. Johnson, D.F. Neitzel, L.B. Respicio-Kingry, J.P. Davis, E. Schiffman, L.M. Sloan, M.E. Schriefer, A.J. Replogle, S.M. Paskewitz, J.A. Ray, J. Bjork, C.R. Steward, A. Deedon, X. Lee, L.C. Kingry, T.K. Miller, M.A. Feist, E.S. Theel, R. Patel, C.L. Irish, and J.M. Petersen. 2016a. Identification of a novel pathogenic *Borrelia* species causing Lyme borreliosis with unusually high spirochaetaemia: a descriptive study. *Lancet Infect Dis*. 16:556-564.

- Pritt, B.S., L.B. Respicio-Kingry, L.M. Sloan, M.E. Schriefer, A.J. Replogle, J. Bjork, G. Liu, L.C. Kingry, P.S. Mead, D.F. Neitzel, E. Schiffman, D.K. Hoang Johnson, J.P. Davis, S.M. Paskewitz, D. Boxrud, A. Deedon, X. Lee, T.K. Miller, M.A. Feist, C.R. Steward, E.S. Theel, R. Patel, C.L. Irish, and J.M. Petersen. 2016b. *Borrelia mayonii* sp. nov., a member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex, detected in patients and ticks in the upper midwestern United States. *Int J Syst Evol Microbiol.* 66:4878-4880.
- Priya, A., J. Sugatha, S. Parveen, S. Lacas-Gervais, P. Raj, J. Gilleron, and S. Datta. 2017. Essential and selective role of SNX12 in transport of endocytic and retrograde cargo. *J Cell Sci.*
- Pugliese, G., C. Iacobini, C. Ricci, C. Blasetti Fantauzzi, and S. Menini. 2014. Galectin-3 in diabetic patients. *Clin Chem Lab Med.* 52:1413-1423.
- Rabinovich, G.A., M.A. Toscano, S.S. Jackson, and G.R. Vasta. 2007. Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices. *Curr Opin Struct Biol.* 17:513-520.
- Rittig, M.G., J.C. Jagoda, B. Wilske, R. Murgia, M. Cinco, R. Repp, G.R. Burmester, and A. Krause. 1998a. Coiling phagocytosis discriminates between different spirochetes and is enhanced by phorbol myristate acetate and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Infect Immun.* 66:627-635.
- Rittig, M.G., A. Krause, T. Haupl, U.E. Schaible, M. Modolell, M.D. Kramer, E. Lutjen-Drecoll, M.M. Simon, and G.R. Burmester. 1992. Coiling phagocytosis is the preferential phagocytic mechanism for *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun.* 60:4205-4212.
- Rittig, M.G., K. Schroppel, K.H. Seack, U. Sander, E.N. N'Diaye, I. Maridonneau-Parini, W. Solbach, and C. Bogdan. 1998b. Coiling phagocytosis of trypanosomatids and fungal cells. *Infect Immun.* 66:4331-4339.
- Rzomp, K.A., L.D. Scholtes, B.J. Briggs, G.R. Whittaker, and M.A. Scidmore. 2003. Rab GTPases are recruited to chlamydial inclusions in both a species-dependent and species-independent manner. *Infect Immun.* 71:5855-5870.
- Sada-Ovalle, I., L. Chavez-Galan, L. Torre-Bouscoulet, L. Nava-Gamino, L. Barrera, P. Jayaraman, M. Torres-Rojas, M.A. Salazar-Lezama, and S.M. Behar. 2012. The Tim3-galectin 9 pathway induces antibacterial activity in human macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of immunology.* 189:5896-5902.
- Salazar, J.C., S. Duhnam-Ems, C. La Vake, A.R. Cruz, M.W. Moore, M.J. Caimano, L. Velez-Climent, J. Shupe, W. Krueger, and J.D. Radolf. 2009. Activation of human monocytes by live *Borrelia burgdorferi* generates TLR2-dependent and -independent responses which include induction of IFN-beta. *PLoS Pathog.* 5:e1000444.
- Salazar, J.C., C.D. Pope, T.J. Sellati, H.M. Feder, Jr., T.G. Kiely, K.R. Dardick, R.L. Buckman, M.W. Moore, M.J. Caimano, J.G. Pope, P.J. Krause, J.D. Radolf, and N. Lyme Disease. 2003. Coevolution of markers of innate and adaptive immunity in skin and peripheral blood of patients with erythema migrans. *Journal of immunology.* 171:2660-2670.
- Sason, H., M. Milgrom, A.M. Weiss, N. Melamed-Book, T. Balla, S. Grinstein, S. Backert, I. Rosenshine, and B. Aroeti. 2009. Enteropathogenic *Escherichia coli* subverts phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate upon epithelial cell infection. *Mol Biol Cell.* 20:544-555.

- Sato, M., N. Nishi, H. Shoji, M. Seki, T. Hashidate, J. Hirabayashi, K. Kasai Ki, Y. Hata, S. Suzuki, M. Hirashima, and T. Nakamura. 2002. Functional analysis of the carbohydrate recognition domains and a linker peptide of galectin-9 as to eosinophil chemoattractant activity. *Glycobiology*. 12:191-197.
- Sawyer, R.G., M.D. Spengler, R.B. Adams, and T.L. Pruett. 1991. The peritoneal environment during infection. The effect of monomicrobial and polymicrobial bacteria on pO₂ and pH. *Ann Surg*. 213:253-260.
- Schuck, S., M.J. Gerl, A. Ang, A. Manninen, P. Keller, I. Mellman, and K. Simons. 2007. Rab10 is involved in basolateral transport in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *Traffic*. 8:47-60.
- Schwan, T.G., J. Piesman, W.T. Golde, M.C. Dolan, and P.A. Rosa. 1995. Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:2909-2913.
- Seet, L.F., and W. Hong. 2006. The Phox (PX) domain proteins and membrane traffic. *Biochim Biophys Acta*. 1761:878-896.
- Sehrawat, S., P.B. Reddy, N. Rajasagi, A. Suryawanshi, M. Hirashima, and B.T. Rouse. 2010. Galectin-9/TIM-3 interaction regulates virus-specific primary and memory CD8 T cell response. *PLoS Pathog*. 6:e1000882.
- Shin, O.S., L.S. Miller, R.L. Modlin, S. Akira, S. Uematsu, and L.T. Hu. 2009. Downstream signals for MyD88-mediated phagocytosis of *Borrelia burgdorferi* can be initiated by TRIF and are dependent on PI3K. *Journal of immunology*. 183:491-498.
- Sierecki, E., L.M. Stevers, N. Giles, M.E. Polinkovsky, M. Moustaqil, S. Mureev, W.A. Johnston, M. Dahmer-Heath, D. Skalamera, T.J. Gonda, B. Gabrielli, B.M. Collins, K. Alexandrov, and Y. Gambin. 2014. Rapid mapping of interactions between Human SNX-BAR proteins measured in vitro by AlphaScreen and single-molecule spectroscopy. *Mol Cell Proteomics*. 13:2233-2245.
- Simonsen, A., A.E. Wurmser, S.D. Emr, and H. Stenmark. 2001. The role of phosphoinositides in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol*. 13:485-492.
- Simpson, J.C., G. Griffiths, M. Wessling-Resnick, J.A. Fransen, H. Bennett, and A.T. Jones. 2004. A role for the small GTPase Rab21 in the early endocytic pathway. *J Cell Sci*. 117:6297-6311.
- Solis, G.P., N. Hulsbusch, Y. Radon, V.L. Katanaev, H. Plattner, and C.A. Stuermer. 2013. Reggies/flotillins interact with Rab11a and SNX4 at the tubulovesicular recycling compartment and function in transferrin receptor and E-cadherin trafficking. *Mol Biol Cell*. 24:2689-2702.
- Song, X., W. Xu, A. Zhang, G. Huang, X. Liang, J.V. Virbasius, M.P. Czech, and G.W. Zhou. 2001. Phox homology domains specifically bind phosphatidylinositol phosphates. *Biochemistry*. 40:8940-8944.
- Stanek, G., and F. Strle. 2018. Lyme borreliosis-from tick bite to diagnosis and treatment. *FEMS Microbiol Rev*. 42:233-258.
- Steere, A.C., N.H. Bartenhagen, J.E. Craft, G.J. Hutchinson, J.H. Newman, D.W. Rahn, L.H. Sigal, P.N. Spieler, K.S. Stenn, and S.E. Malawista. 1983. The early clinical manifestations of Lyme disease. *Ann Intern Med*. 99:76-82.
- Stenmark, H., and V.M. Olkkonen. 2001. The Rab GTPase family. *Genome Biol*. 2:REVIEWS3007.

- Stenmark, H., R.G. Parton, O. Steele-Mortimer, A. Lutcke, J. Gruenberg, and M. Zerial. 1994. Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis. *EMBO J.* 13:1287-1296.
- Stuermer, C.A. 2010. The reggie/flotillin connection to growth. *Trends Cell Biol.* 20:6-13.
- Teasdale, R.D., and B.M. Collins. 2012. Insights into the PX (phox-homology) domain and SNX (sorting nexin) protein families: structures, functions and roles in disease. *Biochem J.* 441:39-59.
- Tilly, K., P.A. Rosa, and P.E. Stewart. 2008. Biology of infection with *Borrelia burgdorferi*. *Infect Dis Clin North Am.* 22:217-234, v.
- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1992. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology.* 24:145-149.
- Tseng, H.Y., N. Thorausch, T. Ziegler, A. Meves, R. Fassler, and R.T. Bottcher. 2014. Sorting nexin 31 binds multiple beta integrin cytoplasmic domains and regulates beta1 integrin surface levels and stability. *J Mol Biol.* 426:3180-3194.
- Tureci, O., H. Schmitt, N. Fadle, M. Pfreundschuh, and U. Sahin. 1997. Molecular definition of a novel human galectin which is immunogenic in patients with Hodgkin's disease. *J Biol Chem.* 272:6416-6422.
- van Weering, J.R., R.B. Sessions, C.J. Traer, D.P. Kloer, V.K. Bhatia, D. Stamou, S.R. Carlsson, J.H. Hurley, and P.J. Cullen. 2012a. Molecular basis for SNX-BAR-mediated assembly of distinct endosomal sorting tubules. *EMBO J.* 31:4466-4480.
- van Weering, J.R., P. Verkade, and P.J. Cullen. 2012b. SNX-BAR-mediated endosome tubulation is co-ordinated with endosome maturation. *Traffic.* 13:94-107.
- Varnai, P., and T. Balla. 1998. Visualization of phosphoinositides that bind pleckstrin homology domains: calcium- and agonist-induced dynamic changes and relationship to myo-[3H]inositol-labeled phosphoinositide pools. *J Cell Biol.* 143:501-510.
- Wada, J., and Y.S. Kanwar. 1997. Identification and characterization of galectin-9, a novel beta-galactoside-binding mammalian lectin. *J Biol Chem.* 272:6078-6086.
- Wada, J., K. Ota, A. Kumar, E.I. Wallner, and Y.S. Kanwar. 1997. Developmental regulation, expression, and apoptotic potential of galectin-9, a beta-galactoside binding lectin. *J Clin Invest.* 99:2452-2461.
- Warke, R.V., K. Khaja, K.J. Martin, M.F. Fournier, S.K. Shaw, N. Brizuela, N. de Bosch, D. Lapointe, F.A. Ennis, A.L. Rothman, and I. Bosch. 2003. Dengue virus induces novel changes in gene expression of human umbilical vein endothelial cells. *J Virol.* 77:11822-11832.
- Williams, K.C., R.E. McNeilly, and M.G. Coppelino. 2014. SNAP23, Syntaxin4, and vesicle-associated membrane protein 7 (VAMP7) mediate trafficking of membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) during invadopodium formation and tumor cell invasion. *Mol Biol Cell.* 25:2061-2070.
- Worby, C.A., and J.E. Dixon. 2002. Sorting out the cellular functions of sorting nexins. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:919-931.
- Xu, Y., H. Hortsman, L. Seet, S.H. Wong, and W. Hong. 2001a. SNX3 regulates endosomal function through its PX-domain-mediated interaction with PtdIns(3)P. *Nature cell biology.* 3:658-666.

- Xu, Y., L.F. Seet, B. Hanson, and W. Hong. 2001b. The Phox homology (PX) domain, a new player in phosphoinositide signalling. *Biochem J.* 360:513-530.
- Yang, R.Y., G.A. Rabinovich, and F.T. Liu. 2008. Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Rev Mol Med.* 10:e17.
- Yarar, D., M.C. Surka, M.C. Leonard, and S.L. Schmid. 2008. SNX9 activities are regulated by multiple phosphoinositides through both PX and BAR domains. *Traffic.* 9:133-146.
- Yarar, D., C.M. Waterman-Storer, and S.L. Schmid. 2007. SNX9 couples actin assembly to phosphoinositide signals and is required for membrane remodeling during endocytosis. *Dev Cell.* 13:43-56.
- Yoshida, H., M. Teraoka, N. Nishi, S. Nakakita, T. Nakamura, M. Hirashima, and S. Kamitori. 2010. X-ray structures of human galectin-9 C-terminal domain in complexes with a biantennary oligosaccharide and sialyllactose. *J Biol Chem.* 285:36969-36976.
- Zajkowska, J., P. Lewczuk, F. Strle, and G. Stanek. 2012. Lyme borreliosis: from pathogenesis to diagnosis and treatment. *Clin Dev Immunol.* 2012:231657.

10. Abkürzungsverzeichnis

aa	Aminosäure(n)
AF	Alexa Fluor
amp ^(R)	Ampicillin(-resistenz)
bp	DNA-Basenpaar(e)
BSA	bovines Serumalbumin
CD14	<i>cluster of differentiation 14</i>
CLSM	konfokales Laser-Scanning-Mikroskop
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DPBS	Dulbecco's <i>phosphate-buffered saline</i> – steriles PBS (Zellkultur)
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
(E)GFP	<i>(enhanced) green fluorescent protein</i>
EL	Elutionsfraktion
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ER	Endoplasmatisches Reticulum
F-Aktin	filamentöses Aktin
g	Erdbeschleunigung ($9,81 \text{ m} \cdot \text{s}^{-2}$)
gen ^(R)	Gentamicin(-resistenz)
GOI	<i>gene of interest</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IF	Immunfluoreszenz (-mikroskopie)
insens.	insensitiv (ggü. siRNA-Oligonukleotiden)
kan ^(R)	Kanamycin(-resistenz)
kDa	Kilodalton
Kontr.	Kontrolle
L	<i>Lysat/load</i>
LB	<i>lysogeny broth</i>
LPA	Lysophosphatsäure
LPC	Lysophosphocholin
LSM	Lymphozytenseparationsmedium
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MW	Molekulargewicht
MWCO	<i>molecular weight cut off</i>
NaCl	Natriumchlorid
NGS	<i>normal goat sera</i>
NHS	<i>normal human sera</i>
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
PA	Phosphatsäure

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung - <i>phosphate-buffered saline</i>
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phosphatidylethanolamin
PS	Phosphatidylserin
P/S	Penicillin/Streptomycin
ROI	<i>region of interest</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDGZ	Saccharosedichtegradientenzentrifugation
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBST	<i>Tris-buffered saline</i> + Tween20
TEMED	Tetramethylethylenediamin
Tris	Tris(hydroxyamino)methan
U	<i>unit</i>
V	Volt
Verd.	Verdünnung
WB	Western Blot
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent

11. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematischer Aufbau eines <i>Borrelia burgdorferi</i> -Spirochäten.....	6
Abb. 2: Erster Kontakt und Aufnahme von Borrelien durch Makrophagen.....	11
Abb. 3: RabGTPasen-Zyklus.....	12
Abb. 4: RabGTPasen sind an der intrazellulären Prozessierung von Borrelien in Makrophagen beteiligt.....	13
Abb. 5: Übersicht über die in Säugerzellen bekannten Sorting Nexine.....	16
Abb. 6: Die PX-Domäne und PI(3)P.....	17
Abb. 7: Schema von Aufbau und Strukturen der verschiedenen Vertreter der Galectin-Familie.....	20
Abb. 8: Sorting Nexin-3 lokalisiert an internalisierten Borrelien.....	51
Abb. 9: Immunfluoreszenzaufnahmen zur Überprüfung der Lokalisation aller verwendeten Sorting nexin-Konstrukte, außer SNX3.....	52
Abb. 10: SNX3 spielt eine Rolle bei der Kompaktierung von <i>Borrelia burgdorferi</i> in Makrophagen.....	55
Abb. 11: Die Depletion von SNX1 und SNX3 hat keinen Einfluss auf die jeweils gegenseitige Expression.....	56
Abb. 12: Sorting Nexin-3 akkumuliert an Borrelien-haltigen Phagosomen in Makrophagen bis zur vollständigen Kompaktierung der Spirochäten.....	57
Abb. 13: Sorting Nexin-3 lokalisiert an Rab5a-positiven Vesikeln und wird am Phagosom während der Kompaktierung von Borrelien angereichert.....	58
Abb. 14: SNX3 lokalisiert verstärkt an Windungsspitzen von Borrelien-haltigen Phagosomen.....	59
Abb. 15: Sorting Nexin 3 ist Voraussetzung für proteolytische Aktivität im Phagolysosom und verhindert intrazelluläres Überleben.....	61
Abb. 16: SNX3 bindet an PI(3)P und ist an Borrelien-haltigen Phagosomen mit PI(3)P kolokalisiert.....	63
Abb. 17: Sorting Nexin-3 bindet über seine PX-Domäne an PI(3)P.....	65
Abb. 18: PI3-Kinaseaktivität reguliert Kompaktierung von Borrelien.....	67
Abb. 19: Die Bindung von SNX3 an PI(3)P reguliert die Kompaktierung von Borrelien.....	69
Abb. 20: Sorting Nexin-3 benötigt C-Terminus zur Lokalisation an Borrelien-haltigen Phagosomen.....	71
Abb. 21: Der C-Terminus von Sorting Nexin-3 ist für die Kompaktierung von Borrelien essenziell.....	73
Abb. 22: Der C-Terminus von Sorting Nexin-3 ist für die Kompaktierung von Borrelien essenziell.....	74
Abb. 23: Identifikation eines Bindungspartners an den C-Terminus von SNX3 mittels Massenspektroskopie.....	76

Abb. 24: Galectin-9 interagiert mit dem C-Terminus von SNX3 und reguliert Borrelienkompaktierung.	78
Abb. 25: Kombiniertes Knockdown von SNX3 und Galectin-9.....	79
Abb. 26: Galectin-9 beeinflusst die proteolytische Aktivität im Borrelien-haltigen Phagolysosom.	80
Abb. 27: Charakterisierung der Gal9-Vesikel mittels Massenspektroskopie.....	81
Abb. 28: Flotillin-2 kolokalisiert mit Galectin-9 an Borrelienphagosomen.....	82
Abb. 29: Die CRD-Domänen sind für die Kompaktierung von Borrelien essenziell.	84
Abb. 30: Intrazelluläres Verteilungsmuster der Expression einzelner Galectin-9-Deletionsmutanten.....	85
Abb. 31: Die Lektinbindeaktivität hat keinen Einfluss auf die Kompaktierung von Borrelien.	86
Abb. 32: SNX3 rekrutiert Rab5a und Gal9 zu Borrelien-haltigen Phagolysosomen.....	88
Abb. 33: Strukturelle Einteilung von SNX3 anhand von Röntgenkristallstrukturen und bereits annotierten Domänen.....	95
Abb. 34: Zusammenfassendes Modell zum Mechanismus der Prozessierung von <i>Borrelia burgdorferi</i> in primären human Makrophagen durch SNX3, Rab5a und Galectin-9.....	100

12. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Geräte.....	23
Tab. 2: Software.....	24
Tab. 3: Chemikalien und Reagenzien.....	24
Tab. 4: Verbrauchsmaterialien.....	25
Tab. 5: DNA- und Protein-Größenstandards.....	26
Tab. 6: Kits.....	26
Tab. 7: Medien und Zusätze für primäre humane Monozyten bzw. Makrophagen.....	26
Tab. 8: Medien und Zusätze für <i>Borrelia burgdorferi</i>	27
Tab. 9: Allgemeine Enzyme.....	27
Tab. 10: Restriktionsendonukleasen.....	27
Tab. 11: <i>E. coli</i> -Stämme.....	27
Tab. 12: <i>Borrelia burgdorferi</i> -Stämme.....	28
Tab. 13: Primäre Antikörper.....	28
Tab. 14: Sekundäre Antikörper und Farbstoffe.....	28
Tab. 15: DNA-Oligonukleotidsequenzen.....	29
Tab. 16: siRNA-Oligonukleotidsequenzen.....	29
Tab. 17: In dieser Arbeit verwendete Plasmide.....	30
Tab. 18: Übersicht PCR-Reaktionsansatz.....	34
Tab. 19: Reaktionsabfolge der PCR.....	34
Tab. 20: Übersicht Ligationsansatz.....	36
Tab. 21: Oligonukleotid-Paarungen und DNA-Matrizen für Plasmidkonstruktion.....	37
Tab. 22: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel für die SDS-PAGE.....	44
Tab. 23: Übersicht über die Ausstattung der verwendeten konfokalen Mikroskope.....	49

13. Danksagung

Zum Schluss möchte ich mich bei allen bedanken, die mich auf verschiedenste Art und Weise während der Dissertationszeit unterstützt haben:

Zu allererst gilt mein größter Dank Prof. Dr. Stefan Linder für die wohl beste Betreuung mit bester Laune zu wirklich fast jeder Zeit. Die vielen Ideen, Diskussionen, Input, immer fortwährende Hilfsbereitschaft und motivierenden Worte in schwierigen Zeiten sowie zu jeder Situation einen passenden Ruthe oder Perscheid haben sehr zum Gelingen der Arbeit beigetragen!

Frau Prof. Dr. Julia Kehr danke ich vielmals für die spontane Übernahme des Zweitgutachtens und wünsche Herrn Prof. Dr. Thorsten Burmester alles Gute! Herrn PD Dr. Andreas Pommerening-Röser und Herrn Prof. Dr. Wolfgang Streit danke ich für die Teilnahme und Unterstützung in der Prüfungskommission.

Herrn Prof. Dr. Martin Aepfelbacher danke ich für die Unterstützung, insbesondere in der Schlussphase der Promotions- sowie Publikationsphase.

Vielen Dank auch an Prof. Dr. Thomas Braulke für die Möglichkeit, im Graduiertenkolleg GRK1459 als Doktorand teilnehmen zu können.

Ein weiterer großer Dank geht an alle Mitglieder des LinderLabs, die „Alten“: Xenia, Chrissy, Leona, Linda, Kerstin, Pasquale, Karim, und die „Neuen“: Hannes, Nele, Denise, Robert, Kathrin, Sven, Finn, Johann, Philipp, Artur. Danke Hannes Bananes aka HP Gonschior für unfassbar spannende gemeinsame Forschung genauso wie unfassbar gemeinsame spannende Jagden auf Einbrecher und Diebe im Labor! UND Andrea... Andy-Candy, die gute Laborfee mit der Rute („auch dazu gibt's n Ruthe...“)! Danke für deine unzählbaren Monos, Maxis, Puffer, Organisationen und Bestellungen, die unfassbar bekloppten Blödeleien, die vielen Gummitiere, einfach die ganze Hilfe und die gute Laune!

Ein großes Danke an die Mädels und Männer der MiBi und Neuropatho, die einen tatkräftig unterstützt haben und sei es „nur“ mit Feierabendbier! Danke Virgilio und danke Bernd für die Mikroskopbetreuung!

Einen großen Dank auch an die Hamburger Feuerwehr für unzählige schnelle Reaktionszeiten bei verbrannten Toasts, Mikrowellenessen, Kondenswasser oder auch mal „richtigen“ Bränden!!

Ein besonderer Dank auch an meine Freunde, ob in Hamburg, Osa, FFM oder Halle!!!!

Danke Elena, für deine Motivation und ständige Unterstützung!

Nicht zuletzt: Danke, danke, danke an meine Eltern und meine ganze Familie, Dr. DNA ist es dann doch nicht ganz geworden...

14. Anhang

14.1 Publikationen

Daten dieser vorliegenden Dissertation und von vorbereitenden Arbeiten wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Klose M, Salloum JE, Gonschior H, Linder S (2019). SNX3 drives maturation of *Borrelia* phagosomes by forming a hub for PI(3)P, Rab5a, and galectin-9. *Journal of Cell Biology*. 218(9):3039-59.

Panzer L, Trübe L, Klose M, Joosten B, Slotman J, Cambi A, Linder S (2016). The formins FHOD1 and INF2 regulate inter- and intra-structural contractility of podosomes. *Journal of Cell Science*. 129(2):298-313.

14.2 Inhalt der Video-CD

Video V1: SNX3 akkumuliert an Borrelien-haltigen Phagosomen während der Kompaktierung der Spirochäten. Primärer humaner Makrophage, der RFP-SNX3 (magenta) exprimiert, wurde mit GFP-exprimierenden Borrelien (grün) infiziert und mittels *spinning disk* Lebendzellmikroskopie aufgenommen. Das Zeitraffervideo der subzellulären Region zeigt die fortschreitende Kompaktierung der internalisierten *Borrelia burgdorferi* Spirochäten. Belichtungszeit: 150 ms für den grünen und 200 ms für den roten Fluoreszenzkanal. Videowiedergabebildrate: 3 Bilder/Sekunde.

Video V2: SNX3 lokalisiert an Rab5a-positiven Vesikeln und reichert sich während der Kompaktierung an Phagosomen an. Primärer humaner Makrophage, der GFP-SNX3 (magenta) und RFP-Rab5a (gold) exprimiert, wurde mit Hoechst33342-gefärbten Wildtyp-Borrelien (grün) infiziert und mittels *spinning disk* Lebendzellmikroskopie aufgenommen. Das Zeitraffervideo der subzellulären Region zeigt die Akkumulation von SNX3 am Borrelienphagosom, welches durch Rab5a-positive Vesikel kontaktiert wird. Belichtungszeit: 150 ms für den blauen und 200 ms für den roten und grünen Fluoreszenzkanal. Videowiedergabebildrate: 6 Bilder/Sekunde.

Video V3: Galectin-9-positive Vesikel kontaktieren Borrelien-haltige Phagosomen während ihrer Kompaktierung. Primärer humaner Makrophage, der GFP-Gal9 (gold) und RFP-SNX3 (magenta) exprimiert, wurde mit Hoechst33342-gefärbten Wildtyp-Borrelien (grün) infiziert und mittels *spinning disk* Lebendzellmikroskopie aufgenommen. Das Zeitraffervideo der subzellulären Region zeigt die Akkumulation von SNX3 am Borrelienphagosom, welches durch Galectin-9-positive Vesikel kontaktiert wird. Belichtungszeit: 150 ms für den blauen und 200 ms für den roten und grünen Fluoreszenzkanal. Videowiedergabebildrate: 4 Bilder/Sekunde.

15. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, 14.06.2019

Unterschrift