

Aus dem Biochemischen Institut
(Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Stefan Rose-John)
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Substratanalyse der Intramembranproteasen Signal Peptide Peptidase-like 2a und 2b

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Anna Yamina Stumpff-Niggemann

aus Berlin

Kiel (2022)

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Paul Josef Saftig, Biochemisches Institut

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Jan Heyckendorf, Klinik für Innere Medizin I mit den Schwerpunkten Gastroenterologie, Hepatologie, Ernährungs- und Altersmedizin

Tag der mündlichen Prüfung: 13.06.2023

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 25.04.2023

gez. Prof. Dr. Paul Josef Saftig, Biochemisches Institut

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	V
1. Einleitung.....	1
1.1. Regulierte Intramembranproteolyse (RIP).....	1
1.1.1. Signal peptide peptidase like 2a und 2b (SPPL2a und 2b)	4
1.1.1.1. Substrate von SPPL2a und 2b.....	5
1.2. C-Typ Lektin Rezeptoren (CTRL)	8
1.2.1. Dectin-2 und Mincle	11
1.3. Tumor Nekrose Faktor Familie	14
1.3.1. <i>Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis</i> (Tweak)	14
1.3.2. Ziel dieser Arbeit	16
2. Material und Methoden.....	18
2.1. Material	18
2.1.1. Chemikalien und Geräte.....	18
2.1.2. Mauszucht.....	18
2.1.3. Verwendete Antikörper	19
2.1.4. Plasmid Liste.....	19
2.2. Methoden.....	21
2.2.1. Molekularbiologische Methoden	21
2.2.1.1. RNA-Gewinnung	21
2.2.1.2. cDNA-Herstellung	21
2.2.1.3. Polymerasekettenreaktion.....	22
2.2.1.4. Agarosegelelektrophorese	23
2.2.1.5. Restriktionsverdau	23
2.2.1.6. Ligation	24
2.2.1.7. Elektroporation	24
2.2.1.8. Plasmidamplifikation und -aufreinigung	25

2.2.1.9.	DNA Sequenzierung.....	25
2.2.1.10.	quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaktion (qRT-PCR).....	25
2.2.2.	Zellbiologische Methoden.....	26
2.2.2.1.	Zelllinien	27
2.2.2.2.	Kultivierung von Standardzelllinien.....	28
2.2.2.3.	Kryokonservierung	29
2.2.2.4.	Generierung von murinen Immunzellen aus Knochenmarkszellen:	30
2.2.2.5.	Bone Marrow derived dendritic cells (BMDC)	31
2.2.2.6.	Bone Marrow derived Macrophages (BMDM).....	31
2.2.2.7.	Peritoneal-Makrophagen	32
2.2.2.8.	Transfektion	32
2.2.2.9.	Retrovirale Transduktion von Zellen	33
2.2.2.10.	Behandlung der Zellen mit Rezeptorliganden.....	34
2.2.2.11.	Behandlung der Zellen mit Proteinaseinhibitoren	35
2.2.2.12.	Indirekte Immunfluoreszenz	37
2.2.2.13.	Durchflusszytometrie (FACS).....	38
2.2.2.14.	Nachweis reaktiver-Sauerstoff-Spezies (ROS) mittels 2',7' –dichlorofluorescin diacetate (DCF-DA).....	39
2.2.3.	Biochemische Methoden	40
2.2.3.1.	Lyse von Zellen	40
2.2.3.2.	Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen	41
2.2.3.3.	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	43
2.2.3.4.	Western Blot	45
2.2.3.5.	Immundetektion.....	45
2.2.3.6.	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	46
3.	Ergebnisse:	49
3.1.	Proteolytische Prozessierung des Tweak-Proteins	49
3.1.1.1.	Prozessierung der Ektodomäne	49

3.1.2.	Intramembranproteolyse von Tweak durch die Signal Peptide Peptidase Like 2 Proteasen	53
3.1.3.	Analyse der Funktionen der Intrazellulären Domäne von Tweak anhand eines Microarrays	57
3.2.	Charakterisierung von Substratkandidaten aus der CTLR – Familie	62
3.2.1.	Expression von mDectin-2 und mMincle in humanen Standardzelllinien	62
3.2.2.	Expression von Dectin-2 und Mincle in der murinen Makrophagenzelllinie J774.E.....	70
3.2.2.1.	Oberflächenlokalisierung von Dectin-2 und Mincle in transduzierten J774.E-Zellen....	72
3.2.2.2.	Prozessierung von Dectin-2 und Mincle in J774.E-Makrophagen.....	73
3.2.2.3.	SPPL2-Proteasen beeinflussen den Abbau der NTFs von Dectin-2 und Mincle.....	76
3.2.3.	Einfluss der Proteasen SPPL2a und SPPL2b auf die Funktion der Rezeptoren Dectin-2 und Mincle	79
3.2.3.1.	SPPL2-Expression wird durch Behandlung mit Liganden erhöht	79
3.2.3.2.	Die Bildung von Reaktiven Sauerstoffspezies wurde von SPPL2a und 2b nicht beeinflusst	80
3.2.3.3.	Zytokinantworten von murinen Primärzellen bei Exposition mit Liganden für CTLRs.	82
4.	Diskussion.....	88
4.1.	Limitationen von Überexpressionssystemen für die Identifizierung von SPPL2a- und 2b- Substraten	88
4.2.	Mitglieder der CTLR-Familie zeigen Variationen in ihrer Funktion bei Anwesenheit von Pathogenen oder Liganden	90
4.3.	Proteolytische Prozessierung der neu entdeckten SPPL Substrate Tweak, Dectin-2 und Mincle	93
4.3.1.	Alternative Degradierungswege.....	96
4.4.	Funktionelle Bedeutung der Proteolyse durch SPPL2a und 2b.....	98
4.4.1.	Tweak	98
4.4.2.4.	Funktionelle Relevanz der CTLR-Prozessierung	102
4.5.	Ausblick	107
5.	Zusammenfassung.....	108

6.	Literaturverzeichnis.....	110
7.	Anhang.....	128
7.4.	Weitere Abbildungen.....	128
7.5.	Liste der Abbildungen.....	131
7.6.	Liste der Tabellen.....	133
9.	Publikationen.....	135
10.	Erklärung.....	136
11.	Danksagung.....	137

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
BMDC	Bone marrow-derived dendritic cells
BMDM	Bone marrow derived macrophages
CBLB	Casitas B-lineage lymphoma protein b
CD74	Cluster of differentiation 74
cDNA	complementäre DNA
CTF	C-terminales Fragment
CTLD	C-type lectin Domäne
CTLR	C-type Lektin Rezeptor
DAPI	4-, 6-diamidino-2-phenylindole
Dectin-1	<i>Dendritic cell-associated C-type Lektin-1</i>
Dectin-2	<i>Dendritic cell-associated C-type Lektin-2</i>
Dectin-3	<i>Dendritic cell-associated C-type Lektin-3</i>
dKO	SPPL2a/b Doppel-defizient
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i>
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
DNA	Deoxyribonuclein Säure
Zym	Zymosan
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	<i>Endoplasmic reticulum-associated degradation</i>
ESCRT	<i>Endosomal sorting complex required for transport</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FasL	Fas Ligand
FcRγ	Fc Rezeptor γ Kette
FCS	Fetales Kalbsserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
h	hours = Stunden
HKCA	<i>Heat-killed Candida albicans</i>
ICD	Intrazelluläre Domäne
I-CLiP	<i>Intramembrane-cleaving protease</i>
IL-10	Interleukin-10

IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
IL-2	Interleukin-2
ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
ITM2B	Integrales Membranprotein 2B
kDa	kilo Dalton
l	Liter
LOX-1	<i>Lektin-like oxidised low density lipoprotein rezeptor-1</i>
LPS	Lipopolysaccharid
M	molar
MAPK	<i>Mitogen-activated Protein Kinase</i>
MCL	<i>Myeloid Leukemia cell Differentiation Protein</i>
Min	Minuten
MINCLE	<i>Macrophage-inducible C-type Lectin</i>
ml	Milliliter
mM	millimolar
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MVB	<i>Multivesicular body</i>
NF κ B	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
ng	Nanogramm
NLS	Nukleäre Lokalisationssequenz
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
NTF	N-terminales Fragment
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PI	Propidiumiodid
PLC γ	Phospholipase C γ
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
PS	Presenilin
RIP	Regulierte Intramembranproteolyse
rmGM-CSF	rekombinanter muriner Granulozytenkoloniestimulationsfaktor
rmM-CSF	rekombinanter muriner Makrophagenkoloniestimulationsfaktor
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
S2P	Site 2 Protease

siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i>
SPP	<i>Signal Peptide Peptidase</i>
SPPL	<i>Signal Peptide Peptidase-like</i>
Syk	<i>Spleen tyrosine kinase</i>
TEV	<i>Tobacco etch virus</i>
TfR1	Transferrin Rezeptor 1
TLR	Toll-like Rezeptor
TMD	Transmembrandomäne
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TWEAK	<i>tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis</i>
Wt	Wildtyp
ZLL	(Z-LL) ₂ -Ketone
Zym	Zymosan

1. Einleitung

1.1. Regulierte Intramembranproteolyse (RIP)

Proteasen stellen eine Gruppe von Proteinen dar, welche als Enzyme zur Modifikation anderer Proteine befähigt sind. Dabei werden Peptidbindungen unter Einbau von Wasser gespalten. Dieser irreversible Prozess findet sich in allen lebenden Organismen und gibt einen Hinweis auf die Bedeutung von Proteasen für das Leben. Eine besondere Form der Proteolyse stellt die Spaltung von Proteinen dar, welche in einer Zellmembran vorliegen [1]. Rund ein Drittel aller Gene von Lebewesen codieren für Membranproteine [2]. Für diese fest an oder in der Membran verankerten Proteine sind spezielle Abbaumechanismen erforderlich [3]. Membranen bestehen aus einer Lipiddoppelschicht, wodurch ein im Inneren der Membran liegendes stark hydrophobes Milieu aufrechterhalten wird. Aus diesem Grund wurde lange Zeit angezweifelt, dass eine Proteolyse, welche zur Spaltung von Peptidbindungen Wasser benötigt, in einer Membran stattfinden kann. Mittlerweile jedoch konnten eine Reihe von Intramembranproteasen identifiziert und analysiert werden [1, 4-9]. Dabei basiert, analog zu den löslichen Proteasen, die Klassifizierung auf ihren katalytischen Motiven [10], wobei das aktive Zentrum, in welchem sich Wasser befindet, die Hydrolyse ermöglicht. Metallo-, Aspartyl- sowie Serinproteasen treten in Organismen sowohl in löslicher als auch in membrangebundener Form auf. Lediglich für Cysteinproteasen konnte bis jetzt keine im hydrophoben Milieu der Membran aktive Variante gefunden werden [10]. Die in der Membran vorliegenden proteolytischen Enzyme werden *intramembrane-cleaving proteases* (I-CLiPs) genannt und sind häufig Teil eines meist zwei Schritte umfassenden, proteolytischen Ablaufs, der regulierte Intramembranproteolyse (RIP) genannt wird. Dabei wird in einem initialen Schritt die Ektodomäne eines Substratproteins, welche nach extrazellulär reicht, abgespalten und so in den jeweiligen Raum freigesetzt. Dieser Schritt wird auch Shedding genannt und stellt einen streng regulierten und die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion bestimmenden Schritt dar [11]. Anschließend wird das sich weiterhin in der Membran befindende Fragment des Substrats durch die I-CLiPs degradiert und in weitere Fragmente gespalten, siehe Abbildung 1.

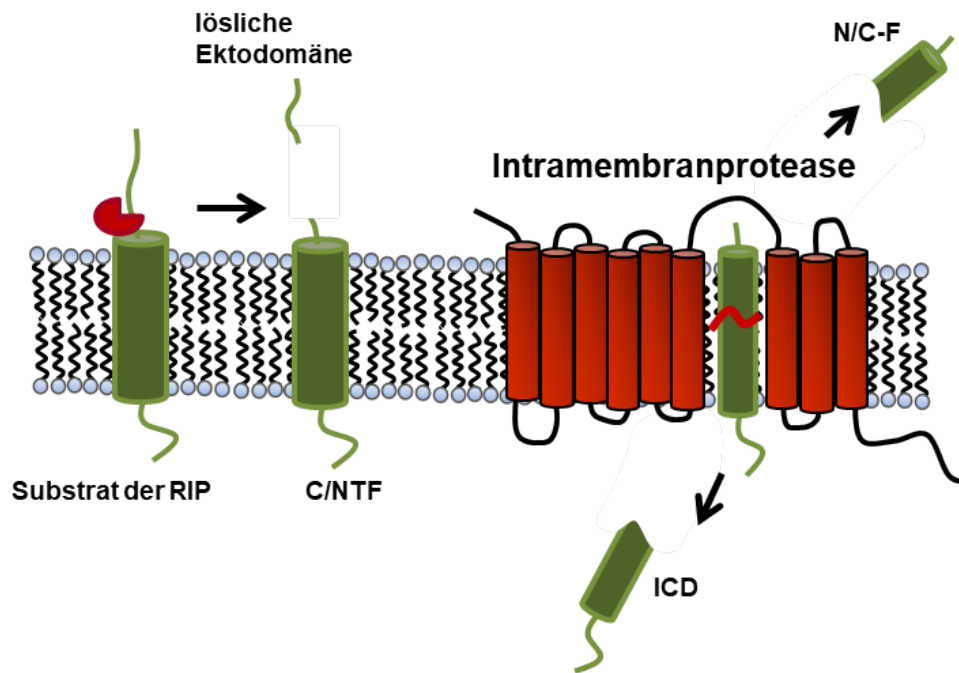


Abbildung 1: Schema der regulierten Intramembranproteolyse (RIP)

Im ersten Schritt erfolgt eine Proteolyse der Ektodomäne, welches auch *Shedding* genannt wird. Dadurch wird ein Teil des Proteins in den Extrazellulärraum als lösliche Ektodomäne freigesetzt. Der Rest des Proteins verbleibt als C- oder N-terminales Fragment (C/NTF), je nach Orientierungstyp, in der Plasmamembran. Im anschließenden Schritt erfolgt die Prozessierung dieses Fragmentes durch die Intramembranprotease (I-CLiP), wodurch zwei Fragmente freigesetzt werden. Von diesen wird eines in den Extrazellulärraum abgeschieden (N/C-Fragment (N/C-F), während das Zweite als Intrazelluläre Domäne (ICD) in das Zytosol der Zelle liberiert wird.

Dieser Prozess ermöglicht nun über verschiedene Mechanismen die Modulation von Signalwegen. Zum einen kann die Signaltransduktion variiert werden, da Intramembranproteine an einer Signalweiterleitung von extra- nach intrazellulär beteiligt sein können und durch eine Prozessierung dieser Proteine eine Veränderung, beispielsweise über eine Unterbrechung der Aktivierung von Signalwegen, induziert werden kann [9-14]. In verschiedenen Fällen kann aber auch eine intrazelluläre Domäne (ICD), als ein nach intrazellulär freigesetztes Residuum, in die Gentranskription eingreifen, nachdem eine Translokation in den Nukleus stattgefunden hat [15, 16]. Bekannte Beispiele stellen dabei beispielsweise Notch oder auch SREB dar [17-21]. Die nukleäre Translokation der ICDs dieser beiden Substrate resultiert in der Regulierung der Zelldifferenzierung beziehungsweise Cholesterolsynthese.

Drei Klassen von I-CLiPs sind bis jetzt bekannt und in Abbildung 2 dargestellt: Die erste nachgewiesene Gruppe stellt die Site-2 Protease (S2P) dar, welche zu den Metalloproteasen gehört [22].

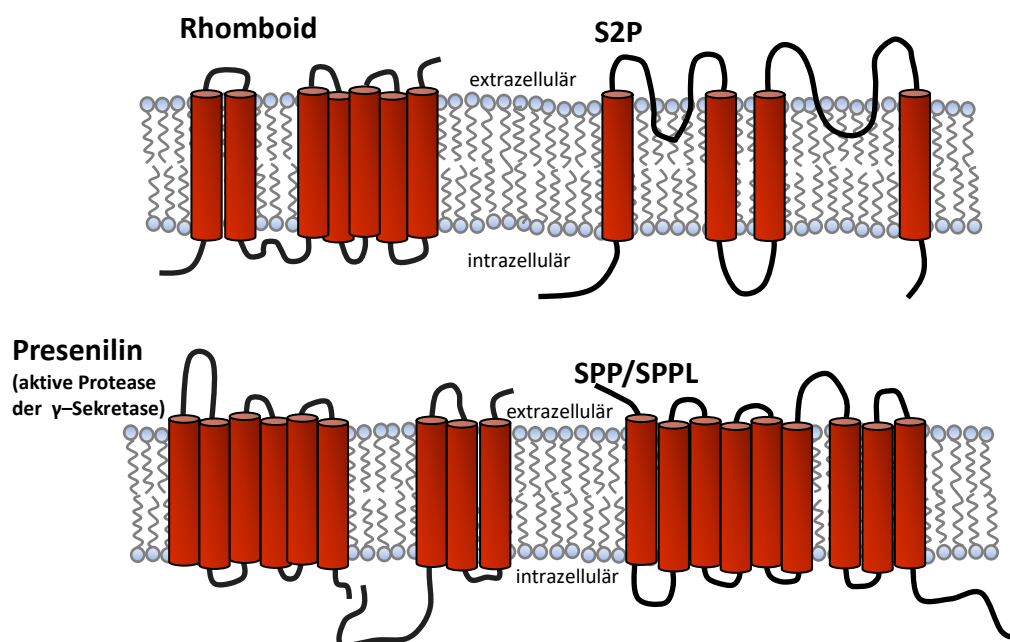


Abbildung 2: Darstellung der verschiedenen Intramembranproteasen

Darstellung der verschiedenen Formen von Intramembranproteasen. Die jeweiligen Proteasen unterscheiden sich hinsichtlich der Anzahl ihrer Transmembrandomänen und der Lokalisation ihres aktiven Zentrums. S2P: Site-2-Protease, SPP/SPPL: Signal Peptide Peptidase /-like

S2P zeichnet sich durch einen konservierten Histidin- und Glutamatrest in ihrem katalytischen Zentrum aus und definieren sich so als Zink-Metalloproteasen [8]. Eine weitere Gruppe stellen, als Serinproteasen, die Rhomboid-Proteasen dar [23]. Analog zu deren löslichen Pendants scheinen auch bei diesen membrangebundenen Proteasenvarianten die katalytische Triade aus Serin, Histidin und Asparagin das aktive Zentrum zu definieren. Die letzte Untergruppe der I-CLiPs stellen die Aspartatproteasen dar, zu welchen die Preseniline und die Signal Peptide Peptidase /-like Proteasen zählen. Allen Vertretern dieser Untergruppe ist gemein, dass sie über neun Transmembrandomänen verfügen und ein konserviertes YD und GxGD Motiv in ihrem katalytischen Zentrum besitzen [24]. Das aktive Zentrum befindet sich für alle Vertreter in der sechsten und siebten Transmembrandomäne (TMD) und auch das konservierte PAL Motiv in der TMD 9 trägt zur proteolytischen Aktivität dieser Proteasen bei [24-26]. Anders als SPP/-Ls können Preseniline lediglich in einem Komplex ihrer Funktion als Proteasen nachgehen [27-29]. Dieser Komplex, welcher als γ -Sekretase bezeichnet wird, umfasst eine Gruppierung aus vier Proteinen, bestehend aus Presenilin selbst, dem Anterior pharynx defective-1 (APH-1) Protein, Presenilin-enhancer 2 (PEN-2) und dem Substratrezeptor Nicastrin (NCT). Eine weitere Besonderheit der Aspartatproteasen liegt, neben der beschriebenen Diversität, in den unterschiedlichen Eigenschaften ihrer Substrate. So kann die γ -Sekretase lediglich Proteine, welche in Typ I Orientierung vorliegen, spalten. Bei Typ

I orientierten Proteinen zeigt das N-terminale Ende des Proteins nach extrazellulär, wohingegen der C-Terminus nach intrazellulär ragt. Bei den Mitgliedern der Untergruppe der SPP/SPPLs hingegen liegen alle bis jetzt bekannte Substrate in Typ II Orientierung vor, wobei bei diesen Proteinen der N-Terminus nach intrazellulär ragt (siehe Abbildung 3).

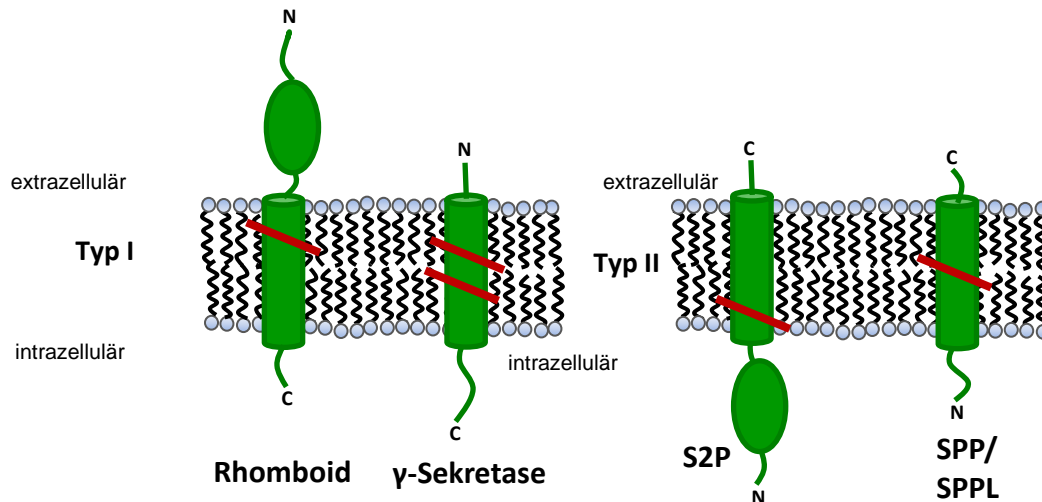


Abbildung 3: Die Degradierungsvarianten der verschiedenen Intramembranproteasen

Die grünen Proteine stellen schematisch dargestellte Proteine dar, die je nach Beschriftung in Typ I oder Typ II Orientierung vorliegen. Typ I orientierte Proteine sind in der linken Membran exemplarisch dargestellt, dazu zählen beispielsweise das Protein Spitz, das Amyloid-Precursor-Protein (APP) oder Notch. Der N-Terminus reicht nach extrazellulär. Diese Proteine werden durch Rhomboid-Proteasen oder die γ -Sekretase gespalten. In der rechten Membran sind Typ II orientierte Proteine dargestellt, deren N-Terminus nach intrazellulär reicht, bekannte Vertreter stellen beispielsweise $\text{TNF}\alpha$ oder CD74. Diese Proteine werden durch Site-2-Protease (S2P) oder Signal Peptide Peptidase (SPP) / Signal Peptide Peptidase like 2 (SPPL2) gespalten.

1.1.1. Signal peptide peptidase like 2a und 2b (SPPL2a und 2b)

Die Gruppe der Signal Peptide Peptidase / -like Proteasen besteht aus fünf Mitgliedern: die Signal Peptide Peptidase (SPP), SPP-like (SPPL) 2a, SPPL2b, SPPL 2c sowie SPPL3 [30]. Dabei sind diese hochkonserviert und können sowohl in Eukaryoten und Protozoen nachgewiesen werden [31]. Die Lokalisation der jeweiligen Proteasen reicht vom endoplasmatischen Retikulum bei SPP und SPPL2c, der Plasmamembran (SPPL2b) bis hin zum endolysosomalen System (SPPL2a) und dem Golgi-Apparat (SPPL3) [32, 33]. Die Lokalisierung in die jeweiligen Kompartimente wird teilweise durch spezifische Motive gewährleistet. SPPL2a wird, vermittelt durch das C-Terminus liegende Yxx Φ -Motiv, in

endolysosomale Kompartimente transportiert [34]. Das Einbringen einer Punktmutation innerhalb dieses Motives hat eine Akkumulation der SPPL2a Protease an der Plasmamembran zufolge, sodass die funktionelle Relevanz dieses YxxΦ-Motives als gesichert gilt [34]. SPPL2b zeichnet sich durch ein Fehlen jeglicher Sortierungsmotive aus und findet sich folglich in der Plasmamembran von Zellen wieder [35]. Jedoch zeigt sich für SPPL2b auch in gewissem Maße eine Lokalisation im Golgi-Apparat und wie SPPL2a im endolysosomalem Kompartiment [25, 34-36]. SPPL2c verbleibt, möglicherweise durch eine sich in der Nähe des N-Terminus befindene, zusätzliche hydrophobe, Region im endoplasmatischen Retikulum [30]. Nicht nur hinsichtlich ihrer Lokalisation innerhalb der Zelle unterscheiden sich die drei Vertreter der SPPL2s. Auch konnte gezeigt werden, dass jede Protease in unterschiedlichen Geweben exprimiert wird. Für SPPL2a ist eine ubiquitäre Expression in den meisten murinen Organen nachweisbar, wohingegen SPPL2b vor allem in lymphatischen Gewebe und im Gehirn nachweisbar ist [36, 37]. Für SPPL2c wurde kürzlich die Expression im murinen Hoden nachgewiesen [38, 39].

1.1.1.1. Substrate von SPPL2a und 2b

Um die Funktion und Relevanz von Proteasen beurteilen zu können, ist die genauere Betrachtung ihrer Substrate essentiell. Gerade für SPPL2a und 2b waren lange Zeit nur wenige Substrate bekannt. Die Identifizierung weiterer Substrate zeigte sich zudem als Herausforderung, da spezifische Eigenschaften, um als Substrat prozessiert werden zu können, noch nicht zufriedenstellend definiert werden konnten. Erste Substratpräferenzen bestehen in einer signifikant gekürzten Ektodomäne sowie einer Transmembrandomäne in Typ II Orientierung [26]. Das diese Eigenschaften nicht zwingend vorliegen müssen, zeigt sich beispielsweise bei Neuregulin 1 type III (NRG1 type III), einem Transmembranprotein, welches primär in einer Haarnadelstruktur vorliegt. Durch das Enzym *β-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1* (BACE1) wird das Protein in zwei, weiterhin membranverankerte, Fragmente gespalten, wobei ein Typ I und ein Typ II orientiertes Membranprotein generiert werden [40]. Nach dieser initialen Prozessierung wird dasjenige Fragment, welches in Typ II Orientierung vorliegt, durch die SPPL2s degradiert. Bei SPPL3 konnten Substrate identifiziert werden, welche ohne ein vorrangegangenes Sheddingevent degradiert werden [33, 41, 42], Grundsätzlich jedoch scheinen eine kurze Ektodomäne, sowie eine Typ II Orientierung weiterhin die besten Indikatoren für eine Substrateignung darzustellen.

Bereits identifizierte Substrate von SPPL2a und 2b können nach der Art ihrer Validierung eingeteilt werden. Viele bekannte Substrate dieser Proteasen sind lediglich *in-vitro*

nachgewiesen worden, wohingegen CD74 und LOX die einzigen *in-vivo* nachgewiesenen Substrate darstellen [36, 43]. *In-vitro* bedeutet im Rahmen dieser Arbeit, dass für die Versuche Zelllinien verwendet wurden, bei welchen die Genexpression durch Überexpression oder Inhibition von Proteinen oder der Proteasen moduliert wurde. Der Ausdruck *In-vivo* soll im Folgenden bei Versuchen mit Zellen murinen Ursprungs verwendet werden, wobei Zellen ohne genetische Modifikation (Wildtyp) mit Zellen von Mäusen verglichen werden, bei denen eine inaktive Variante der Proteasen vorliegt. Im Falle der Knockout-Mäuse wird so eine vollständige Inaktivität der Ziel-Proteasen erreicht. Wird von einem *in-vivo* validierten Substrat gesprochen, zeigte sich demnach im Mausmodell eine Akkumulation des Substrates für die SPPLs. Tabelle 1 zeigt eine Auflistung der bekannten Substrate für die Gruppe der SPPL2a und SPPL2b Proteasen.

I-CLIP	Substrate <i>in - vitro</i>	Substrate <i>in – vivo</i>
SPPL2a	TNF α	CD74
	ITM2B	LOX-1
	FasL	
	TMEM106B	
	NRG1 type III	
	FVenv	
SPPL2b	TNF α	
	ITM2B	
	Transferrin Rezeptor 1	
	NRG1 type III	
	FVenv	

Tabelle 1: Substrate der Proteasen SPPL2a und SPPL2b

Der Tumor Nekrose Faktor α (TNF α), das Integrale Membranprotein 2B (ITM2B), Neuregulin-1 type III (NRG1 type III) und das *Foamy virus envelope Protein* (FVenv) zeigen sich *in-vitro* als Substrate beider Proteasen. Bei FasLigand und TMEM106B wurde bislang nur eine Spaltung durch SPPL2a und bei Transferrin Rezeptor 1 nur bei SPPL2b beschrieben.

Eine Prozessierung von CD74 und Lektin-like oxidized LDL receptor 1 (LOX-1) wurden in Zellkulturansätzen sowohl durch SPPL2a als auch -2b beobachtet. Wird hingegen eine Prozessierung in den unterschiedlichen Knockout-Varianten für jeweils SPPL2a oder SPPL2b untersucht, zeigte sich eine Spezifität für SPPL2a.

Interessant ist hierbei die Beobachtung, dass sich die Prozessierung *in-vivo* und *in-vitro* unterscheidet. Zeigt sich für viele Substrate *in-vitro* sowohl eine Prozessierung durch SPPL2a als auch durch SPPL2b, so wurde *in-vivo* meist nur eine Prozessierung durch eine

der Proteasen beobachtet (siehe Tabelle 1). Dies wurde beispielsweise für CD74 nachgewiesen und es wird angenommen, dass aufgrund der divergenten Lokalisation von SPPL2a und SPPL2b keine Proteolyse durch SPPL2b *in-vivo* stattfindet [43].

Ein weiterer Unterschied zwischen diesen beiden Proteasen könnte sich auch bei dem Ablauf der Proteolyse zeigen. So ist für SPPL2b, ähnlich wie bei den Presenilinen, ein mehrschrittiger Spaltprozess beschrieben. Dieser beginnt am C-terminalen Ende und wird konsekutiv wiederholt, bis die hydrophobe Sequenz von der Membran losgelöst wird [14, 44]. Allerdings weist auch CD74 mehrere mögliche Schnittstellen für SPPL2a auf, sodass es möglich erscheint, dass auch hier ein mehrschrittiger Spaltprozess erfolgt, welcher jedoch noch nicht abschließend untersucht wurde.

Rückschluss auf die *in-vivo* Funktionen der Proteasen erfolgt primär anhand von Mausmodellen, welche sich defizient bezüglich der Protease SPPL2a, SPPL2b oder aber auch beider Proteasen (Doppelknockout Modell) zeigen. Phänotypisch präsentieren sich die Mäuse mit einer SPPL2a-Defizienz durch eine Mineralisierungsstörung der Zähne, wodurch sich sehr weiße Zähne mit lediglich schwach ausgebildeter Schmelzschicht zeigten [45]. Desweiteren, und auch für die nachfolgenden Arbeit relevant, zeigt sich eine Pathologie der Zellpopulationen des Immunsystems. Dabei konnte eine reduzierte Zahl und eingeschränkte Funktion der Dendritischen Zellen beobachtet werden, sowie eine Störung in der natürlichen Entwicklung von B-Zellen, welche aufgrund des Fehlens von SPPL2a in ihrer Entwicklung im Stadium T1 stagnierten [35, 45-48]. Diese Beeinträchtigung des Immunsystems konnte durch die Akkumulation des CD74 Proteins erklärt werden. Hierbei handelt es sich um ein Typ II orientiertes Protein, welches durch SPPL2a degradiert wird. In SPPL2a-defizienten Zellen kam es nun sekundär zu einer Akkumulation dieser CD74 Fragmente und zu einer Störung in der Entwicklung und Funktion der Immunzellen [46-48]. Diese Beobachtung konnte sowohl in Zellkulturansätzen durch Überexpression von CD74 sowie in einer inaktiver SPPL2a Variante gemacht werden, als auch im SPPL2a-defizienten Mausmodell. Im Falle der SPPL2b defizienten Mäuse, und demnach *in-vivo*, resultierte das Fehlen der Protease nicht mit einer Akkumulation dieser Fragmente, im Gegensatz zu *in-vitro* Versuchen, in welchen SPPL2b CD74 mit einer zu SPPL2a vergleichbaren Effektivität degradiert [49]. Dies deutet auf die Relevanz der Lokalisation der Proteasen hin, welche *in-vitro* nicht der *in-vivo* zu entsprechen scheinen.

Ein Vertreter der C-Typ Lektin Rezeptoren stellt der Rezeptor Lektin-like oxidized LDL receptor 1 (LOX-1) dar, welcher sich ebenfalls als ein *in-vivo* Substrat von SPPL2a zeigte [50]. LOX-1 spielt durch Bindung von oxidierten LDL eine wichtige Rolle in der Ausbildung von Atherosklerose. Dabei wird durch die Akkumulation von oxidierten LDL (oxLDL) eine Aktivierung des Endothels ausgelöst, mit einer daraus resultierenden Dysfunktion und pathologischen Entzündungsreaktion und Ausbildung von arteriosklerotischen Plaques [51-

53]. Doch auch neben einer Bindung und Aufnahme von oxLDL zeigt sich LOX-1 funktionell relevant durch eine Aktivierung der Mitogen-aktivierenden Protein (MAP) Kinase sowie des NF κ B Signalweges [54, 55], was zu einer Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen führt, welche wiederum die Ausbildung von Artherosklerose bedingen [56]. SPPL2a/2b-defizienten Mäuse zeigten in einem Atherosklerose-Modell eine deutlich erhöhte Plaque- und Fibroseentwicklung [50], erklärbar durch eine gestörte Prozessierung von LOX-1 mit einer Akkumulation und einer verstärkten Entzündungsreaktion.

1.2. C-Typ Lektin Rezeptoren (CTLR)

Eine suffiziente Immunabwehr des Körpers gegen Bakterien oder Pilze ist von großer Bedeutung und kann bei Dysfunktion zu schweren Krankheitsbildern führen. So führt eine iatrogene Manipulation des Immunsystems beispielsweise im Rahmen einer TNF α – Suppressionsbehandlung bei Morbus Crohn, im Kontext einer Transplantation mit verschiedenen Immunsuppressiva, wie den Calcineurininhibitoren oder eine inhalative Corticosteroidbehandlung in der Therapie des Asthmas bronchiale zu erhöhter Suszeptibilität gegenüber Pilz- oder bakteriellen Infektionen. Auch im Rahmen von immunsuppressiven Erkrankungen, wie der AIDS-Erkrankung, wird die Bedeutung des körpereigenen Abwehrsystems deutlich.

Die Pattern Recognition Receptors (PRR) erkennen und binden Pathogene wie Pilze oder Mykobakterien anhand diverser Proteine, Nukleinsäuren, Lipide oder Kohlenhydrate und spielen aus diesem Grunde eine wichtige Rolle bei der Pathogenerkennung und in der Orchestrierung der angeborenen Immunität. Es sind vier verschiedene Gruppen unter den PRRs beschrieben, dazu gehören die Toll-like Rezeptoren (TLRs), die RIG-I-like Rezeptoren (RLRs), NOD-like Rezeptoren (NLRs) und die C-type Lektin Rezeptoren (CTLRs) [29, 45].

Eine elementare Rolle bei der Identifizierung und Bekämpfung mikrobieller Erreger spielen die C-type Lektin Rezeptoren (CTLR). Es werden 17 Gruppen von Rezeptoren beschrieben, von denen viele in der Membran verankert ihre Funktionen ausüben [57]. Einige Beispiele sind Dendritic cell-associated C-type Lektin 1 und 2 (Dectin-1 und -2), Dendritic cell immunoreceptor (DCIR), Blood dendritic cell antigen 2 (BDCA 2), Macrophage C-Type Lektin (MCL) und Macrophage inducible C-type Lektin (Mincle). Bei der Erstbeschreibung dieser neuen Gruppe wurde eine obligate Bindung von Calcium beschrieben, die den Rezeptoren die Ligandenbindung erst ermöglichen soll. So wurde der Name C-type Lektin receptor, wobei das C für die Calciumbindung steht, etabliert. Im Laufe der weiteren

Erforschung dieser großen Gruppe zeigte sich jedoch, dass diese Calciumbindung nicht bei allen Mitgliedern zwingend vorliegen muss [57].

Gemeinsam sind den Rezeptoren die Typ-II Orientierung in der Membran. Zudem besitzen die Mehrzahl der Rezeptoren die Fähigkeit, Kohlenhydrate über eine *carbohydrate-recognition domain* (CRD) zu binden.

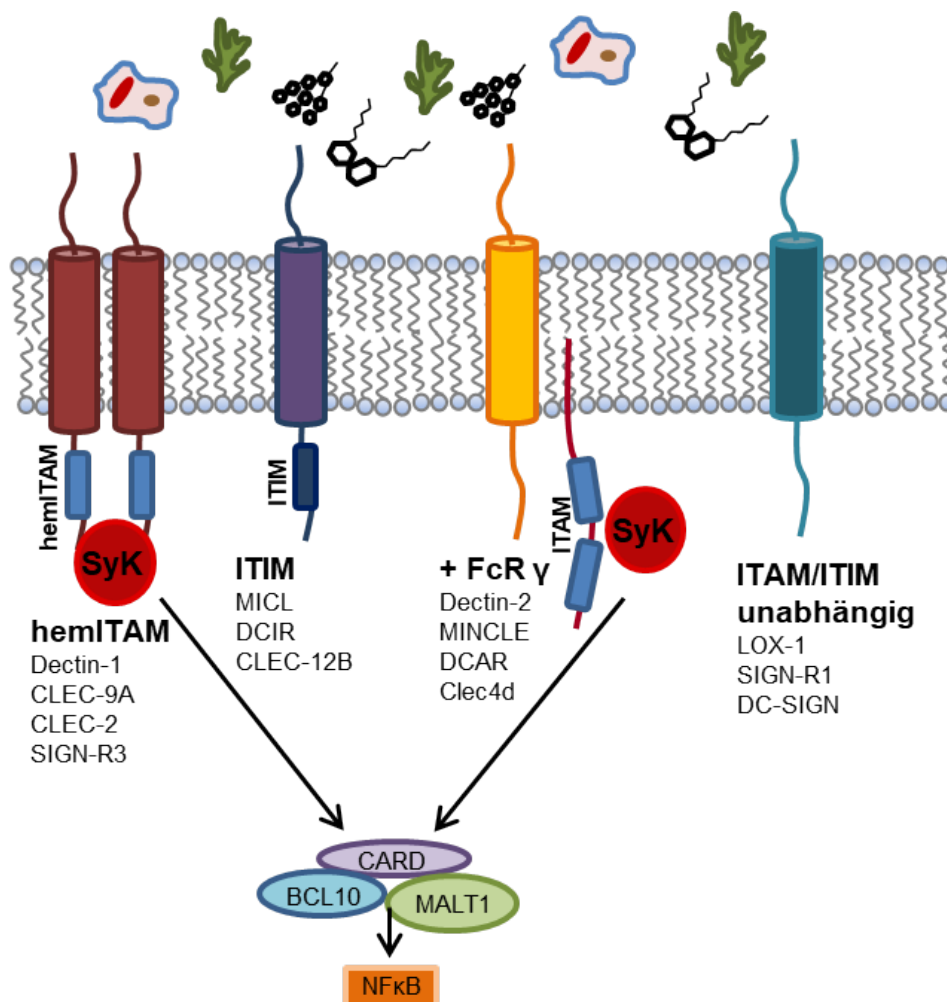


Abbildung 4: Untergruppen der C-typ Lektin Rezeptoren (CTLR)

Die verschiedenen Mitglieder der CTLRs können hinsichtlich ihrer unterschiedlichen Signaltransduktionen in vier Untergruppen eingeteilt werden. Dabei besitzen einige dieser Rezeptoren ein *hemi-immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (hemITAM) an ihrem intrazellulären N-terminalen Ende (Dectin-1), andere zeichnen sich durch ein *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif* (ITIM) aus (DCIR), wodurch diese einen inhibierenden Einfluss auf andere CTLRs besitzen. Die dritte Gruppe zeichnet sich dadurch aus, dass eine Signalweiterleitung nur über die Bindung von FcR γ erfolgen kann, welcher die dafür notwendigen ITAM besitzt (Mincle, Dectin-2). Für die vierte Gruppe ist bislang kein Signalmotiv beschrieben worden, die Induktion einer Signalweiterleitung ist damit noch nicht verstanden (LOX-1). Durch eine doppelte Phosphorylierung von SyK erfolgt über die CARD9/Bcl-10/MALT1-Kaskade eine Aktivierung von NF κ B und damit eine Modulation der Transkription.

Durch Bindung von Liganden in Form von *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP), kann eine direkte Reaktion auf ein Pathogen ausgelöst werden. Hierbei kommt es über verschiedene Signalwege zu einer Zytokinausschüttung mit Aktivierung des Immunsystems [58-61]. Einige der Rezeptoren ermöglichen auch über die Phagozytose eine Internalisierung des Pathogens, welches nach erfolgter Aufnahme intrazellulär dem endolysosmalen Kompartiment zugeführt wird, wo es degradiert und somit unschädlich gemacht wird [62]. Nachfolgend werden Pathogenfragmente an die Zelloberfläche transportiert. Über diese Antigenpräsentierung kommt es zur Vermittlung der Bildung von spezifischen Antikörpern und somit zu einer Aktivierung der adaptiven Immunantwort [63-65].

Die Ligandenbindung der einzelnen Rezeptoren wird in der Literatur divers diskutiert und in einigen Fällen unterscheiden sich die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen hinsichtlich bestimmter Ligandenpräferenzen. Dies legt den Schluss nahe, dass durch die große Redundanz der Rezeptoren im Laufe der Evolution ein überlappendes System etabliert wurde, bei der auch durch Störungen einzelner Rezeptoren eine Immunantwort gewährleistet werden kann.

Die Typ II Orientierung der CTLRs und Voruntersuchungen, welche Dectin-1 als ein Substrat der SPPL2a und 2b Proteasen vermuten ließen, waren ausschlaggebend für den Entschluss, die mögliche Prozessierung zweier weiterer ausgewählter CTLRs, Dectin-2 und Mincle, in dieser Doktorarbeit zu analysieren.

Für Dectin-1 wurde in ersten Versuchsreihen nach Ligandenbindung eine Internalisierung beobachtet, welche in einer Prozessierung des Proteins mit dem Nachweis eines N-terminalen Fragmentes resultierte, siehe Abbildung 5. Dabei ermöglichte die Markierung des Proteins an seinem zytosolischen N-terminalem Ende (NTF) eine genauere Interpretation über die weitere Prozessierung. Durch die zusätzliche Inhibition oder aber durch die genetische Modulation mit aktiven beziehungsweise inaktiven Proteasen konnte so, zumindest in Zellkulturansätzen, eine Prozessierung des NTFs von Dectin-1 durch SPPL2a und 2b beobachtet werden [66]. Somit scheint die Ligandenbindung eine Internalisierung und Degradierung der CTLRs zu initiieren. Dieses Modell stellte die Grundlage des Versuchsaufbaus für diese Arbeit dar.

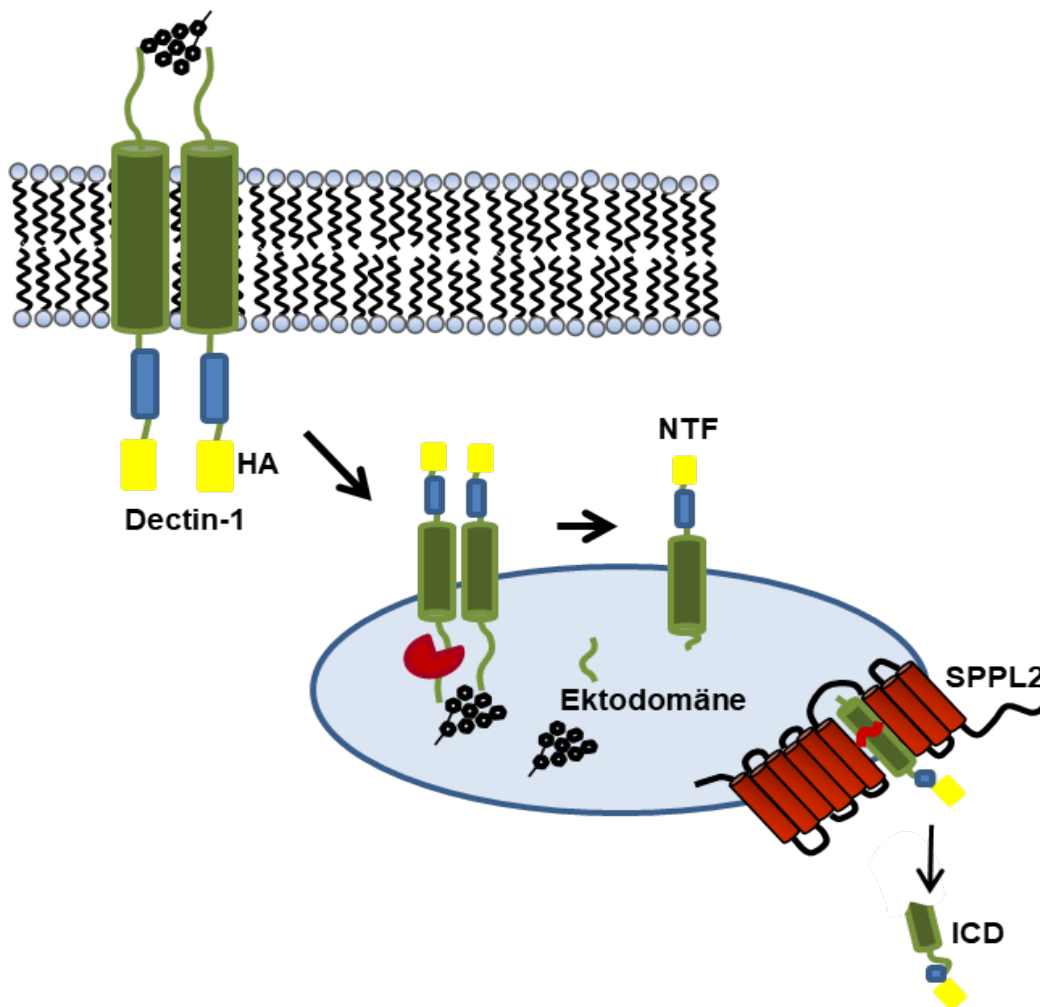


Abbildung 5: Durch die Bindung eines Liganden an Dectin-1 erfolgt die Internalisierung und Prozessierung des Rezeptors

Nach Bindung eines Liganden, wie β -Glykan, wird der C-type Lektin Rezeptor Dectin-1 internalisiert. Im endolysosomalen Kompartiment erfolgt ein Abspalten der Ektodomäne und im nachfolgenden Schritt die Prozessierung des NTFs durch die SPPL2s. Dabei wird ein Fragment in das Zytosol der Zelle frei, das im Weiteren als Intrazelluläre Domäne (ICD) bezeichnet wird. Die Vollängenproteine sowie die einzelnen Fragmente können mithilfe des HA-Epitops und passender Antikörper nachgewiesen werden.

1.2.1. Dectin-2 und Mincle

Murines Dectin-2 wurde erstmals in dendritischen Zellen entdeckt [67] und nach Dectin-1 benannt. Es ist jedoch zu erwähnen, dass sich lediglich eine Homologie von 19,6% in der Gesamtsequenz bzw. 24,8% in dem CRD Motif zwischen Dectin-1 und Dectin-2 finden lässt [68]. Murines Dectin-2 (mDectin-2) besteht aus 209 Aminosäuren, besitzt eine einzelne extrazellulär liegende CRD, die ein EPN-Motiv der Aminosäuren Glutamin, Prolin und Asparagin und eine N-Glykosylierungsstelle an Position 131 enthält. Die ICD von mDectin-2 umfasst 20 Aminosäuren und der präsumierten Transmembrandomäne von Aminosäure

21 bis 42 schließt sich die Extrazellulärdomäne (ECD) an. Es wurden drei Isoformen von mDectin-2 beschrieben, welche sich durch unterschiedliches Spleißen in der Länge der ECD unterscheiden. Variante 1 ist die erstbeschriebene Form murinen Dectin-2s, die 2. und 3. Variante zeichnen sich durch a) 34 Aminosäuren mit noch vollständiger CRD oder b) 42 Aminosäuren mit einer Interruption der CRD aus [68]. Die intrazelluläre Domäne bleibt in all diesen Isoformen gleich und so scheint eine zusätzliche Funktion neben der Ligandenbindung bei mDectin-2 möglich.

Humanes Dectin-2 (hDectin-2) besteht ebenfalls aus 209 Aminosäuren, die putative Transmembrandomäne reicht, anderes als bei der murinen Form, nur bis zur 41. Aminosäure. Des Weiteren liegen zwei Glykosylierungsstellen an den Positionen 131 und 170, wobei erstere strukturell der des mDectin-2 entspricht. Auch beim humanen Dectin-2 ist eine Spleißvariante bekannt, welche sich allerdings durch eine Deletion von Aminosäuren 11-40 auszeichnet. Somit fehlen ein Teil der ICD sowie die Transmembrandomäne. Es wurde daher die Hypothese aufgestellt, dass es sich hierbei um eine sezernierte Variante von hDectin-2 handeln könne [69]. Sowohl beim Menschen, als auch bei der Maus wird Dectin-2 von einer Vielzahl von myeloischen Zellen exprimiert, darunter Gewebemakrophagen, neutrophile Granulozyten und mehrere Formen dendritischer Zellen [68, 70, 71].

Der CTLR Mincle wurde erstmals 1999 von Matsumoto, Tanaka et al. in Peritonealmakrophagen beschrieben [67]. Nach Stimulation dieser mit den Entzündungsmediatoren LPS, TNF- α , IL-6, und IFN- γ wurde die mRNA isoliert und es zeigte sich eine starke Expression von Mincle, welche in NF-IL6 defizienten Zellen nicht mehr anzutreffen war.

Murines Mincle (mMincle) besteht aus 214 Aminosäuren, die ICD umfasst 22 Aminosäuren und die Transmembrandomäne wird aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften zwischen der 23. und der 45. Aminosäure eingeordnet. Die ECD besitzt eine CRD an Position 87 – 206, in welcher, ähnlich wie bei Dectin-2, ein EPN-Motiv anzutreffen ist. Eine Glykosylierungsstelle befindet sich an Position 107 der Proteinsequenz. Humanes Mincle besteht aus 219 Aminosäuren. Die ICD ist hier bis zur 19. Aminosäure beschrieben, die Transmembrandomäne verläuft von der 20. bis zur 40. Aminosäure. Die ECD besitzt, gleich dem mMincle, eine CRD von Position 87 - 206 und ein EPN-Motiv. Abweichend vom murinen Mincle sind jedoch zwei mögliche Glykosylierungsstellen an Position 62 und 107 anzutreffen. Mincle wird sowohl im Menschen als auch in der Maus in Makrophagen, Monozyten, Neutrophilen Granulozyten, myeloiden dendritischen Zellen und in einigen B-Zell Unterarten exprimiert [72, 73].

Die bei Mincle anzutreffende Carbohydrate Recognition Domain (CRD) bindet mit dem EPN-Motiv, bestehend aus Glutaminsäure, Asparagin und Prolin, Kohlenhydrate, wie

Mannose oder Glucose [74-77]. Mithilfe dieses Motives erkennen Mincle-exprimierende Zellen eine Vielzahl an Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (PAMPs).

Die PAMPs gehören einer Gruppe konservierter Moleküle an, welche spezifische Struktur-moleküle bakterieller, viraler oder mykotischer Erreger darstellen und weder beim Menschen noch bei Tieren vorkommen. Die von Mincle erkannten PAMPs werden beispielsweise von pathogenen Pilzen, wie *C. albicans*, *A. fumigatus*, *Malassezia spp.*, *F. pedrosoi*, *P. carinii* [74, 75, 78-82] sowie *Mycobakterium tuberculosis* [83-85] exprimiert. Zudem werden endogene Zellwandbestandteile und *Damage-associated molecular patterns* (DAMPs), eine Gruppe von endogenen Biomolekülen, welche bei Gewebsschädigung und Zelluntergang aus dem Zellkern oder Zytoplasma freigesetzt werden, von Mincle erkannt und gebunden [86-88]. Auch Dectin-2 verfügt mithilfe des EPN-Motives in der CRD über die Möglichkeit der PAMP - Identifizierung und Bindung, wobei hier vor allem die Bindung von α -Mannan, aber auch die Bindung von β -Glukanen, eine Rolle zu spielen scheint [59, 78, 89-95]. Die Verwandtschaft zu Mincle zeigt sich bezüglich der Erkennung von *A. fumigatus*, *Malassezia spp.*, *F. pedrosoi* und *C. albicans*, aber auch *C. glabrata*, *M. audouinii*, *Capsulatum* und *T. rubrum* werden durch Dectin-2 gebunden [78, 90, 91, 93, 96, 97].

In der Literatur wurde sowohl für Dectin-2 als auch für Mincle eine Bindungsstelle mit dem *fragment crystallisable receptor* (Fc γ) beschrieben, welcher mit einem ITAM-Motiv den Signaltransduktionsprozess nach Ligandenbindung ermöglicht [86, 90], siehe Abbildung 4. Zudem wurde für Mincle eine Interaktion mit dem *Myeloid Leukemia cell Differentiation Protein* (MCL) beschrieben [98], durch die auch MCL über Fc γ Signaltransduktionskaskaden initiieren kann. Diese Bindung an Fc γ scheint essenziell für die Funktion der C-typ Lektin Rezeptoren (CTLRs). Dabei findet, nach Bindung des Pathogens an den Rezeptor, durch die *Src family* Kinasen, eine Phosphorylierung des Tyrosins innerhalb des ITAM-Motives statt. Resultierend erfolgt anschließend eine Rekrutierung und Aktivierung der *Syk Kinase*. In der anschließenden Signalkaskade resultiert über die *Syk/PKC δ -abhängigen CARD9/Bcl-10/MALT1-Achse* eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B mit einer anschließenden Produktion von inflammatorischen Zytokinen [90, 99], siehe Abbildung 4.

Die Relevanz von Dectin-2 sowie Mincle wird hinsichtlich der Initiierung der Immunantwort von, für diese Proteine defiziente Mäuse, erkennbar. Dabei zeigt sich bei Fehlen der jeweils einzelnen Proteine eine deutliche Reduktion der Zytokinantwort, insbesondere von IL-6, TNF- α , IL-12 und INF- γ [63, 73, 100].

Bei Abwesenheit von Dectin-2 zeigte sich äquivalent dazu eine deutlich eingeschränkte Inflammationskaskade. Als positive Konsequenz zeigt sich beispielsweise eine verbesserte Wundheilung oder ein verringertes Infarktareal bei ischämisch-bedingter Nekrose im

Rahmen eines Myokardinfarktes [100]. Ursache ist die geringere Aktivierung von Makrophagen, Neutrophilen und Fibroblasten [100]. Analog dazu ist aber auch eine deutliche Beeinträchtigung des Immunsystems zu beobachten mit schweren bakteriellen Infekten und Mykosen. So konnte bei Dectin-2, aber auch bei Mincle-defizienten Mäusen eine deutlich erhöhte Prädisposition für schwere systemische Pilzinfektionen beobachtet werden, welche häufig tödlich enden [59, 75, 82, 90, 93, 101]. Zugrunde liegt eine deutlich reduzierte Aktivierung von TH17-Zellen [59, 102, 103]. Im Menschen zeigt sich beispielsweise bei Patienten mit rheumatoider Arthritis eine signifikante Hochregulierung der Mincle-Genexpression [82], was auf eine Relevanz dieses Proteins auch für autoimmunologische Erkrankungen hinweist.

1.3. Tumor Nekrose Faktor Familie

Die Tumornekrosefaktor - Superfamilie (TNF) umfasst eine große Anzahl an Typ II orientierten Membranproteinen, welche durch diverse Prozesse eine Modulation der Zellproliferation, Zelldifferenzierung und des Zelltodes induzieren [104]. Dies wird durch eine Interaktion der Proteine oder löslichen Fragmenten mit entsprechenden Rezeptoren ermöglicht [105].

Mit über 40 bekannten Mitgliedern stellt sich diese Gruppe sowohl hinsichtlich ihrer intrazellulären Domänen als auch der extrazellulären Domäne als variabel dar [106]. Gemeinsamkeiten zeigen sich beispielsweise darin, dass die Mehrzahl der Proteine als Typ II orientierte Transmembranproteine vorliegen und durch Shedding lösliche Liganden gebildet werden, welche aus dem extrazellulären Anteil des Proteins bestehen. Nach einem Zusammenschluss von drei solcher Monomere entsteht ein biologisch aktives Trimer, welches an entsprechende Rezeptoren binden kann. Aufgrund der Variabilität des extrazellulären Anteils der jeweiligen Proteine kann eine spezifische Liganden-Rezeptor-Bindung gewährleistet werden.

1.3.1. *Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis* (Tweak)

Das ubiquitär vorkommende Protein *tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis* (Tweak) nimmt noch immer eine kryptische Rolle ein. Initial als Induktor der Apoptose beschrieben [104], zeigten darauffolgende Forschungsergebnisse, dass die Rolle von Tweak weit über das Aktivieren eines Apoptosesignal hinausgeht. So beeinflusst Tweak auch die Angiogenese, Zellmigration, die Regeneration von Leberparenchym und

Muskulatur und spielt in einer Vielzahl an Autoimmunerkrankungen, wie der rheumatoiden Arthritis, des systemischen Lupus erythematoses als auch bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine bislang noch nicht vollständig verstandene Rolle [107].

Tweak besteht aus 249 Aminosäuren, wobei 206 dieser Aminosäuren die C-terminale Extrazellulärdomäne bilden. Diese *TNF homology domain* (THD) beinhaltet eine potentielle N-Glykosylierungs-Stelle und ist bei allen Tumor Nekrose Faktor- (TNF) Familienmitgliedern anzutreffen. Nach Bindung der THD an Cystein-reiche Domänen (CRDs) von TNF Rezeptoren werden intrazelluläre Kaskaden unterschiedlichster Form ausgelöst [108].

Als Rezeptor wurde bisher der *fibroblast growth factor-inducible molecule* (Fn14) Rezeptor, der zu den TNF Rezeptoren gehört, identifiziert. Die Bindung der THD induziert eine starke Aktivierung des NFκB – Signalweges. Dabei muss erwähnt werden, dass eine Einteilung in einen klassischen und einen alternativen Signalweg vorliegt. Bei dem *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* (NFκB) handelt es sich um eine Gruppe von dimeren Transkriptionsfaktoren, die über eine intranukleäre Interaktion in die Zellproliferation, Apoptose sowie in die Regulation der Immunantwort eingreifen [109]. Im Falle des klassischen NFκB-Signalweges wird über eine Phosphorylierung und anschließender Degradierung der Faktor NFκB aktiviert. Als Enzym fungieren dabei die IκB-Kinasen; Substrat ist IκB, ein an NFκB gebundener Inhibitor. Dadurch verändert sich dessen Lokalisation und NFκB kann aus dem Zytosol in den Nukleus wandern und dort an spezifische DNA Sequenzen binden. Der alternative NFκB Signalweg wird durch TRAF2-Moleküle initiiert, welche an dem Rezeptor von Tweak (Fn14) anzutreffen sind. Dies resultiert in einer Akkumulation der *NFκB-inducing kinase* (NIK), wodurch über eine weitere Kinase letztendlich das aktive p52-Molekül entsteht. Beide können in unterschiedlichem Maße, je nach Präsentation des löslichen oder membrangebundenen Ligandens von Tweak, aktiviert werden [110, 111].

Die Transmembrandomäne des Proteins umfasst 25 Aminosäuren und ist durch ihren hydrophoben Charakter von der N-terminalen intrazellulären Domäne (ICD) zu unterscheiden. Diese besteht aus 18 Aminosäuren und weist eine mögliche Proteinkinase C Phosphorylierungsstelle auf [104, 112].

Mit TNFα und dem FasLiganden (FasL) sind bereits zwei der Mitglieder der TNF-Superfamilie als Substrate der Proteasen SPPL2a und SPPL2b identifiziert worden [14, 113, 114]. Basierend auf der Verwandtschaft zu diesen Proteinen und publizierten Berichten über die proteolytische Freisetzung einer löslichen Tweak-Ektodomäne, wahrscheinlich durch die Proproteinkonvertase Furin [104, 115], stellte sich Tweak als ein interessantes Protein dar, dessen Prozessierungen durch verschiedene Proteasen genauer untersucht werden soll.

Wie bei vielen Mitgliedern der TNF/TNFR Superfamilie wird eine Vielzahl der von Tweak beschriebenen Funktionen über das lösliche extrazellulär-gelegene Fragment induziert. Nach erfolgreicher Abspaltung durch die Protease Furin befindet sich das nun freie Tweak-Fragment im Extrazellulärraum, wo es mit zwei weiteren Tweak-Fragmenten ein Homotrimer bildet und nun als Ligand an den Fn14-Rezeptor auf anderen Zellen bindet [116-120]. Dieser Rezeptor verfügt über ein Sequenzmotiv, über welches eine Bindung mit den TNFR-associated factors (TRAF) ermöglicht wird [119, 121]. Das Motiv mit der Sequenz „P-I-E-E“ ist für TRAF 1, TRAF 2, TRAF 3, TRAF 4 und TRAF 5 kompatibel, sodass eine Signaltransduktion über diese Faktoren anzunehmen ist [119]. Eine Aktivierung des NF- κ B-Signalweges in Tweak/Fn14-überexprimierenden Zelllinien bestätigte diese Hypothese und lässt Einblicke in die Funktionsweise des TNF/TNFR-Komplexes zu [112, 122, 123]. Über diese zellulären Interaktionen wird die Genexpression moduliert und somit in die weitere Entwicklung der Zelle aber auch des gesamten Organismus eingegriffen. So soll der Tweak-Fn14 Signalweg eine Rolle in der Pathogenese von inflammatorischen Autoimmunerkrankungen spielen, wie zum Beispiel bei der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), die zur Erforschung der Multiplen Sklerose bei Versuchstieren evoziert wird [124]. Auch eine verstärkte Autoimmunenzephalitis bei erhöhten Tweak-Leveln wurde beobachtet [115]. Die Angiogenese in der Kornea von Ratten wurde durch Tweak stimuliert [115, 125], zudem ist eine Tweak-abhängige Regulation von Adhäsionsmolekülen sowie die Sekretion von Zytokinen im Rahmen pro-inflammatorischer Geschehen beschrieben [124, 126, 127]. Aber auch das membrangebundene Tweak kann Signalwege induzieren und Funktionen übernehmen, wie die Induktion der Differenzierung von RAW264.7 Zellen, ohne Fn14 Beteiligung [106], wobei zur funktionellen Relevanz des membrangebundenen Tweaks nur wenig Daten vorliegen. Aus diesem Grunde ist das Verständnis und die weitere Erforschung von Tweak und seiner Funktionen sehr interessant für Pathogenese und Therapie verschiedenster Krankheitsbilder [104, 122, 128-130].

1.3.2. Ziel dieser Arbeit

Die Bedeutung der Proteasen SPPL2a und SPPL2b wird evident durch das ubiquitäre Vorkommen dieser in einer Großzahl von Eukaryonten, wie in Pilzen, Protozoen, Pflanzen und Tieren [6]. Dabei liegen die codierenden Gene hoch konserviert und somit wenig verändert vor, was ebenfalls die funktionelle Bedeutung hervorhebt. Dennoch ist weiterhin wenig über diese Proteasen bekannt. Erste Hypothesen hinsichtlich der notwendigen Substrateigenschaften, insbesondere die Typ II Orientierung des Proteins sowie die kurze

Ektodomäne, zeigen sich durch Beispiele bestätigt. Eine bestimmte Sequenz als Schnittstelle ist hindessen weiterhin nicht bekannt.

Neben diesen funktionellen Aspekten ist aber auch die pathophysiologische Rolle dieser Intramembranproteasen weiterhin zu großen Teilen unverstanden. Nur zwei der bislang entdeckten Substrate konnten auch *in vivo* verifiziert werden. CD74, die invariante Kette des MHCII Moleküls, stellt ein Substrat für SPPL2a dar. Hier wurde in SPPL2a-defizienten Mäusen eine schwere Beeinträchtigung des Immunsystems durch eine Reifestörung der B-Zellen beobachtet [48]. Mit LOX-1 wurde ein weiteres Substrat verifiziert und eine weitere pathophysiologische Rolle bei SPPL2a/2b-Defizienz aufgezeigt. Eine Akkumulation bei Defizienz von SPPL2a/2b zeigte die Fähigkeit des LOX-1 NTFs auf, pro-atherogene sowie pro-fibrinogene Signalwege zu aktivieren [50]. Diese Beobachtungen zeigen die therapeutischen Möglichkeiten einer pharmakologischen Modifikation der Aktivität der besprochenen Proteasen SPPL2a/2b auf.

Die pathophysiologische Rolle von SPPL2a und SPPL2b wird durch ihre Substrate definiert und somit ist es Ziel dieser Arbeit, weitere Substrate zu identifizieren, um ein besseres Verständnis für die Funktion der Intramembranproteasen zu erhalten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Proteolyse und Regulation von drei dieser Proteine durch SPPL2a/b untersucht: Tweak, Dectin-2 und Mincle. Die Auswahl dieser Proteine erfolgte aufgrund ihrer Membrantopologie sowie ihrer Zugehörigkeit zu Proteinfamilien (TNF Familie, CTLRs), aus denen bereits Substrate bekannt sind. Dazu wurden in verschiedenen zellulären Systemen der Einfluss von SPPL2a/b auf die Proteinspiegel sowie die proteolytische Prozessierung, die Lokalisation, die Funktion und den Abbau analysiert. Basierend darauf erfolgte dann eine erste Analyse hinsichtlich möglicher pathophysiologischer Effekte einer gestörten Proteolyse dieser Substrate in SPPL2a/b doppeldefizienten Mäusen. Im Hinblick auf die Beteiligung dieser Proteine an verschiedenen Krankheitsprozessen kann erwartet werden, dass neue Erkenntnisse über die Regulation dieser Proteine durch SPPL2a/2b-Proteasen von hoher medizinischer Relevanz sind.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien und Geräte

Sofern nicht anders beschrieben, stammten alle Chemikalien von den Firmen Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) oder Merck (Darmstadt, Deutschland).

Je nach Notwendigkeit erfolgte die Herstellung von Lösungen / Verdünnungen mit destilliertem Wasser aus einer zentralen Anlage, doppeldestilliertem Wasser aus einer Millipore-Anlage (Millipore, Schwalbach, Deutschland) oder in Dimethylsulfoxid (DMSO). Abweichungen sind aus der entsprechenden Methodenbeschreibung zu entnehmen.

Sämtliches Verbrauchsmaterial für die Zellkultur sowie die verwendeten 96- und 384-Well-Platten wurden von der Firma Sarstedt (Wedel/Deutschland) bezogen.

2.1.2. Mäusezucht

Die Mäuse wurden in einer sterilen Umgebung in einzeln belüfteten Käfigen (IVCs) in einem auf 19-21 °C temperierten Raum mit einem Hell-Dunkel-Zyklus von 12 Stunden und mit einer Luftfeuchtigkeit von 45-60% gehalten.

Zucht und Haltung der Tiere sowie die Tötung zur Organentnahme wurden nach den Richtlinien der Christian-Albrechts-Universität beziehungsweise des Ministeriums für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein (V 242.7224.121-3) durchgeführt. Die innerhalb einzelner Experimente untersuchten Tiere waren vergleichbaren Alters und Geschlechts.

Sämtliche für die Arbeit verwendeten Mauslinien wurden von PD Dr. Schröder bereitgestellt. Die Generierung SPPL2a/b doppel-defizienter Mäuse ist in Schneppenheim et al. 2014 [47] beschrieben.

2.1.3. Verwendete Antikörper

Tabelle 2: Liste der verwendeten Antikörper

Antikörper	Klon/Epitop	Abstammung	Hersteller	Verwendung
β-Aktin		Kaninchen, Polyklonal	SIGMA	WB (1:5000)
pERK1/2 (T202/Y204)	D13.14.4E	Kaninchen, Monoklonal	Cell Signaling	WB (1:1000)
FLAG-PE	L5	Ratte, Monoklonal	Biologend	FC (1:200)
HA	3F10	Ratte, Monoklonal	Roche	WB (1:2000) IF (1:300)
Myc-PE	9B11	Maus, Monoklonal	Cell Signaling	WB (1:2000) IF (1:200)
LAMP2	2D5	Maus, Monoklonal	Andrej Hasilik (Universität Marburg)	IF (1:500)
hSPPL2a	aa 504-520	Kaninchen, Polyklonal	Pineda	WB (1:1000)
mSPPL2a	aa 77-94	Kaninchen, Polyklonal	Pineda	WB (1:1000)
mSPPL2b	aa 562-578	Kaninchen, Polyklonal	Pineda	WB (1:200)
mTNFα	aa 4-22	Kaninchen, Polyklonal	Pineda	WB (1:1000) IF (1:100)

2.1.4. Plasmid Liste

Tabelle 3: Liste der verwendeten Plasmide

Konstrukt	Organismus	Vektor	Antibiotika Resistenz	Herkunft
HA-Tweak	<i>M. musculus</i>	pcDNA3. 1 hygro(+)	Ampicillin; Hygromycin	Eigene Herstellung
HA-Tweak	<i>M. musculus</i>	pcDNA5. 1 FRT	Ampicillin; Hygromycin	Eigene Herstellung

Konstrukt	Organismus	Vektor	Antibiotika Resistenz	Herkunft
Tweak ICD - TEV	<i>M. musculus</i>	pcDNA5. 1 FRT/TO	Ampicillin; Hygromycin	Eigene Herstellung
Tweak ICD - A7	<i>M. musculus</i>	pcDNA5. 1 FRT/TO	Ampicillin; Hygromycin	Eigene Herstellung
HA-MINCLE	<i>M. musculus</i>	pcDNA3. 1 hygro(+)	Ampicillin; Hygromycin	Eigene Herstellung
HA-MINCLE-FLAG	<i>M. musculus</i>	pcDNA3. 1 hygro(+)	Ampicillin; Hygromycin	Eigene Herstellung
HA-MINCLE	<i>M. musculus</i>	pcDNA5. 1 FRT	Ampicillin; Hygromycin	Eigene Herstellung
HA-MINCLE-FLAG	<i>M. musculus</i>	pMSCV puro	Ampicillin; Puromycin	Eigene Herstellung
HA-Dectin2	<i>M. musculus</i>	pcDNA3. 1 hygro(+)	Ampicillin; Hygromycin	Eigene Herstellung
HA-Dectin2-FLAG	<i>M. musculus</i>	pcDNA3. 1 hygro(+)	Ampicillin; Hygromycin	Eigene Herstellung
HA-Dectin2	<i>M. musculus</i>	pcDNA5. 1 FRT	Ampicillin; Hygromycin	Eigene Herstellung
HA-Dectin2-FLAG	<i>M. musculus</i>	pMSCV puro	Ampicillin; Puromycin	Eigene Herstellung
FcRy-V5	<i>M. musculus</i>	pcDNA3. 1 hygro(+)	Ampicillin; Hygromycin	Eigene Herstellung
MCL-myc	<i>M. musculus</i>	pcDNA3. 1 hygro(+)	Ampicillin; Hygromycin	Eigene Herstellung
mSPPL2a-myc	<i>M. musculus</i>	pcDNA3. 1 hygro(+)	Ampicillin; Hygromycin	Arbeitsgruppe Prof. Schröder
mSPPL2a D416A-myc	<i>M. musculus</i>	pcDNA3. 1 hygro(+)	Ampicillin; Hygromycin	Arbeitsgruppe Prof. Schröder
mSPPL2b-myc	<i>M. musculus</i>	pcDNA3. 1 hygro(+)	Ampicillin; Hygromycin	Arbeitsgruppe Prof. Schröder
mSPPL2b D414A-myc	<i>M. musculus</i>	pcDNA3. 1 hygro(+)	Ampicillin; Hygromycin	Arbeitsgruppe Prof. Schröder

2.2. Methoden

2.2.1. Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1. RNA-Gewinnung

Zur Isolierung von RNA aus Zellen in Kultur wurde das RNA-Isolierungskit NucleoSpin® RNA von MACHEREY-NAGEL nach beiliegendem Protokoll verwendet. Nach der Isolation wurde die Konzentration und Reinheit der isolierten RNA photometrisch mit Hilfe des Synergy HT multi detection reader (BioTek) bestimmt.

2.2.1.2. cDNA-Herstellung

cDNA unterscheidet sich von genomischer DNA dahingehend, dass diese aus mRNA gewonnen wird und demzufolge die Introns, welche bereits durch den Spleißvorgang herausgeschnitten wurden, fehlen. Die cDNA codiert also direkt für das Protein.

Nach Möglichkeit wurden pro Synthese 400 ng mRNA eingesetzt. Zuerst wurde die RNA mit Random Hexamer Primer für 5 min bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurden Reaktionspuffer, Ribolock, ein RNase-Inhibitor, Oligonukleotiden, dNTP und RevertAid, eine reverse Transkriptase (Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit) hinzugegeben, siehe Tabelle 4 und im PCR-Cycler, wie in Tabelle 5 dargestellt, inkubiert.

Tabelle 4: Verwendete Substanzen zur cDNA-Herstellung

cDNA Synthese	
RNA	400 ng
Random Hex Primer	1 µl
Reaktionspuffer	4 µl
Ribolock	1 µl
10 mM dNTP	2 µl
RevertAid	1 µl

Tabelle 5: Protokoll der cDNA-Herstellung

cDNA Herstellung	
25°C	5 min
45°C	60 min
70°C	5 min

2.2.1.3. Polymerasekettenreaktion

Die *polymerase chain reaction* (PCR) ist eine Methode zur gezielten Vervielfältigung von DNA-Sequenzen. In dieser Arbeit wurde das Verfahren hauptsächlich zur Vervielfältigung von Proteinsequenzen verwendet. Als Vorlage für die in dieser Arbeit verwendeten Proteine wurde cDNA verwendet, siehe Tabelle 6.

Alle PCRs wurden mit der Phusion High Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt und bestanden mindestens aus 35 Amplifikations-Zyklen, siehe Tabelle 7. Spezifische Oligonukleotide wurden basierend auf Datenbanksequenzen ausgewählt und bei Sigma-Aldrich hergestellt.

Tabelle 6: Verwendete Substanzen für die PCR

cDNA Synthese	
10 mM dNTP	1 µl
DMSO	2,5 µl
Reaktionspuffer HF (5x)	10 µl
Vorwärtsprimer	1 µl
Rückwärtsprimer	1 µl
Vorlage	1 µl
Phusion Polymerase	0,4 µl
ddH ₂ O	33,1 µl

Tabelle 7: Protokoll bei Verwendung der Phusion Polymerase

	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	98 °C	5 min	
Denaturierung	98 °C	15 s	35
Primerhybridisierung	60 °C	15 s	35
Elongation	72 °C	30 s	35
endgültige Elongation	72 °C	5 min	

2.2.1.4. Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient der gezielten Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrem Molekulargewicht und der Aufreinigung der PCR-Produkte von Chemikalien sowie einzelnen Nukleotiden.

Für die Auftrennung wurden 2% (w/v) Agarose in TAE-Puffer durch Erhitzen gelöst und anschließend mit 10 µl Ethidiumbromid versetzt. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und der entstehende Komplex kann im UV-Licht sichtbar gemacht werden, siehe Tabelle 8.

Die PCR-Produkte wurden mit 6x Ladepuffer (Thermo Fisher Scientific) im richtigen Verhältnis gemischt und bei 120 V je nach Größe der Kammer für 10-20 min im Agarosegel aufgetrennt.

Anschließend wurde die durch Ethidiumbromid markierte DNA-Bande ausgeschnitten und mithilfe des *High Pure PCR Product Purification Kits* von Roche von Rückständen (Agarose) befreit.

Tabelle 8: Zusammensetzung des TAE-Puffers

Tris-Acetat-EDTA (TAE) Puffer	
Tris	40 mM
EDTA	1 mM (pH 8.0)
Ethansäure	0,11%

2.2.1.5. Restriktionsverdau

Um die gewünschte DNA Sequenz in das Plasmid einfügen zu können, wurde das PCR-Produkt mit passenden Enzymen, deren Schnittstellen über die 5'-Enden der Oligonukleotide an die Produktenden angefügt wurden, für eine Stunde bei 37 °C mit passenden Puffern inkubiert. Es wurden vorzugsweise Enzyme ausgewählt, deren Spaltprodukte *sticky ends* aufweisen. Der DNA-Strang, bestehend aus zwei Matrizen, wird nicht ortholog geschnitten, sondern die eine Matrize ist einige Basen länger als der komplementäre Matrizenstrang. Dadurch wird eine höhere spezifischere Bindung bei der späteren Ligation ermöglicht.

Alle verwendeten Puffer sowie Enzyme wurden von Thermo Fisher Scientific bezogen. Parallel wurde der gewünschte Vektor mit den gleichen Enzymen verdaut, sodass aus dem ringförmigen Plasmid ein linearer Strang entstand, mit Schnittstellen, die zum PCR-Produkt passten.

2.2.1.6. Ligation

Nach erneuter Aufreinigung der zu klonierenden DNA Sequenz mit nun freiliegenden Überhängen und des Vektors im Agarosegel wurden 2 µl der Lösung mit dem geschnittenen Vektor und 6 µl Lösung mit der für das Zielprotein kodierenden DNA Sequenz (Insert) und je 1 µl T4 DNA-Ligase in einem entsprechenden Puffer (beide von Thermo Fisher Scientific) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Da beim Verdau des Vektors und des Inserts *sticky ends* erzeugt wurden, verbanden sich die äquivalenten Schnittstellen von Insert und Vektor miteinander und es entstand erneut ein zirkuläres Plasmid, diesmal jedoch mit einem integrierten Insert. Die Ligase wurde im Anschluss bei 65 °C für 10 min inaktiviert.

2.2.1.7. Elektroporation

Zur Vervielfältigung eines Plasmids wurde ein 50 µl Aliquot des *E.coli* XL1-Blue-Stammes (Stratagene) auf Eis aufgetaut, 1 µl der hergestellten Plasmidlösung oder eines Ligationsansatzes hinzugefügt und die Suspension in eine Elektroporationsküvette pipettiert. Bei 2,5 kV Spannung, fand eine temporäre Permeabilisierung der Zellmembran statt und das Plasmid gelangte in die *E. coli*-Bakterien. Diese wurden nachfolgend in 1 ml LB-Medium, Herstellung in Tabelle 9 dargestellt, für 30 min bei 37 °C inkubiert.

Im Anschluss folgte eine Zentrifugation bei 5000 rpm für 5 min. Der Überstand wurde abgesaugt, die Bakterien resuspendiert und auf eine mit Antibiotikum versetzte LB-Agar-Platte ausgestrichen, die über Nacht bei 37 °C kultiviert wurde. In dem verwendeten Vektor befand sich eine Sequenz für eine Ampicillin-Resistenz. Durch das Kultivieren auf einer, mit Ampicillin versetzten, Platte wurde so eine Selektion der Bakterien erzielt, sodass nur jene, die das gewünschte Plasmid aufgenommen haben, sich vermehren konnten.

Tabelle 9: Zusammensetzung des LB-Mediums

Luria broth (LB) Medium	
NaCl	10 g/l
Trypton/pepton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
pH	7,0

2.2.1.8. Plasmidamplifikation und -aufreinigung

Am nächsten Tag wurden mehrere Kolonien, die sich auf der Platte befanden, steril entnommen und in mit 100 µg/ml Ampicillin versetztes LB-Medium gegeben. Diese Flüssigkulturen wurden wiederum über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Bakterien lysiert und die Plasmid-DNA mithilfe des GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific) isoliert.

Zur Verwendung dieser Konstrukte erfolgte anschließend eine Vermehrung in 150 ml LB Medium. Eine Aufreinigung erfolgte mittels des Pure Yield Plasmid Midiprep Systems (Promega) gemäß den Anweisungen des Herstellers.

Sämtliche Konzentrationsbestimmungen wurden photometrisch mithilfe des Synergy HT multi detection reader ermöglicht.

2.2.1.9. DNA Sequenzierung

Nach erfolgreicher Klonierung wurde das Plasmid von der Firma GATC (Konstanz) mithilfe von Primern sequenziert. Die ermittelte Sequenz wurde dann mit der Referenzsequenz abgeglichen. Nur Plasmide mit völliger Übereinstimmung wurden für Experimente verwendet.

2.2.1.10. quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaktion (qRT-PCR)

Die qRT-PCR ermöglicht eine quantitative Analyse von synthetisierter RNA. Die qRT-PCR setzt eine cDNA Synthese aus RNA voraus. Für dieses System wurde das sondensbasierte System *Universal Probe Library* von Roche verwendet. Dabei wird eine kurze, zur gewünschten Zielsequenz komplementäre, Sequenz verwendet, an welchem am 5'-Ende ein Fluorophor und an dem 3'-Ende ein Quencher angehängt sind, siehe Tabelle 10. Diese Sequenz wird mit abgelesen und durch diesen Prozess werden Fluorophor und Quencher abgelöst und räumlich getrennt. Dies resultiert in einer amplifikationsabhängigen Erhöhung der Fluoreszenz, welche durch den Light Cycler 480 Instrument II (Roche) detektiert werden kann. Anschließend wurden in eine 384-Well-Platte cDNA, Master-mix und die entsprechenden Primer hinzugefügt, wobei jede cDNA-Probe in zwei technischen Replikaten gemessen wurde.

Die Primereffizienz (E) wurde mithilfe der Formel: $E = 10^{-1/m}$ ermittelt, wobei m hierbei die Steigung der logarithmischen Titrierungskurve (Standardkurve) darstellt. Das

Floureszenzsignal, welches exponentiell ansteigt, wird in Echtzeit detektiert und dient der Quantifizierung der mRNA anhand der Zyklenzahl bei Überschreitung eines Schwellenwertes (Ct-Wert). Die jeweiligen Ct-Werte wurden mithilfe des durchschnittlichen Ct-Wertes von Tubulin1a (Tub1a) normalisiert, da davon ausgegangen wurde, dass die verschiedenen Behandlungen der Zellen keine Auswirkungen auf die Tubulinsynthese haben.

Tabelle 10: Ansätze für die qRT-PCR

Primer-Mix für 100 µl		qRT-PCR Ansatz	
ddH ₂ O	68 µl	cDNA	0,5 µl/Well
Sonde	20 µl	Master-Mix (Roche)	4,5 µl/Well
forward Primer	6 µl	Primer-Mix	5 µl
reverse Primer	6 µl		

Tabelle 11: Verwendete Primer für die qRT-PCR

	forward Primer	reverse Primer	Sonde	Tier
mIL-10	cagagccacatgctcctaga	tgccagctggcctttggt	41	Maus
mTNFα	ctgtagcccacgtcgtagc	ttgagatccatgccgttg	25	Maus
mTub1a	ctggaaccacggatcatc	gtggccacgagcatagttatt	88	Maus
mIL-2	gctgttgatggacctacagga	ttcaattctgtggcctgctt	15	Maus
mMCL	agtaacgtgcatccgagagg	taacaggacagcaggtccaa	1	Maus
mFCER1g	ctccttttggtggaacaagc	gggtaaggacaataccatacaaaaa	56	Maus

2.2.2. Zellbiologische Methoden

Die verwendeten Zelllinien wurden unter sterilen Bedingungen kultiviert. Sterilität sämtlicher Geräte und Chemikalien wurde durch gängige Methoden gewährleistet.

Die Kultivierung der Zellen fand bei einer Temperatur von 37 °C, einer CO₂-Konzentration von 5% und gesättigter Wasserdampf-atmosphäre in einem Brutschrank statt.

2.2.2.1. Zelllinien

Tabelle 12: Verwendete und hergestellte Zelllinien

Verwendete Zelllinien	Transgen	Medium	Herkunft
HeLa	/	DMEM + 10% FCS + 1% Pen/Strep	DSMZ
HEK293T (HEK)	/	DMEM + 10% FCS + 1% Pen/Strep	DSMZ
HEK Flip-In	/	DMEM + 10% FCS + 1% Pen/Strep	Invitrogen
T-Rex Flip-In	/	DMEM + 10% FCS + 1% Pen/Strep	Invitrogen
PlatinumE	/	DMEM + 10% FCS + 1% Pen/Strep	Cell Biolabs, Inc.
J774.E Makrophagen	/	DMEM + 10% FCS + 1% Pen/Strep	Prof. Haas, Bonn
WEHI	/	RPMI 1640 + 10 % FCS + 1% Pen/Strep	Michael Engelke, Göttingen
Bal17	/	RPMI 1640 + 10 % FCS + 1% Pen/Strep	Michael Engelke, Göttingen

Hergestellte Zelllinien	Transgen	Medium
HEK Flip-In	HA-mTweak	DMEM + 10% FCS + 1% Pen/Strep + 100 µg/ml Hygromycin B
HEK Flip-In	HA-mDectin2	s.o.
HEK Flip-In	HA-mMincle	s.o.
T-Rex Flip-In	mTweak-ICD-A7-GFP-Stx7_IRES_TEV	s.o. + 100 µg/ml Hygromycin B + 15 µg/ml Blasticidin
T-Rex Flip-In	mTweak-ICD-TEV-GFP-Stx7_IRES_TEV	s.o.
WEHI	HA-mDectin2-FLAG	RPMI 1640 + 10 % FCS + 1% Pen/Strep + 10 µg/ml Puromycin
WEHI	HA-mMincle-FLAG	s.o.
WEHI	eGFP	s.o.
J774.E Makrophagen	HA-mDectin2-FLAG	DMEM + 10% FCS + 1% Pen/Strep + 10 µg/ml Puromycin
J774.E Makrophagen	HA-mMincle-FLAG	s.o.
J774.E Makrophagen	eGFP	s.o.

Die Kulturmedien DMEM High Glucose (Dulbecco's Modified Eagle's medium, GIBCO) sowie RPMI (Roswell Park Memorial Institute, GIBCO) wurden mit 10% FCS (Fetales Kalbserum, PAA) und den Antibiotika Penicillin (100 U/m, PAAI) und Streptomycin (0,1 mg/ml, PAA) versetzt (P/S).

2.2.2.2. Kultivierung von Standardzelllinien

Zellen wurden im Regelfall in 10 cm-Kulturschalen kultiviert und nur bei Erzeugung von stabilen Zelllinien in kleineren Gefäßen gehalten, um eine möglichst homogen wachsende Kultur zu gewährleisten. Das Passagieren erfolgte bei 90% Konfluenz, indem das entsprechende Medium bei adhärennten Zellen abgesaugt wurde, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen wurden und je nach Zellart für 3-10 min mit Accutase (eBioscience, San Diego, Californien) behandelt wurden. Die Accutase wurde durch Mediumzugabe inaktiviert, die Zellen mehrere Male auf und ab pipettiert und, falls nicht anders benötigt, in

einem Verhältnis von 1:10 wieder im entsprechenden Medium ausgesät. Ausnahme war hier die murine Makrophagenzelllinie J774.E, die schon bei 70%iger Konfluenz passagiert wurde.

Für das Zählen von Zellen wurde die Neubauer-Kammer verwendet und je nach erwarteter Dichte die Zellsuspension vorher noch 1:10 verdünnt. Trypanblau (Life Technologies) wurde zur Anfärbung toter Zellen verwendet.

2.2.2.3. Kryokonservierung

Die für Transfektionsexperimente kultivierten Zellen wurden in der Regel spätestens nach 40 Passagen durch frische Zellen ersetzt, wobei die Linien in 1,5 ml-Kryoröhrchen in Stickstoffbehältern gelagert wurden. Nach dem Auftauen der Röhrchen in einem 37 °C warmen Wasserbad wurden die Zellen in 9 ml Medium suspendiert und für 10 min bei 210 g zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in frischem Medium resuspendiert und die Zellen in 10 cm-Schalen ausgesät. Am nächsten Tag wurden bei den stabil transfizierten, antibiotikaresistenten Zelllinien nach Mediumwechsel die entsprechenden Antibiotika hinzugefügt. Alle gegen Eukaryonten gerichteten Antibiotika wurden von Invivogen bezogen.

Zur Kryokonservierung von Zellen wurden die auf einer 10 cm Schale konfluent gewachsenen Zellen mit PBS, siehe Tabelle 13, gewaschen, mit Accutase (PAA; eBioscience, San Diego, Californien) abgelöst und in 10 ml Medium aufgenommen. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 210 g wurden die Zellen in 1 ml Medium mit 20% FCS und 10% DMSO resuspendiert und im Kryoröhrchen für einen Tag bei -80 °C, anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Tabelle 13: Zusammensetzung von PBS

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) pH 7,4	
NaCl	137 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
KCl	2,7 mM
KH ₂ PO ₄	1,8 mM

2.2.2.4. Generierung von murinen Immunzellen aus Knochenmarkszellen:

Die Generierung von murinen Immunzellen erfolgte im Rahmen dieser Arbeit aus Knochenmarkszellen, welche aus der Tibia und des Femurs der jeweiligen Mäuse gewonnen wurden. Die Gewinnung und Kultivierung wurde nach dem im folgenden beschriebenen Protokoll durchgeführt.

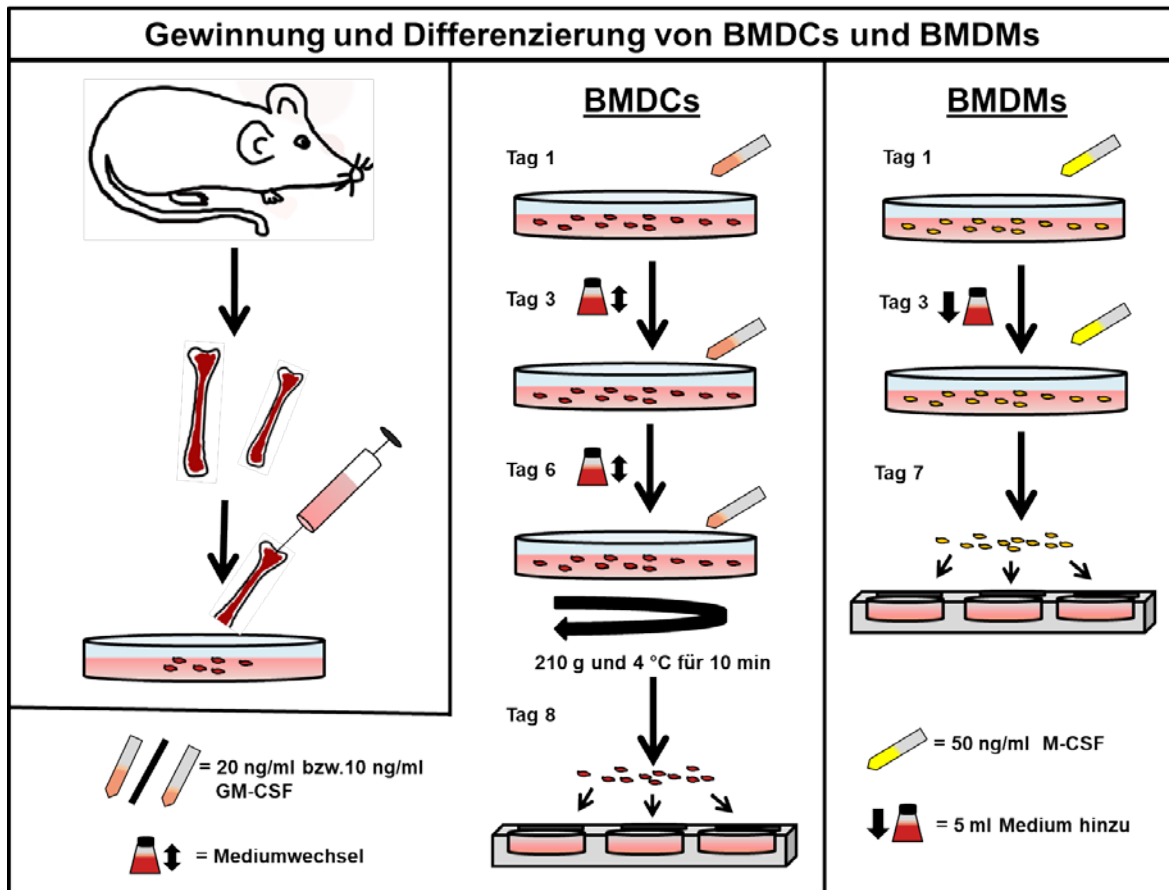


Abbildung 6: BMDC- und BMDM-Differenzierung aus dem Knochenmark von Mäusen

Für die Differenzierung von BMDCs wurden am Tag 1 die Zellen aus dem Knochenmark mit Medium für BMDCs gespült und in einer 10 cm Schale gewonnen. Nach Zählung der Zellen wurden dem Medium 20 ng/ml Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) hinzugefügt. Nach 3 Tagen wurde 10 ml Medium mit 20 ng/ml GM-CSF hinzugegeben. Am Tag 6 wurde nach komplettem Mediumwechsel 10 ml Medium mit 10 ng/ml GM-CSF hinzugefügt. Am 8. Tag konnten die BMDCs für Experimente verwendet werden.

Für die Differenzierung der BMDMs wurde am Tag 1 50 ng/ml Makrophagenkolonien-stimulierender Faktor (M-CSF) in BMDM Medium zu den gezählten Knochenmarkszellen hinzugegeben. Am 3. Tag wurde den Petrischalen 5 ml BMDM und weitere 50 ng/ml M-CSF hinzugegeben. Am 7. Tag konnten die BMDMs für Experimente eingesetzt werden.

2.2.2.5. Bone Marrow derived dendritic cells (BMDC)

Zur Generierung von BMDCs wurden am ersten Tag die Mäuse mithilfe von CO₂ betäubt und durch zervikale Dislokation getötet. Die Beine wurden abgetrennt und die Knochen unter sterilen Bedingungen von den Muskeln befreit. Anschließend wurden der Femur und die Tibia an beiden Enden aufgeschnitten und der Knochen mit 10 ml BMDC-Medium, siehe Tabelle 14, mit einer 27 G-Kanüle ausgespült. Die Knochenmarkssuspension wurde in einem sterilen Gefäß aufgefangen und mit einer 23 G-Kanüle einige Male resuspendiert und die Zellen mithilfe eines 100 µm-Zellsiebs vereinzelt.

Eine darauffolgende Zellzählung ermöglichte das gleichmäßige Aussähen der Zellen, wobei je 10 cm Petrischale 0,5x10⁷ Zellen in einem Volumen von 10 ml ausgesät wurden. Durch Zugabe von 20 ng/ml Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF, Immunotools) wurde eine Differenzierung zu BMDCs ermöglicht.

Nach drei Tagen wurden 10 ml BMDC Medium mit 20 ng/ml GM-CSF hinzugegeben. Nach sechs Tagen wurden 10 ml des Kulturmediums bei 210 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert, das alte Medium abgenommen und die Zellen in 10 ml frischen Mediums mit 10 ng/ml GM-CSF resuspendiert und erneut in die Petrischale zurückgegeben. Am achten Tag wurden die Zellen direkt für das Experiment verwendet.

Tabelle 14: Zusammensetzung des Mediums für BMDCs

Medium für die BMDC-Generierung	
BMDC-Medium	RPMI 1640
	10% (v/v) FCS
	1% P/S
	50 µM β-Mercaptoethanol
10 µg/ml GM-CSF (Immunotools)	20/10 ng/ml

2.2.2.6. Bone Marrow derived Macrophages (BMDM)

Die Gewinnung von Knochenmarkszellen wurde wie unter Punkt 2.3.17 durchgeführt. Der Unterschied bestand in der Behandlung mit Cytokinen, wobei hier Makrophagenkolonien-stimulierender Faktor (M-CSF), anstelle von GM-CSF verwendet wurde, um so die Differenzierung von Makrophagen zu induzieren, siehe Tabelle 15. Zudem wurden pro 10 cm-Schale 1x10⁷ Zellen ausgesät. Am dritten Tag wurde 5 ml Medium mit 50 ng/ml M-CSF hinzugefügt. Nach sieben Tagen wurden die Zellen für Experimente verwendet.

Tabelle 15: Zusammensetzung des Mediums für BMDMs

Medium für die BMDM-Generierung	
BMDM-Medium	DMEM
	10% FCS
	1% P/S
rm M-CSF (Immunotools)	50 ng/ml

2.2.2.7. Peritoneal-Makrophagen

Vor dem Versuch wurde eine 4%-ige Thioglykolat-Lösung in sterilem PBS angesetzt, siehe Tabelle 16, autoklaviert und 1 ml Aliquots angesetzt. 800 µl dieser Lösung wurden in die Peritonealhöhle einer erwachsenen Maus unter sterilen Bedingungen gespritzt. Das Thioglykolat verursacht eine Ansammlung von v.a. Makrophagen in der Peritonealhöhle. Nachdem die Maus nach vier Tagen mit CO₂ getötet wurde, wurde die Haut am Bauch entfernt und 10 ml steriles PBS in den Bauchraum injiziert. Nach vorsichtiger Massage wurde das PBS, welches nun trüb erschien, wieder aspiriert. Die Suspension wurde bei 210 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert, so dass sich die Zellen unten sammelten und nach Entfernung des Überstandes in Makrophagen-Medium resuspendiert werden konnten. Nach Zählung der Zellen wurden sie entsprechend für Experimente ausgesät. Zur Anreicherung von Makrophagen wurde das Medium nach drei Stunden ausgewechselt und die im Überstand befindlichen Zellen verworfen.

Tabelle 16: Material für die Generierung von Peritoneal-Makrophagen

Thioglykolat in sterilem PBS	4% (w/v)
PM-Medium	DMEM
	20% (v/v) FCS
	1% P/S

2.2.2.8. Transfektion

Unter einer Transfektion versteht man das gezielte Einbringen von Plasmiden in Zielzellen. In der Regel enthält das Plasmid dabei eine DNA-Sequenz, welche von der Zelle abgelesen und in ein Protein umgewandelt wird, welches dann gezielt untersucht werden kann. Häufig werden die Proteine bei der Klonierung mit einem Epitop markiert. In dem von uns verwendeten Ansatz wurde unter anderem N-terminal ein humanes Influenza

Hämagglutinin (HA)-Epitop verwendet, aber auch myc- V5-, sowie Flag-Epitope wurden eingesetzt, sodass das überexprimierte Protein mit hochspezifischen Antikörpern gegen das jeweilige Epitop nachgewiesen werden konnte. Ein speziell für das Protein zugeschnittener Antikörper wurde daher zum Proteinnachweis (z.B. im Westernblot) nicht benötigt. Die Transfektionen wurden mit Turbofect (Thermo Scientific) durchgeführt. Dabei wird der in Tabelle 17 verwendete Mengenansatz je nach Größe des Kulturmediums verwendet. Nach 6h Inkubationszeit des TurboDect sowie der Plasmid-DNA wird das Medium gewechselt und nach 24 h die Zellen für das Experiment verarbeitet.

Unterschieden werden kann bei der Transfektion zwischen einer transienten und einer stabilen Transfektion. Die transiente Transfektion beschreibt das Einbringen von DNA für eine beschränkte Dauer. Die Zellen werden dann für die Analyse komplett verarbeitet und so ist ein wiederholtes Einbringen von DNA in ein Zellsystem für jedes Experiment nötig.

Tabelle 17: Mengenansätze für Kulturmedien in verschiedenen Gefäßen

	Kulturmedium	Kulturmedium ohne FCS und P/S	TurboFect (µl)	Plasmid-DNA (µg)
6-Well-Platte	2 ml	50 µl	1	0,5
10 cm-Schale	10 ml	500 µl	5	2,5

Die stabile Transfektion beschreibt das permanente Einbringen von DNA in eine Zelllinie, wobei es zur Integration der Zielsequenz in das Wirtsgenom kommt. Diese Sequenz tritt bei Zellteilung auf die nachfolgende Zellgeneration über und die neue Zelllinie exprimiert das gewünschte Protein permanent. Für die stabilen Transfektionen wurden die Zelllinien T-Rex Flip-In und HEK Flip-In verwendet. Dabei wurde bei der Transfektion 4,5 µg pOG44-Vektor, welcher für die Flp-Recombinase codiert, mit 0,5 µg pcDNA5.1 FRT (T-Rex Flip-In) oder pcDNA5.1 FRT/TO (HEK Flip-In) zusammengeführt. Die Transfektion erfolgte gleich dem oben beschriebenen Ansatz. Es wurden die in Tabelle 12 aufgelisteten Zelllinien im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. Eine Selektion erfolgte anschließend mithilfe von 100 µg/ml Hygromycin und 10 µg/ml Blasticidin. Für die Induktion der Transgenexpression wurden die T-Rex Flip-In Zellen 24 h mit 10µg/ml Doxycyclin behandelt.

2.2.2.9. Retrovirale Transduktion von Zellen

Murine Zelllinien wurden mithilfe eines retroviralen Systems, in dem das Plasmid durch Viren in das Genom der Zelllinie integriert wurde, stabil transduziert. Allerdings fehlen dem viralen Vektor spezifische Gene, die für die Virusreplikation und die Assemblierung

notwendig sind. Das für die stabile Transduktion eingesetzte Virus kann sich daher nicht eigenständig in der Zielzelle replizieren. Dafür wird eine Verpackungszelllinie benötigt, hier wurden PlatinumE-Zellen eingesetzt. Diese Zelllinie ermöglicht nach Transfektion mit pMSCV-Vektoren die Produktion und Ausschleusung von replikationsinkompetenten Virussequenzen, die in der Lage sind, die Zielsequenz in die DNA einer Empfängerzelllinie zu integrieren.

In der vorliegenden Untersuchung wurde die Gensequenz des gewünschten Proteins zuerst in den pMSCV-puro Vektor umgesetzt. Nach Amplifikation des Vektors wurden PlatinumE Zellen mit diesem Plasmid transient mittels TurboFect transfiziert. Diese Verpackungszelllinie exprimiert neben dem eigentlichen HA-Fusionsprotein auch eine Reihe viraler Proteine. Dadurch entstehen spezifische, nur gegen Mauszellen gerichtete Viren, die genetische Information für das gewünschte Protein beinhalten. Nach 2 Tagen wurde der Überstand der PlatinumE Zellen abgenommen und auf die zu transduzierende Zelllinie gegeben. Nach Etablierung eines geeigneten Protokolls wurde der Überstand zusammen mit 8 µg/ml Polybren (SIGMA) auf die am selbigen Tag ausgesäten J774.E-Zellen in einer 6-Well-Schale gegeben und diese für 90 min bei 1200 g zentrifugiert. Anschließend wurde noch 1 ml frisches Medium hinzugefügt und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Am zweiten Tag nach der Transduktion begann die Selektion. Dabei wurde Puromycin 10 µg verwendet, für welches der Vektor eine Antibiotikaresistenz bietet.

Nach ein bis zwei Wochen wurden die in Kolonien wachsenden Zellklone vereinigt und die Zellen anschließend mittels Western Blot, Immunofluoreszenz und FACS Analyse auf Expression des Transgens untersucht.

2.2.2.10. Behandlung der Zellen mit Rezeptorliganden

Zwei der betrachteten Proteine sind Rezeptoren, welche eine Rolle bei der Immunantwort auf Pilze und Bakterien spielen (Dectin-2 und Mincle). In der vorliegenden Arbeit wurde die Prozessierung dieser Rezeptoren untersucht, auch in Bezug auf eine vorrangigere Interaktion dieser Rezeptoren mit potenziellen Liganden, die in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt werden. Dabei wurden die in Tabelle 18 aufgelisteten Liganden entsprechend der in der zweiten Spalte aufgeführten Konzentration in das Nährmedium der Zellen gegeben. Die genaue Inkubationszeit wird in den jeweiligen Legenden der Versuche aufgeführt.

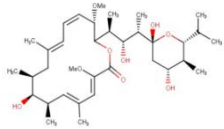
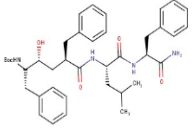
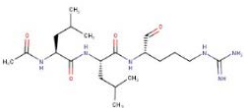
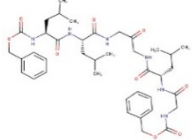
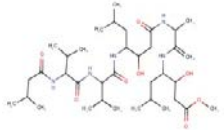
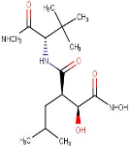
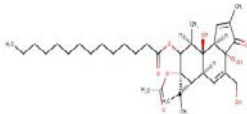
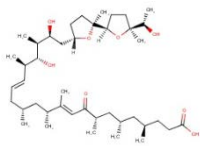
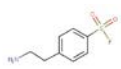
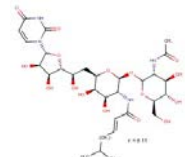
Tabelle 18: Verwendete Liganden

Ligand	Konzentration im Medium	Hersteller	Zielrezeptor
depletiertes Zymosan (dZym)	50 µg/ml	Invivogen	Dectin-1
Zymosan	100 µg/ml	SIGMA	Dectin-1, Dectin-2, diverse Toll like Rezeptoren (TLR)
Lipopolysaccharide (LPS) aus E.coli	500 ng/ml	SIGMA	TLR4
Heat Killed Candida albicans (HKCA)	Multiplicity of Infection (MOI) = 10	Invivogen	C-typ Lektin like Rezeptoren (CTLR) and TLR
Heat Killed Mycobacteria tuberculosis (HKMT)	100 µg/ml	Invivogen	C-typ Lektin like Rezeptoren (CTLR) and TLR
Mycobacterium bovis Bacille Calmette– Guérin (BCG)	MOI = 10	Pasteur ATCC 35734	C-typ Lektin like Rezeptoren (CTLR) and TLR
Mannan	50 µg/ml	Invivogen	C-typ Lektin like Rezeptoren (CTLR) and TLR
Hitze- und Chemisch- inaktivierte Hopen und Hefen von Candida albicans	MOI = 10	Daniel Fischer, Universität Jena	C-typ Lektin like Rezeptoren (CTLR) and TLR

2.2.2.11. Behandlung der Zellen mit Proteinaseinhibitoren

Die Zellen wurden am Tag zuvor ausgesät und am nächsten Morgen nach Mediumwechsel mit den jeweiligen niedermolekularen Inhibitoren behandelt. Als Kontrolle kam eine äquivalente Menge des verwendeten Lösungsmittels (meist DMSO) zum Einsatz.

Tabelle 19: Verwendete Proteaseinhibitoren

Inhibitor	Struktur	Hersteller	Endkonzentration	Ziel der Inhibition
Bafilomycin a1		SIGMA	300 nM	vakuoläre H ⁺ -ATPase
Inhibitor X		EMD Millipore	1 µM	Preseniline, SPP/SPPL Proteasen
Leupeptin		Roth	100 µM	Serin- und Cystein Proteasen
(Z-LL) ₂ - ketone		Peptanova	20 - 40 µM	SPP/SPPL Proteasen
Marimastat		A. Chalaris	10 µM	Metallo- proteasen
Phorbol-12- myristate- 13-acetate (PMA)		SIGMA	100 nM	Aktivierung von Proteinkinasen beziehungsweise ADAM17
Ionomycin		AppliChem	1 µM	Aktivierung von ADAM10
Pepstatin A- Methyl ester		Calbiochem	10 µM	Aspartat Proteasen
AEBSF		SIGMA	500 µM	Serin-Proteasen
Tunicamycin		SIGMA	2 µg/ml	GlcNac-Phospho- Transferase

2.2.2.12. Indirekte Immunfluoreszenz

Tabelle 20: Verwendete Lösungen bei der Immunfluoreszenz

IF Blockierlösung		Einbettungs-Medium		
FCS	10% (v/v)	Mowiol	4-88	(EMD
Saponin	0,2% (w/v)	Millipore)		17%
in PBS		Glycerol		33% (v/v)
		DABCO (Sigma-Aldrich)		20 mg/ml

Am Vortag wurden die zu betrachtenden Zellen in steriler Umgebung auf Deckgläser ausgesät. Für je ein Kompartiment einer 12-Well-Platte wurden 150.000 Zellen ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen entweder transfiziert oder direkt für die Immunfluoreszenzfärbung vorbereitet. Transfizierte Zellen wurden 24 h nach Transfektion fixiert.

Zunächst wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, um störende Mediumanteile zu entfernen. Dann wurden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd (PFA) in PBS für 20 min bedeckt und dadurch fixiert. Ein anschließender wiederholter Waschvorgang mit PBS wurde dreimal wiederholt und die Zellen mit 0,2% Saponin in PBS für 10 min und anschließend mit 0,12% Glycin in PBS für 10 min inkubiert. Saponin besteht aus Tensiden, welche Poren in der Zellmembran bilden und die Zelle permeabilisieren. Das Glycin dient der Inaktivierung des PFA. Die Deckgläser wurden noch zweimal mit PBS/Saponin gewaschen und mit IF-Blockierlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu verhindern. Anschließend wurde der primäre Antikörper, dem jeweiligen Datenblatt entsprechend, mit IF-Blockierlösung verdünnt. In einer dunklen feuchten Kammer wurde Parafilm ausgebreitet und je Deckglas 40 µl Antikörper-Lösung darauf gegeben. Dann wurden die Deckgläser mit der mit Zellen bedeckten Seite nach unten auf die Tropfen gelegt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Durch die vorrausgegangene Permeabilisierung der Zellen wurde nun die Bindung des Antikörpers an intrazelluläre Antigene ermöglicht.

Am darauffolgenden Tag wurde wiederum dreimal mit PBS/Saponin gewaschen und der jeweilig passende Sekundärantikörper im Verhältnis 1:300 verdünnt. Dabei musste jede überflüssige Lichtexposition vermieden werden, da die mit dem sekundären Antikörper gekoppelten Fluorophore bei wiederholter Anregung photochemisch zerstört werden. Diese Reaktion (Photobleichung) ist irreversibel.

Der sekundäre Antikörper wurde im gleichen Prinzip wie der primäre auf Parafilm platziert, welcher sich in einer feuchten und dunklen Kammer befand. Die Deckgläschen wurden wie

zuvor mit den Zellen nach unten auf den sekundären Antikörper gelegt und für eine Stunde inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen mit PBS und anschließendem Waschen mit ddH₂O wurde auf einen Objektträger je Deckgläschen 15 µl Einbettungs-Medium mit 4-,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) pipettiert und der Coverslip mit den Zellen nach unten platziert. Bei DAPI handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, der an doppelsträngige DNA bindet und somit Zellkerne sichtbar macht. Am nächsten Tag wurden die Zellen unter dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Olympus) betrachtet und dokumentiert.

2.2.2.13. Durchflusszytometrie (FACS)

Mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie (Fluorescence activated cell sorting, FACS) können mit Fluorophoren markierte Zellen hinsichtlich der Stärke ihrer Markierung nach Färbung untersucht werden. Dafür werden die Zellen, je nach Fragestellung, mit Antikörpern behandelt, die direkt mit fluoreszierenden Molekülen markiert sind. Die Methode erlaubt es, Zellen, welche einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeführt werden, je nach emittierter Wellenlänge zu untersuchen. Hierbei kann auch die Größe der Zellen und deren Granularität analysiert werden.

Die Zellen wurden am Tag zuvor in 6-Well-Platten ausgesät, am nächsten Tag mit Accutase abgelöst und in ein geeignetes Gefäß überführt. Diese wurden dann bei 210 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt und die Zellen in 1 ml FACS-Puffer, siehe Tabelle 21, resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Nach wiederholter Abnahme des Überstands wurden die Zellen in 300 µl FACS-Puffer aufgenommen und 150 µl Zellen je Vertiefung in eine 96-Well-round-bottom-Schale überführt, sodass es für jeden Ansatz zwei Wells auf der FACS-Platte gab. Die Zellen in dem einen Ansatz dienten der Färbung mit dem gegen das zu analysierende Protein gerichteten Antikörper, die des zweiten Ansatzes wurden mit einem Kontrollantikörper des gleichen Isotyps mit dem gleichen Fluorophor (Isotypkontrolle) behandelt. So konnte das Niveau einer unspezifischen Hintergrundfärbung abgeschätzt werden.

Die Platte wurde nun ebenfalls bei 210 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert, in der Zwischenzeit die Antikörper, dem Datenblatt entsprechend, in FACS-Puffer verdünnt.

Zur Oberflächendetektion von überexprimiertem Dectin-2 und Mincle wurde deren C-terminaler FLAG-Epitop der Fusionsproteine verwendet. Gegen das Flag-Epitop wurde ein Phycoerythrin (PE)-gekoppelter Antikörper eingesetzt, welcher spezifisch an die markierten Proteine bindet (Biolegend). Bei der dazugehörigen Isotypkontrolle wurde ein unspezifischer und mit dem gleichen Fluorophor gekoppelter Antikörper eingesetzt. Desweiteren wurde Propidiumiodid (PI) verwendet, ein DNA-bindender Farbstoff welcher

intakte, lebende Zellen nicht färben kann, jedoch durch die perforierte Membran toter Zellen gelangt und diese anfärbt.

Nach Absaugen des Überstandes, wurden die Zellen in der Antikörperlösung resuspendiert und für 1 Stunde bei 4 °C lichtgeschützt inkubiert.

Nach Verstreichen dieser Stunde wurde erneut zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Anschließend wurden die Proben mit Propidiumiodid gefärbt. Erneute Zentrifugation und Resuspendierung in 200 µl FACS-Puffer wurden als letzte Schritte durchgeführt und die Proben mittels eines Durchflusszytometers (BD Bioscience) analysiert.

Tabelle 21: Zusammensetzung des FACS-Puffers

FACS Puffer	
PBS	
FCS	2% (v/v)
EDTA	2 mM
pH 7,4	

2.2.2.14. Nachweis reaktiver-Sauerstoff-Spezies (ROS) mittels 2',7' – dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)

Das Reagenz zum Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies (DCF-DA) diffundiert in die Zelle und wird dort durch zelluläre Esterasen deacetyliert, sodass eine nicht-fluoreszierende Verbindung entsteht, die die Zelle nicht mehr verlassen kann. Trifft nun ein Sauerstoffradikal („reactive oxygen species“, ROS) auf diese Verbindung, kommt es zur Oxidation der Verbindung zu 2', 7' –dichlorofluorescein (DCF), welche nach Anregung bei 485 nm mit einem Emissionsmaximum von 525 nm fluoresziert.

2×10^4 Zellen wurden in eine schwarze 96-Well-Platte ausgesät. Je Well wurden 10 µM DCF-DA in dem, für die Zellen geeigneten, Kulturmedium auf die Zellen appliziert und dort für 45 min belassen, wobei zwei Wells nicht behandelt wurden. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal mit sterilem PBS gewaschen und 100 µl vorgewärmtes Kulturmedium ohne Phenolrot sowie FCS jedoch mit 10 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) zu den Zellen hinzugegeben, siehe Tabelle 22. Um den Ablauf möglichst kurz zu halten, wurden die verwendeten Liganden bereits in der geeigneten Menge Medium vorgelegt und warm gestellt. Sofort nach dem Pipettieren wurde die Platte in den Synergy Reader gesetzt, welches zuvor auf 37 °C aufgewärmt worden war. Die Messung der Fluoreszenz wurde bei 480nm/520nm durchgeführt.

Tabelle 22: Material für die ROS-Messung

DCF-DA	10 μ M
Kulturmedium ohne Phenol	
Rot mit 10% FCS und 10 mM	
HEPES (GIBCO)	
steriles PBS	
Kulturmedium	

2.2.3. Biochemische Methoden

2.2.3.1. Lyse von Zellen

Für die Zellernte wurden die Zellen auf Eis abgekühlt und währenddessen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit PBS/Complete/EDTA bedeckt und von ihrem Untergrund abgekratzt. Nach Überführung in ein geeignetes Gefäß wurden die Zellen bei 3000 rpm und 4 °C für 5 min sedimentiert. Bei dieser Geschwindigkeit setzten sich die Zellen ab, wohingegen sich Reste des Mediums, besonders Proteine und Zelltrümmer im Überstand befanden.

Je nach Menge der Zellen wurde diese in 40-60 μ l Lysepuffer, siehe Tabelle 23, resuspendiert und anschließend für eine Stunde auf Eis gelagert. Während dieser Inkubationszeit wurden die Zellen mithilfe von Ultraschall (Stufe 4, 20 s) sonifiziert (Branson Sonifier), um sicher zu stellen, dass alle Zellen gleichmäßig aufgeschlossen wurden.

Nach erneuter Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4 °C für 10 min wurde der Überstand, in welchem sich die zu untersuchenden Proteine befanden, in ein neues Gefäß überführt und mithilfe des BCA Protein Assay-Kits von Pierce die Proteinkonzentration nach Herstellerangaben und mit Hilfe des Synergy HT multi detection reader bestimmt.

Im Anschluss wurden, abhängig von der Art des Gels, die Proben in Ladepuffer, siehe Tabelle 24, aufgenommen. Das dient zum einen der Stabilisierung des pH-Wertes, der Erhöhung der Viskosität der Probe durch Anwesenheit von Glycerol, die Proteine werden denaturiert und das darin enthaltene SDS sorgt für eine negative Ladung der Proteine.

Nach Mischung von Probe und Puffer wurden diese bei 56 °C für 10 min zur Denaturierung der Proteine erhitzt.

Tabelle 23: Zusammensetzung des Lyse-Puffers

Lyse-Puffer	
Tris-HCl	50 mM
NaCl	150 mM
Triton X-100	1% (w/v)
SDS	0,1% (w/v)
Complete Stock (Roche)	1:25
EDTA	4 mM
Pefabloc (Roth)	4 mM
Pepstatin A	1 µg/ml

Tabelle 24: Zusammensetzung des 5x SDS-PAGE Ladepuffers

5 x SDS-PAGE Ladepuffer	
Tris-HCl pH 6,8	625 mM
SDS	5% (w/v)
Glycerin	50% (v/v)
DTT	500 mM
Bromphenolblau	

2.2.3.2. Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen

Der Oberflächenbiotinylierung ging eine Transfektion der Zellen am vorherigen Tag voraus. Dabei wurden stets für jeden experimentellen Ansatz zwei 10 cm-Schalen transfiziert, die dann für die weitere Analyse vereinigt wurden.

Tabelle 25: Ansätze für die Oberflächenbiotinylierung

PBS-CM		pH 8		Quenching Puffer		pH 8		
PBS				PBS-CM (pH 8)				
CaCl ₂		0,1 mM		Tris-HCl		50 mM		
MgCl ₂		1 mM						
Biotin-Lösung				Lyse/Pulldown Puffer				
PBS-CM (pH 8)				Tris-HCl				50 mM
Sulfo-NHS-SS-Biotin (Pierce)				NaCl				150 mM
1 mg/ml				Triton X-100				1% (w/v)
				SDS				0,1% (w/v)
				Complete Stock				1:25
				EDTA				4 mM

Die 10 cm Kulturschalen wurden für 5 min auf Eis abgekühlt. Nach Absaugen des Mediums wurden die Schalen je dreimal mit 10 ml 4 °C kaltem PBS-CM gewaschen. Je eine der zwei gleich behandelten Schalen wurden mit 3-4 ml kalter Biotinlösung 30 min bei 4 °C inkubiert, um sämtliche Internalisierungsvorgänge weitestgehend zu unterbinden, die äquivalente Schale wurde mit 3-4 ml kaltem PBS-CM als Vergleichsprobe behandelt.

Nach 30-minütiger Inkubation wurden die Lösungen abgesaugt und auf jede Schale 10 ml Quenching-Puffer hinzugegeben und für 10 min auf Eis inkubiert.

Anschließend wurde wiederum dreimal mit PBS-CM gewaschen und nach Zugabe von 1 ml PBS mit 1:25 Complete und 4 mM EDTA wurden die Zellen lysiert.

Währenddessen wurden die High Capacity Agarose Streptavidin Beads (Pierce) mit dem Pulldown Puffer equilibriert. Je nach Lyseansatz wurde ein Gefäß vorbereitet, in welches 100 µl der Beads und 1000 µl Pulldown Puffer hinein pipettiert wurden. Nach gründlicher Durchmischung für 5 min bei 4 °C wurden die Beads bei 6000 rpm für 1 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die Prozedur wurde dreimal wiederholt.

Nach vollendeter Lyse wurde die Proteinkonzentration bestimmt und von der am geringsten konzentrierten Probe 90% als Maßstab für die Untergrenze der Konzentration der Proben festgelegt.

Dann wurden alle Proben auf ein Endvolumen von 500 µl verdünnt und in das jeweilige Gefäß mit den gewaschenen Beads pipettiert. Die Proben wurden für eine Stunde bei 4 °C in einem Drehrad inkubiert und danach bei 4 °C 1 min bei 6000 rpm zentrifugiert.

Der Überstand („unbound“) wurde als Referenz aufgehoben.

Die Beads wurden viermal wie oben beschrieben gewaschen und beim letzten Mal anstelle des Pulldown Puffers in 100 µl 5x SDS-PAGE Probenpuffer aufgenommen.

Nach 5-minütiger Inkubation bei 95 °C und weiteren 15 min bei 37 °C, wurden die Beads abzentrifugiert und der Überstand wurde auf ein SDS-Gel aufgetragen.

2.2.3.3. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Dieses Verfahren bewirkt die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht in einem Polyacrylamidgel.

Tabelle 26: Zusammensetzung der verschiedenen Elemente der SDS-PAGE

Sammelgel Puffer		Trenngel Puffer	
Tris	500 mM	Tris	1,5 M
SDS	0,4 % (w/v)	SDS	0,4% (w/v)
pH 6,8		pH 8,8	

Tabelle 27: Zusammensetzung der Acrylamidgele mit unterschiedlicher Konzentration

Lösung		Sammelgel	10%	12,5%	15%
			Trenngel	Trenngel	Trenngel
Sammelgelpuffer	(ml)	1,35	-	-	-
Trenngelpuffer	(ml)	-	2,6	2,6	2,6
30 % Acrylamid (Rotiphorese Gel 30)	(ml)	1,75	3,3	4,2	5
ddH ₂ O	(ml)	3,1	4	3,1	2,3
Ammoniumpersulfat 10% in ddH ₂ O	(µl)	60	60	60	60
TEMED	(µl)	30	30	30	30

Tabelle 28: Zusammensetzung für die Tricingele mit unterschiedlicher Konzentration

Lösung		4% Sammelgel	10% Trenngel	16% Trenngel
50% Acrylamid (AppliChem, Darmstadt, Germany)	(ml)	-	-	3,29
30% Acrylamid	(ml)	1,37	3,18	-
2% Bisacrylamid (Appllichem)	(ml)	0,091	0,261	0,338
3 x Gel Puffer	(ml)	2,5	3,33	3,33
Harnstoff	(g)	-	-	3,6
ddH ₂ O	(ml)	ad 10	ad 10	as 10
Ammoniumpersulfat 10% in ddH ₂ O	(µl)	75	50	33,3
TEMED	(µl)	7,5	10	10

Tabelle 29: Elektrodenpuffer für SDS-Gele

SDS Elektroden Puffer		Tris-Tricine 3x Gel Puffer	
Glycin	193 mM	Tris	3 M
Tris	25 mM	HCl	1 M
SDS	0,1% (w/v)	SDS	0,3% (w/v)
		pH 8,45	

Tabelle 30: Anoden und Kathoden Puffer für Tricin Gele

Anoden Puffer		Kathoden Puffer	
Tris	100 mM	Tris	100 mM
HCl	22,5 mM	Tricine	100 mM
pH 8,9		SDS	0,1% (w/v)
		pH 8,25	

Die jeweiligen Puffer wurden anhand der oben aufgeführten Tabellen (Tabelle 26,

Tabelle 29, Tabelle 30) hergestellt. Die Gele wurden ebenfalls mit ihren Inhaltstoffen oben aufgelistet und hergestellt.

Dabei wurden 2 Gele in einer Kammer eingespannt und Elektrophoresepuffer, bei Tricingelen Anoden- und Kathodenpuffer, dazugegeben und die Lysate der Reihe nach mit gleichen Proteinmengen aufgetragen (siehe Lyse von Zellen). Für 15-30 min wurde dann eine Spannung von 80 V angelegt und danach auf 120 V erhöht. Kurz bevor die

Bromphenolblau- bzw Coomassie G250-Bande das untere Ende des Gels erreicht hatte, wurde die Elektrophorese beendet.

Bei Tricine-SDS-PAGE wurde zunächst eine 30 V Spannung angelegt und nach 30 min auf 80 V erhöht.

2.2.3.4. Western Blot

Beim Western Blot-Verfahren werden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine mithilfe eines Stromflusses aus einem Gel auf eine Membran übertragen. Dabei bleiben die Proteine aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen an der Membran haften.

Tabelle 31: Zusammensetzung des Transfer Puffers

Transfer Puffer	
Glycin	192 mM
Tris	25 mM
Methanol	20% (v/v)

Nachdem sich die Proben im Gel aufgetrennt hatten, wurde das Gel in Transferpuffer kurz gewaschen und danach im Sandwichprinzip auf eine Nitrocellulose-Membran gelegt, welche sich auf zwei mit dem Transferpuffer durchtränkten Filterpapieren befindet. Auf das Gel wurden wiederum zwei feuchte Filterpapiere gelegt und die Blotting Kammer zusammengebaut. Dann wurde bei konstanten 65 mA pro Membran für zwei Stunden ein elektrisches Feld aufgebaut und so die Proteine vom Gel auf die Membran übertragen. Bei Tricine-Gelen wurde bei 20 mA pro Membran über Nacht geblottet.

2.2.3.5. Immundetektion

Tabelle 32: Ansätze für die Lösungen zur Immundetektion

TBS-T		Blockierlösung	
NaCl	137 mM	Milchpulver	5%
Tris	25 mM		(w/v)
KCl	2,7 mM	in TBS-T	
Tween 20	0,1% (w/v)		

Nach dem Blotten wurde die Membran für mindestens 30 min in Blockierlösung inkubiert. Dadurch wurde das unspezifische Binden von Antikörpern deutlich reduziert. Anschließend wurde die Membran in frischer Blockierlösung in Anwesenheit von einem primären Antikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für je 10 min mit TBS/T gewaschen und anschließend in Blockierlösung in Anwesenheit des sekundären Antikörpers für eine Stunde inkubiert. Dieser sekundäre Antikörper ist an HRP (Meerrettich Peroxidase) gekoppelt, die der anschließenden Detektion dient.

Der darauffolgende Waschschrift war abhängig von der Effektivität des Antikörpers und kann 20 min bis mehrere Stunden dauern.

Für die Detektion wurde Lumigen ECL Ultra (TMA-6) verwendet, das Substrat für die HRP-katalysierte Chemilumineszenz Reaktion. Es kommt zur Oxidation des Luminols und das angeregte Substrat setzt die Aktivierungsenergie in Photonen frei. Das emittierte Licht wurde mit Hilfe des Image Quant LAS4000 von GE Healthcare aufgezeichnet.

2.2.3.6. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Bei den Proben für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente handelte es sich um Zellkulturüberstände von murinen Immunzellen. Die Zellen wurden in Hinblick auf ihren Genotyp auf die Sekretion verschiedener Cytokine untersucht.

Die Behandlung der Zellen erfolgte den Angaben entsprechend. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen auf Eis gelagert und die Überstände sofort abpipettiert. Diese wurden bei 210 g für 10 min bei 4 °C herunterzentrifugiert, um eventuell verbliebene Zellen im Medium zu entfernen. Eine anschließende Überführung der Überstände in andere Gefäße und erneute Zentrifugation bei 13000 rpm und 4 °C für 10 min lieferte den verwendbaren Überstand, der bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert wurde.

Tabelle 33: Zusammensetzung des Waschpuffers PBS/T

PBS/T	
Tween 20	0,05% (v/v)
in PBS	

Tabelle 34: Verwendete Antikörper in den ELISA-Versuchen

ELISA	Capture-Antikörper	Standard	Detektions-Antikörper	Verdünnungslösung
IL-10 (R&D)	1:120	293 μ L + 7 μ L (2000 pg/mL)	1:60	1% BSA in PBS
TNF α (R&D)	1:125	1 mL + 6,4 μ L (2000 pg/mL)	1:60	1% BSA in PBS
IL-1 β (R&D)	1:120	1mL + 3,7 μ L (1000 pg/mL)	1:60	0,1%BSA in 0.05% TBST
IL-12 p40 (R&D)	1:200	500 μ L + 8,3 (2000 pg/mL)	1:60	1% BSA in PBS
IL-12 p70(R&D)	1:180	285 μ L + 15 μ L (2000 pg/mL)	1:180	1% BSA in PBS

In spezielle ELISA-Platten (Sarstedt) wurden am Tag vor dem Experiment 50 μ l *Capture*-Antikörper-Lösung pipettiert und diese auf einem Schüttler über Nacht inkubiert, sodass der Antikörper an die Platte band. Am nächsten Morgen wurden die beschichteten Wells dreimal mit PBS/T gewaschen und anschließend gründlich ausgeklopft. Anschließend wurden in jedes Well 200 μ l steril filtrierter Verdünnungslösung (siehe Tabelle 34) pipettiert und für eine Stunde auf einem Schüttler inkubiert. Dies diente der Verhinderung unspezifischer Bindungen. Nach erneutem Waschvorgang wurden jeweils 50 μ l der entsprechenden Probe in technischen Duplikaten in die Wells pipettiert.

Für den Nachweis von TNF α wurden die Proben zuvor mit dem entsprechenden Medium, für BMDCs RPMI Medium mit β -Mercaptoethanol, für Bone Marrow derived Macrophages (BMDMs) und peritoneale Makrophagen DMEM mit 20% FCS+Penicillin/Streptavidin (P/S), 1:20 verdünnt, mit Ausnahme der Zellüberstände, bei denen die Zellen nicht oder lediglich mit sterilem Wasser behandelt wurden. Für den Nachweis von IL-10 wurden lediglich die Überstände von den Zellen, welche mit Zymosan behandelt wurden, 1:2 oder bei BMDCs 1:10 verdünnt. Alle anderen ELISA-Proben wurden, wie TNF α , im Verhältnis 1:20 verdünnt. Ein Standard, welcher auf jeder Platte mitgeführt wurde und der Kalibrierung dient, wurde ebenfalls mit Medium angesetzt.

Die Platte, auf welcher sich die Proben befanden, wurde mit Parafilm versiegelt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Platte erneut gewaschen und 50 μ l Detection-Antikörper, in die Wells pipettiert und erneut für zwei Stunden inkubiert und anschließend gewaschen. Streptavidin-HRP wurde dem Datenblatt entsprechend verdünnt und je 50 μ l in ein Well pipettiert. Die folgenden Inkubationszeiten

und Schritte wurden so durchgeführt, dass lediglich eine minimale Lichtexposition zum Schutz der verwendeten Substanzen stattfand.

Nach 20-minütiger Inkubation mit Peroxidase wurde erneut gewaschen und BM Blue Substrate Solution (Roche) unverdünnt in einer Menge von 50 µl in die Wells pipettiert. Sobald die einzelnen Proben des Standards klar zu unterscheiden waren, wurde die Reaktion mit 25 µl 1 M H₂SO₄ gestoppt und die Extinktion bei 485 nm der Wells gleich im Anschluss mithilfe eines Synergy HT multi detection readers quantifiziert. Als Referenz wurde zudem die Extinktion bei 690 nm ausgelesen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Excel.

3. Ergebnisse:

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung neuer Substrate der Intramembranproteasen SPPL2a und SPPL2b. Als potenzielle Kandidaten wurden hierfür Proteine ausgewählt, die den mutmaßlichen Substratanforderungen dieser Enzyme entsprachen. Alle bisher bekannten Substrate sind Typ II orientierte Membranproteine, die eine Ektodomäne besitzen, welche proteolytisch abgespalten werden kann oder deren Ektodomäne per se kurz ist, sodass diese Kriterien als Maßstab für eine Bestimmung potenzieller Kandidaten angewendet wurden [6, 26, 31, 131]. Aufgrund der Erfüllung dieser Grundbedingungen wurden in dieser Arbeit Tweak, ein Mitglied der TNF-Superfamilie, und die beiden C-Typ-Lektinrezeptoren Dectin-2 und Mincle auf ihre Prozessierung durch SPPL2a und SPPL2b untersucht.

3.1. Proteolytische Prozessierung des Tweak-Proteins

3.1.1.1. Prozessierung der Ektodomäne

Für die Analyse der Prozessierungsvorgänge *in-vitro* ist die physiologische Lokalisation des Proteins ein kritischer Faktor. Dieser Überlegung folgend wurde die Überprüfung der subzellulären Lokalisation von, mit einem Humanen Influenza Hämagglutinin (HA) verbundenen, mTweak (HA-mTweak) mithilfe einer Immunfluoreszenzdarstellung durchgeführt. Dabei wurde ein Expressionsplasmid, codierend für das murine Tweak Protein, hergestellt und an das N-terminale, nach intrazellulär weisende Ende der Proteinsequenz ein Hämagglutinin-Epitop angefügt.

Durch die Möglichkeit die Sequenz von Tweak zusätzlich mit einem Epitop zu verbinden, kann ein einfacher Nachweis des Proteins durch einen spezifischen, gegen das Epitop gerichteten, Antikörper erfolgen. Eine schematische Darstellung ist in Abbildung 5 aufgezeigt. Dabei konnte das Protein nach Permeabilisierung der Zellen hauptsächlich an oder in der Nähe der Plasmamembran der transfizierten Zellen detektiert werden (Abbildung 7). Zusätzlich konnten einige intrazelluläre Strukturen gefärbt werden.

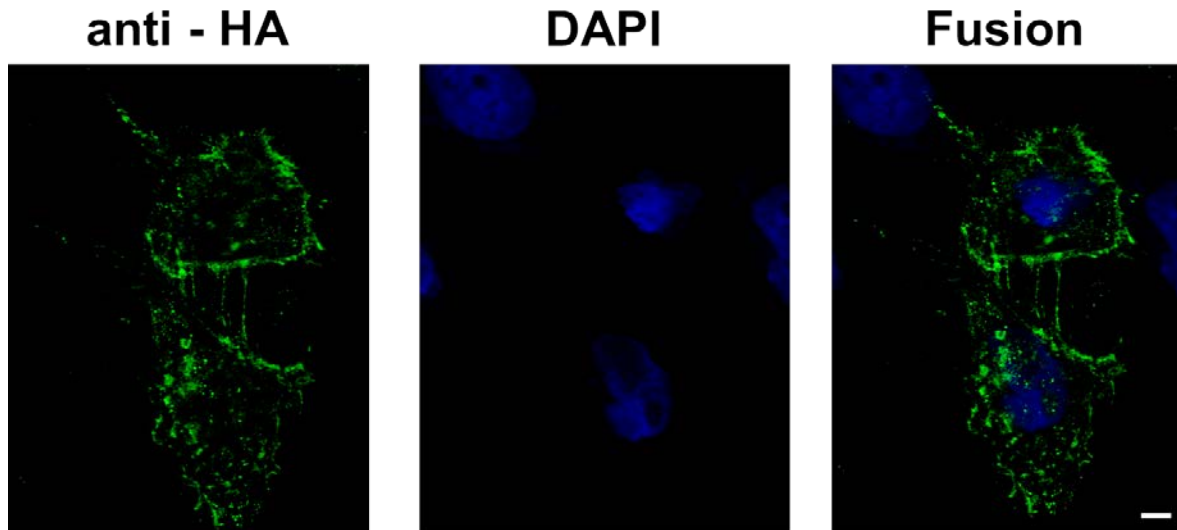


Abbildung 7: HA-mTweak wird an die Zelloberfläche transportiert

HeLa-Zellen wurden auf Deckgläser ausgesät und mit dem für HA-mTweak kodierenden Plasmid transfiziert. Nach Fixierung mit PFA und der Permeabilisierung der Zellen mit Saponin wurde Tweak über einen für den HA-Epitop spezifischen Antikörper und einem mit Alexa488-konjugierten Zweitantikörper detektiert. Die Zellkerne wurden mittels 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) angefärbt. Maßstab $\approx 10\mu\text{m}$.

Um genaueren Einblick in die proteolytische Prozessierung von Tweak zu erlangen, bietet sich das Western Blot Verfahren an. Dabei wurde das Plasmid mit der für Tweak codierenden Sequenz in HEK-Zellen gebracht und diese nach 24 Stunden lysiert. Wie auch schon für die Immunfluoreszenz beschrieben, wurde an das N-terminale Ende der Sequenz ein Hämagglutinin-Epitop angesetzt. Durch die Typ II Orientierung von Tweak befindet sich dieses Epitop intrazellulär und eine Prozessierung würde Tweak verkürzen. Im Western Blot kann das nun das verkürzte Protein, aber auch das nicht prozessierte Protein (Vollängenprotein) entsprechend seiner Größe dargestellt werden. Dies erfolgt durch die Verwendung eines primären, gegen das HA-Epitop gerichteten Antikörpers, sowie eines mit der Meerretich-Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörpers. Über Chemilumineszenz kann eine Detektion des HA-Epitops und somit des gesamten Proteins oder dessen N-terminalen Fragmenten erfolgen.

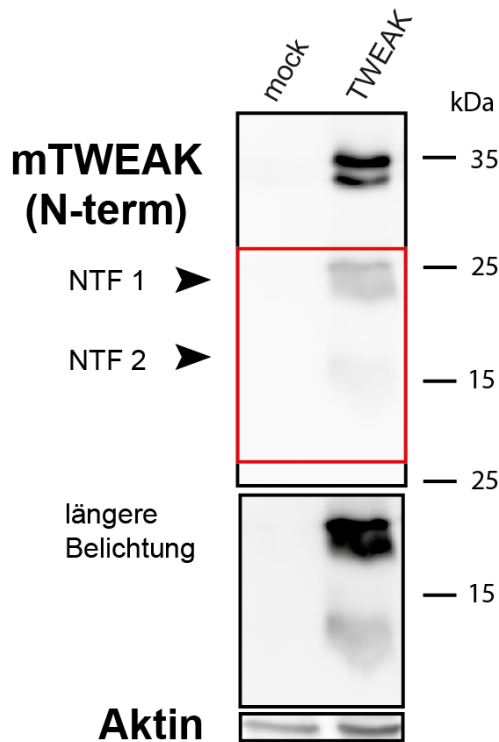


Abbildung 8: Murines Tweak wird proteolytisch prozessiert

HEK Zellen wurden transient mit einem Leervektor (mock) oder dem Konstrukt HA-mTweak transfiziert und anschließend lysiert. Dabei befindet sich das Epitop am N-terminalen Ende des Proteins und somit bei intakter Zelle intrazellulär. Bei Prozessierung wird ein Teil des Gesamtlängenproteins abgespalten und ein Rest des Proteins: das N-terminale Fragment (NFT), verbleibt und kann weiterhin durch das Epitop nachgewiesen werden. Die Prozessierung von HA-Tweak wurde per Western Blot mit einem HA-Antikörper untersucht. Dabei wurde ein HRP-konjugierter Zweitantikörper verwendet, was eine Detektion mittels Chemolumineszenz ermöglicht. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinbeladung wurde Aktin nachgewiesen.

In einem Experiment, dessen Ergebnisse in Abbildung 8 dargestellt sind, wurden HEK Zellen der Beschriftung entsprechend transient transfiziert. Durch Westernblot Analyse zeigten sich multiple Banden, wobei die beiden oberen Banden bei 35 kDa das wahrscheinliche Volllängen-Protein darstellen. Bei den beiden unteren Banden, mit einem apparenten Molekulargewicht von 25 kDa und 15 kDa, handelt es sich folglich um N-terminale und HA-markierte Fragmente von Tweak, die neue Substrate für SPPL2-Proteasen darstellen könnten. Diese werden im Weiteren als NTF1 (25 kDa Spezies) und NTF2 (15 kDa Spezies) bezeichnet.

In der Literatur wird Furin als Tweak-prozessierende Protease beschrieben, wobei lediglich an einer der zwei Konsensus-Schnittstellen eine Proteolyse stattfindet [104, 115]. Aufgrund des Nachweises verschiedener N-terminaler Fragmente von Tweak erschien es sinnvoll, weitere Experimente durchzuführen, um eine mögliche Beteiligung weiterer Proteasen und die Ätiologie der zwei Volllängen-Protein-Banden und der beiden NTFs zu untersuchen.

So wurden *HEK-Flip In* Zellen stabil mit dem murinen Tweak-Konstrukt transfiziert, wie unter 2.2.2.8 beschrieben, und mit Proteaseinhibitoren für sechs Stunden behandelt, um

eine eventuelle Veränderung der NTFs durch Inhibition einzelner Proteasegruppen darstellen zu können.

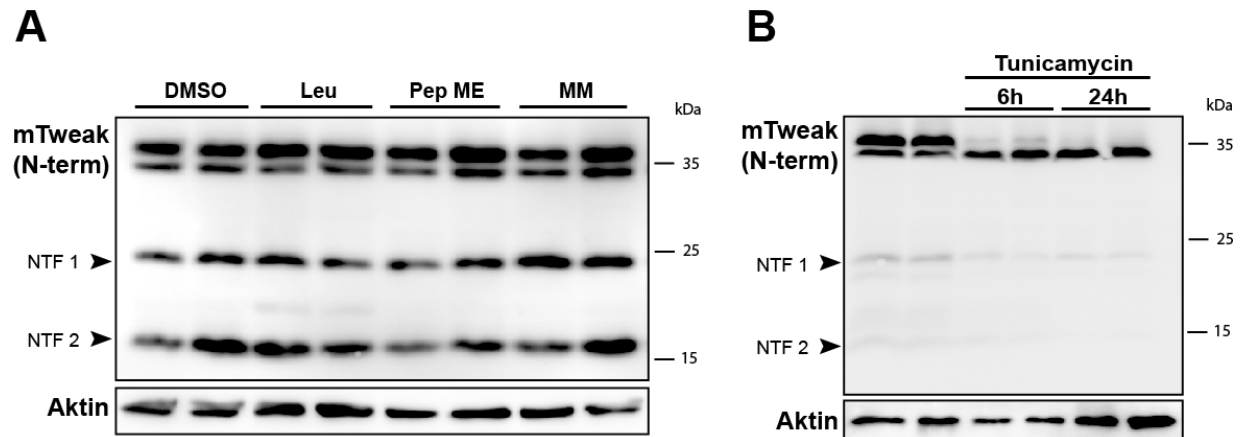


Abbildung 9: Die NTFs des Glykoproteins Tweak wurden durch verschiedene Inhibitoren nicht beeinflusst

A: *HEK Flip-In* Zellen wurden stabil mit HA-mTweak transfiziert und mit DMSO, 100 μ M Leupeptin (Leu), 1 μ M Pepstatin-ME (Pep ME) und 10 μ M Marimastat (MM) für 6,5 h auf den Zellen belassen. Anschließend wurden die Zellen, wie unter 2.2.3.1 beschrieben, lysiert. Aktin wird hierbei als Kontrolle für gleichmäßige Proteinmengen in den einzelnen Lysaten verwendet.

Die Prozessierung von HA-Tweak wurde per Western Blot mit einem HA-Antikörper nachgewiesen. B: *HEK Flip-In* Zellen wurden mit HA-mTweak transient transfiziert und entweder direkt danach für 24 h oder am nächsten Tag für 6 h mit 2 μ g/ml Tunicamycin behandelt, um eine potentielle Glykosylierung zu untersuchen. Auch hier wurde Tweak mithilfe eines gegen den HA-Epitop gerichteten Antikörpers dargestellt. Aktin wird hierbei als Kontrolle für gleichmäßige Proteinmengen in den einzelnen Lysaten verwendet.

Hierfür wurden Zellen für 6,5 Stunden mit Leupeptin, zur Inhibierung von Serin- und Cysteinproteasen, Pepstatin, für welches eine Inhibierung der Aspartyl-Proteasen beschrieben wurde, oder Marimastat, welches zur Hemmung eines weiten Spektrums der Metalloproteasen, behandelt und anschließend mittels Western Blot auf die Prozessierung von Tweak untersucht (siehe Abbildung 9 A).

Wie in Abbildung 9 A zu sehen, konnte keine eindeutige Veränderung der NTFs von Tweak nach Behandlung mit den verwendeten Proteaseinhibitoren beobachtet werden. Das legt den Schluss nahe, dass beim Abbau von Tweak eine oder mehrere, nicht mit den verwendeten Substanzen inhibierbare, Proteasen für die Generierung der beobachteten Fragmente zuständig sind. In den stabil transfizierten Zellen zeigte sich zudem eine stärkere Intensität der N-terminalen Fragmente in Vergleich zu den transient transfizierten Zellen. Dies kann durch eine länger andauernde Expression und dadurch Akkumulation des Vollängen-Proteins und der NTFs erklärt werden. Neben der Existenz verschiedener N-

terminaler Fragmente konnten auch zwei Banden bei einem Molekulargewicht von ungefähr 35 kDa detektiert werden. Es wurde in Betracht gezogen, dass es sich bei der oberen Bande um die glykosylierte Form von Tweak handeln könnte, welches in Position 139 eine N-Glykosylierungsstelle aufweist. Daher wurden HEK-Zellen mit HA-mTweak transfiziert und für 6 beziehungsweise 24 Stunden mit Tunicamycin behandelt (siehe Abbildung 9 B). Tunicamycin blockiert über Inhibierung der GlcNAc-Phosphotransferase die N-Glykosylierung. Durch Westernblotanalyse konnte dargestellt werden, dass nach Inkubation mit Tunicamycin die obere der beiden Banden bei ca. 35 kDa stark reduziert wurde, was darauf hindeutet, dass es sich hierbei um eine glykosylierte Form des Typ II Transmembranproteins handelt. Die untere Bande dürfte dementsprechend die unglykosylierte Form darstellen. Auch die NTF-Banden wurden unter der Behandlung mit Tunicamycin deutlich schwächer, was möglicherweise durch eine intrazelluläre Akkumulation und dadurch reduzierte Prozessierung des unglykosylierten Tweak-Vorläufers erklärt werden kann.

3.1.2. Intramembranproteolyse von Tweak durch die Signal Peptide Peptidase Like 2 Proteasen

In der Vergangenheit wurde vor allem die Bedeutung des freigesetzten Tweak erforscht und die in der Membran verbleibenden NTFs traten in den Hintergrund. Da es sich bei Tweak um ein Typ II Transmembranprotein handelt, erfüllen die hier detektierten Tweak NTFs alle bekannten Voraussetzungen, um Substrate der Intramembranproteasen SPPL2a bzw. SPPL2b darzustellen.

Nach dem Nachweis von N-terminalen Fragmenten von mTweak wurden HEK293 Zellen mit dem oben beschriebenen HA-mTweak und zusätzlich mit den aktiven oder katalytisch inaktiven Varianten von mSPPL2a oder mSPPL2b transfiziert. Diese katalytisch inaktiven Varianten wurden durch einen Austausch von Asparaginsäure durch Alanin im aktiven Zentrum der Transmembrandomäne 7 generiert, für SPPL2a an Stelle 412 (SPPL2a D412A) und für SPPL2b an Stelle 421 (SPPL2b D421A). Die Tweak-NTF Expression dieser Zellen wurden mittels Western Blot verglichen (siehe Abbildung 10).

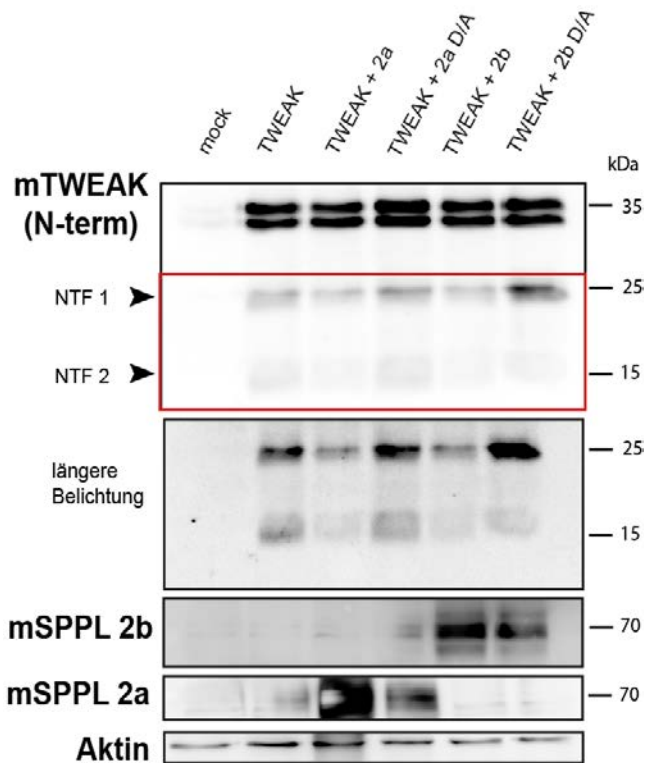


Abbildung 10: Die NTFs von Tweak werden durch SPPL2a sowie SPPL2b proteolytisch prozessiert

HEK-Zellen wurden mit einem Leervektor oder HA-mTweak sowie entweder mit den aktiven oder inaktiven Varianten der einzelnen Proteasen transfiziert (aktiv: SPPL2a-myc, SPPL2b-myc, inaktiv: SPPL2a D416A-myc (2a D/A), SPPL2b D414A-myc (2b D/A)). Die Prozessierung von HA-Tweak wurde im Western Blot mit einem HA-Antikörper nachgewiesen, die koexprimierten Proteasen SPPL2a und 2b wurden mit Hilfe von spezifischen Antikörper detektiert.

Wurde die aktive Variante der Proteasen SPPL2a oder SPPL2b co-transfiziert, so war eine deutliche Reduktion beider N-terminalen Fragmente von Tweak zu erkennen, was auf einen proteolytischen Abbau der Fragmente durch die Enzyme hinweist. Dies lässt darauf schließen, dass die NTFs von mTweak unter Überexpressionbedingungen Substrate sowohl von SPPL2a als auch von SPPL2b darstellen. Die Bedeutung der katalytischen Aktivität für die Reduzierung der NTF-Level wurde durch die Kontrolle mit den jeweils katalytisch inaktiven Mutanten validiert. In diesen zeigt sich dann, bei fehlender proteolytischer Aktivität [132], eine Akkumulation der NTFs.

Wie eingangs beschrieben, erfolgt die Regulierte Intramembranproteolyse (RIP) in zwei Schritten. Im ersten Schritt wird die Ektodomäne, welche nach extrazellulär ragt, abgespalten, auch *Shedding* genannt. Der zweite Schritt stellt die Prozessierung des weiterhin in der Membran verbleibenden Proteinfragmentes dar, im Falle von mTweak in dieser Arbeit mit NTF1 und NTF2 bezeichnet. In diesem zweiten Schritt kann somit durch Prozessierung des Fragmentes der Teil des Proteins, welcher frei nach intrazellulär ragt, auch intrazelluläre Domäne (ICD) bezeichnet, losgelöst werden und ins Zytosol freigesetzt werden. Auch im Fall von mTweak kann, nach dem *Shedding* und der weiteren Prozessierung durch SPPL2a und SPPL2b angenommen werden, dass die intrazelluläre Domäne von Tweak (ICD) in das Zytosol der Zelle freigesetzt wird. Da diese nur rund 18

Aminosäuren umfasst und somit nur eine sehr geringe molekuläre Größe besitzt, kann diese in dem Western Blot Verfahren nicht nachgewiesen werden.

Im Anschluss wurde die Prozessierung von mTweak durch endogen exprimierte SPPL2a und SPPL2b untersucht (siehe Abbildung 11). Dafür wurden HEK-Zellen mit HA-mTweak transfiziert und mit dem SPP/SPPL-spezifischen Inhibitor (Z-LL)₂-Keton (ZLL) behandelt.

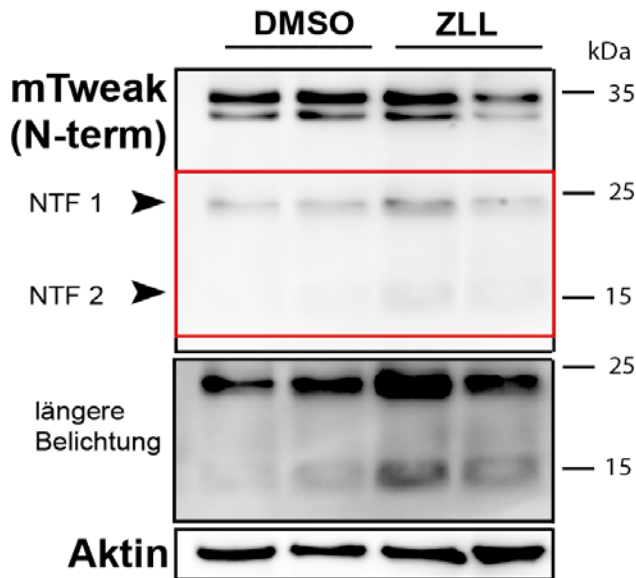


Abbildung 11: Die Prozessierung von Tweak wird durch den Inhibitor (Z-LL)₂-Ketone (ZLL) beeinflusst

HEK-Zellen wurden mit HA-mTweak transfiziert und für 6 h mit DMSO oder 20 μ M (Z-LL)₂-Keton (ZLL) behandelt. Die Prozessierung von HA-Tweak wurde mit einem HA-Antikörper sowie mithilfe eines Zweitantikörpers mit Chemilumineszenz nachgewiesen.

In Abbildung 11 wurde HA-mTweak in HEK-Zellen überexprimiert und mit DMSO als Kontrolle oder ZLL behandelt. Es konnte eine Akkumulation beider NTFs (NTF1 und NTF2) beobachtet werden, was auf eine Beteiligung der endogen exprimierten SPPL-Proteasen bei der Prozessierung Tweaks hinweist und Tweak somit in-vitro ein Substrat dieser Proteasen darstellt.

Das Abspalten der Ektodomäne stellt einen zentralen Schritt in der RIP dar. Da eine Prozessierung von Tweak durch die Protease Furin beschrieben wird, wurde in dem nächsten Ansatz die Beteiligung dieser Protease für die RIP von Tweak analysiert.

Zudem ist durch den Nachweis von zwei NTFs eine weitere Analyse des Sheddingevents von Interesse, um die Beteiligung von Furin an der Generierung dieser beiden NTFs zu untersuchen.

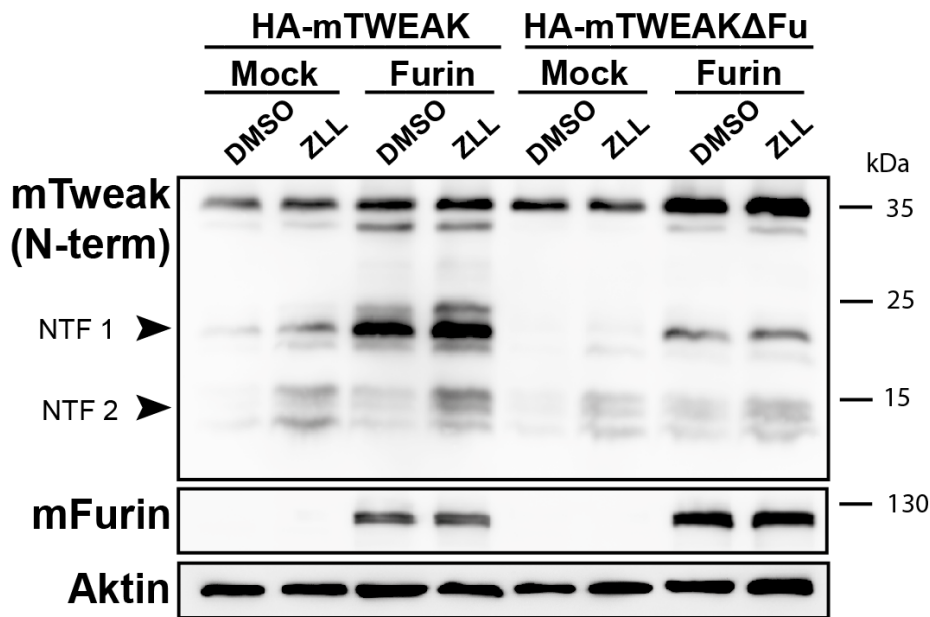


Abbildung 12: Die Prozessierung von Tweak wird durch die Protease Furin beeinflusst

HEK Zellen wurden der Beschriftung entsprechend transfiziert und die Zellen für 6 h mit 20 μ M (Z-LL)₂-Keton (ZLL) oder DMSO behandelt. Die Prozessierung von HA-Tweak wurde mit einem HA-Antikörper nachgewiesen, die koexprimierte Protease Furin wurde über einen gegen das myc-Epitop der Protease gerichteten Antikörper detektiert.

In Abbildung 12 wurde das N-terminal HA-markierte murine Tweak-Protein (HA-mTweak), entweder allein oder zusammen mit der potenziell Tweak-prozessierenden Protease Furin, die zur Detektion mit einem Myc-Epitop versehen wurde, in HEK-Zellen exprimiert (siehe Abbildung 12). Neben HA-mTweak wurde für dieses Experiment zusätzlich eine Mutante dieses Proteins kloniert, bei der, basierend auf dem bereits verwendeten Konstrukt, die Sequenz an Position 90-93 als primär beschriebene Schnittstelle für Furin durch vier Alanine (AAAA) ersetzt wurde (HA-mTweak Δ Furin). Um zusätzlich einen ersten Einblick in die Rolle der SPPLs auf die Stabilität möglicher Tweak-Fragmente zu erhalten, wurde (Z-LL)₂-Keton (ZLL) als ein Inhibitor dieser Proteasen eingesetzt [133]. Die Detektion von Tweak über das N-terminalen HA-Epitop zeigte das Volllängen-Protein bei ca. 35 kDa. Nach Koexpression mit Furin konnte eine deutliche Steigerung der Menge von NTF 1 detektiert werden. Dieser Effekt war nach Mutation der publizierten Furin-Schnittstelle deutlich schwächer ausgeprägt. Dies deutet auf eine Furin-abhängige Generierung von NTF 1 hin. Im Gegensatz dazu scheint bei dem zweiten, auf Höhe von 15 kDa nachweisbaren NTF keine Furin-abhängige Prozessierung vorzuliegen, da hier die Koexpression mit Furin nicht in einer Modulation der Bandenintensität resultiert. Die multiplen Banden ähnlicher molekularer Größe könnten Zwischenstufen in der Prozessierung der NTFs darstellen. Die Bande des Volllängen-Proteins zeigt sich bei den

mit Furin koexprimierten Ansätzen verstärkt. Es scheinen somit zwei Prozessierungsabläufe vorzuliegen, einer der durch Furin induziert wird und mit der Produktion von NTF 1 resultiert und ein weiterer, bei welcher die Generierung des NTF 2 ungeklärt bleibt, siehe Abbildung 33.

Eine Inhibition mit ZLL als spezifischen Inhibitor der Proteasen SPPL2a und 2b wirkt modulierend auf beide NTFs von Tweak: bei Behandlung mit ZLL kann eine Akkumulation der NTFs nachgewiesen werden. Dabei zeigt die Inhibierung der SPPL2a und 2b vor allem einen Einfluss auf das NTF 2 auf, welches unabhängig von einer Furin-induzierten Proteolyse zu sein scheint. Die N-terminalen Fragmente von murinen Tweak konnten demnach als Substrat von SPPL2a und SPPL2b unter Überexpressionsbedingungen identifiziert werden.

3.1.3. Analyse der Funktionen der Intrazellulären Domäne von Tweak anhand eines Microarrays

Die intrazelluläre Domäne (ICD) von Tweak als Spaltprodukt des NTFs kann aufgrund seiner Größe von rechnerisch circa 800 Dalton im Western Blot nicht nachgewiesen werden. Dieses ins Zytosol freigesetzte Fragment birgt die Möglichkeit einer biologischen Funktion innerhalb der Zellen und obwohl bereits eine Reihe verschiedener Substrate von SPPL-Proteasen gefunden werden konnten, ist die physiologische Bedeutung der beobachteten proteolytischen Prozesse in vielen Fällen noch unverstanden.

Aus diesem Grund wurde mithilfe des folgenden Experimentes untersucht, ob die ICD von Tweak eine funktionelle Bedeutung besitzt. Dabei sind zwei verschiedene Szenarien vorstellbar, auf denen die Hypothese, dass die Tweak ICD zellulär eine Funktionalität ausübt, aufbaut. Zum einen könnte, nach Prozessierung der NTFs von Tweak durch SPPL2a und 2b, die nun ins Zytosol freigesetzte ICD die Genexpression der Zelle beeinflussen. Die kurze Sequenz könnte in den Nukleus translozieren und dort, entweder selbst oder durch Bindung an Transkriptionsfaktoren, die Genexpression der Zelle modulieren, was dann über eine Transkriptomanalyse detektiert werden könnte. Zum anderen könnte gerade das membrangebundene N-terminale Fragment mit der ICD eine Signalkaskade induzieren und so eine Modulation der intrazellulären Proteinsynthese bewirken, wie es beispielsweise bei Hüttl et al. 2015 beschrieben wurden, siehe Abbildung 35.

Erste Hinweise über mögliche Funktionen der Tweak ICD sollten in einem HEK-Zell-basierten System gewonnen werden, in dem die Tweak ICD induzierbar überexprimiert werden konnte. Dieses System wurde zuvor für andere SPPL2-Substrate wie z.B. CD74

(Mentrup et al., 2015) etabliert und nun für Tweak modifiziert. Als mutmaßliche ICD Sequenz von mTweak wurde, basierend auf der bioinformatisch vorhergesagten Position der Transmembrandomäne, die ersten N-terminal liegenden 18 Aminosäuren festgelegt. Anschließend wurde die ICD Sequenz in zwei verschiedene Vektoren inseriert, die sich lediglich durch eine sieben Aminosäuren lange Sequenz unterscheiden, wobei erstere die Tobacco Etch Virus (TEV) Proteasenschnittstelle kodiert (ENLYFQG), während beim anderen Vektor nur eine repetitive Alaninsequenz (A₇) vorliegt. Es erfolgte eine stabile Transfektion dieser beiden Konstrukte in T-Rex Flip-In Zellen. Die Tweak ICD mit der TEV-Proteasenschnittstelle bzw. der entsprechenden Alaninwiederholung ist über ein Grünfluoreszierendes-Protein (GFP) mit einem Syntaxin-7-Membrananker an der Plasmamembran fixiert (siehe Abbildung 13). Durch die Koexpression einer myc-markierten TEV-Protease über eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES-Sequenz) kann jedoch nur bei dem Konstrukt mit der Schnittstellensequenz eine Prozessierung und somit eine ICD-Freisetzung stattfinden. Eine mögliche transkriptionsregulierende Aktivität der ICD erfolgt durch eine vergleichende Transkriptomanalyse der beiden stabil transfizierten Zellreihen.

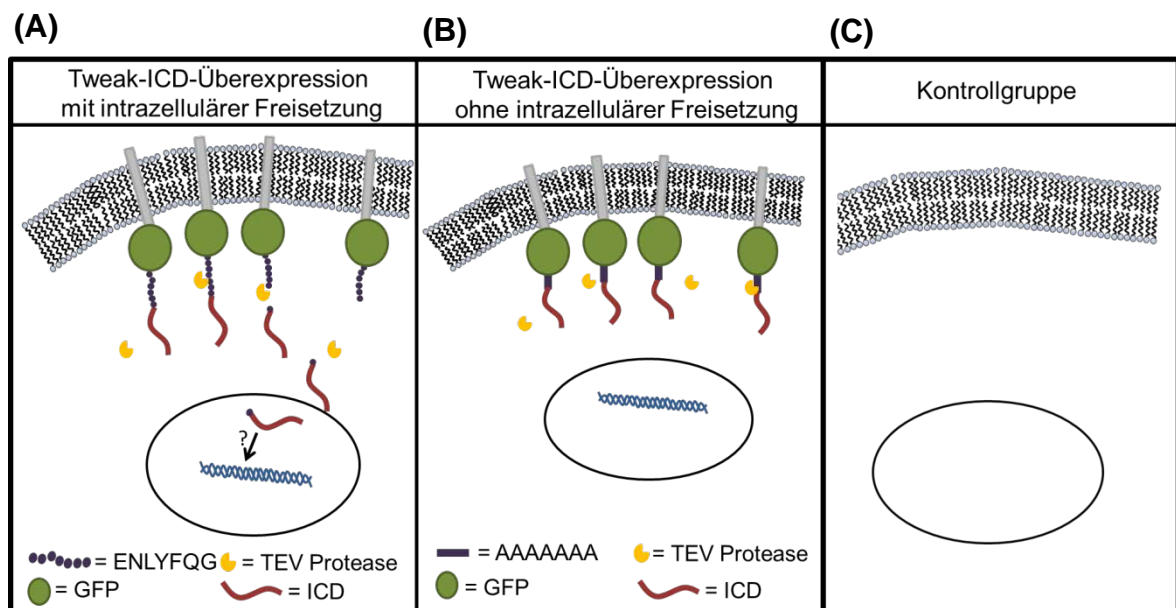


Abbildung 13: Design eines Modells zur Überexpression der Tweak ICD

Die aus 18 Aminosäuren bestehende ICD von murinem Tweak wurde an das grünfluoreszierende Protein (GFP) fusioniert, welches wiederum an einen Syntaxin-7-Membrananker gekoppelt wurde. Zwischen dem GFP Molekül und der ICD befand sich entweder eine TEV-Schnittstelle (ENLYFQG), dann als Tweak ICD-TEV-GFP-Konstrukt bezeichnet, oder eine korrespondierende Sequenz aus sieben Alaninen (A₇) (Tweak ICD-A₇-GFP-Konstrukt). Die, über eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES), ebenfalls auf dem Vektor kodierte Sequenz für die TEV Protease wurde in beiden Fällen abgelesen und die Protease exprimiert. Da sich jedoch in (B) keine Schnittstelle findet, wird nur in (A) eine Liberierung der ICD möglich. Unter (C) wurde für die Kontrollzelllinie lediglich der Leervektor pcDNA5.1 transfiziert.

Mit den beschriebenen und in der Abbildung 13 dargestellten Konstrukten wurden T-Rex Flip-In Zellen stabil transfiziert und zunächst per Westernblot Analyse auf ihre Funktionalität überprüft (siehe Abbildung 14).

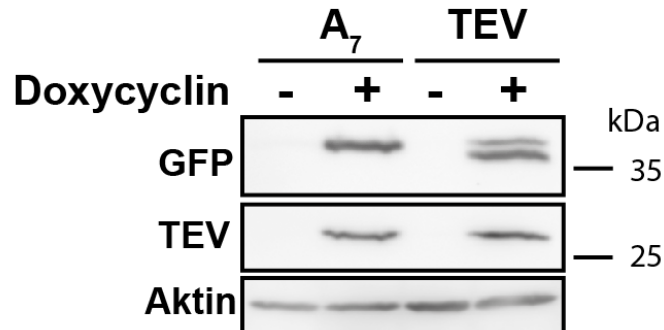


Abbildung 14: Induzierbare Freisetzung der putativen Tweak-ICD in T-Rex 293-Zellen

T-Rex Flip-In 293 Zellen wurden mit den in Abbildung 13 gezeigten Plasmiden stabil transfiziert. Durch eine Behandlung der Zellen mit 10 µg/ml Doxycyclin wurde die Expression der Konstrukte für 24 h induziert. Die proteolytische Freisetzung der Tweak ICD in beiden Zelllinien wurde mittels Western Blot überprüft. Dabei kann die ICD nur indirekt nachgewiesen werden, da nur eine Darstellung des GFP im Westernblot erfolgen kann. Wird mithilfe der TEV-Protease die ICD abgespalten, sind anschließend, aufgrund der unterschiedlichen molekularen Größen, zwei Banden durch Nachweis von GFP nachweisbar. Die untere Bande stellt dabei das Fusionsprotein ohne ICD dar, wohingegen die obere Bande den Proteinkomplex mit GFP und ICD darstellt. Während die jeweiligen Vorläufermoleküle über einen gegen GFP-gerichteten Antikörper nachgewiesen wurden, wurde die TEV-Protease mit einem myc-Antikörper detektiert.

Die Expression der Konstrukte wurde durch eine Behandlung der stabil transfizierten Zellen mit 10 µg/ml Doxycyclin für 24 Stunden induziert, siehe Abbildung 13. Während im Fall des Tweak ICD-A7-GFP-Konstruktes nur eine Bande für das ungeschnittene Fusionsprotein detektiert werden konnte, wurde im Falle der Anwesenheit einer funktionalen TEV-Protease-Schnittstelle eine zusätzliche Bande mit einem leicht verringerten Molekulargewicht detektiert, die im Gel eine höhere Migrationsgeschwindigkeit aufweist. Dies deutet auf eine proteolytische Freisetzung der Tweak-ICD in diesen Zellen hin. Dabei erfolgt der Nachweis der ICD nur indirekt. Mit beiden Banden wurde GFP, als Bestandteil des Fusionsproteins, nachgewiesen. Die obere Bande zeigt sich dabei in der gleichen molekularen Größe wie das Fusionsprotein, welches keine TEV-Schnittstelle enthält. Hierbei handelt es sich demzufolge um das intakte Fusionsprotein bestehend unter anderem aus dem GFP und der ICD von Tweak, siehe Abbildung 13. Die untere Bande besitzt ein geringeres Molekulargewicht und stellt demnach das prozessierte Fusionsprotein, ohne die Tweak ICD, dar.

Auf Basis dieser Daten wurde anschließend das Transkriptom der beiden Zelllinien in einer Microarray-Analyse in Kollaboration mit Robert Häsler, Kiel, analysiert. Zusätzlich wurde als weitere Kontrolle eine mit pcDNA5.1-tranfizierte Zelllinie verwendet.

Gen	TEV / A7	TEV / pcDNA5.1	A7 / pcDNA5.1	Effekt	Anmerkungen
CT45A6	-2,02	-1,04	1,94	A7 ↑	Hodenkrebs Antigen
IFIT2	-1,89	1,30	2,45	A7 ↑	Apoptosemediator
C1QTNF9	-1,77	1,09	1,91	A7 ↑	Hormon
PRKX	-1,74	-1,83	0,95	TEV ↓	Serin/Threoninkinase Kallikrein-related peptidase 7 potentieller Tumormarker
KLK7	1,59	1,58	0,99	TEV ↑	
IFNA17	1,65	1,26	0,76	TEV ↑	Interferon alpha 17
IL1B	1,67	1,60	0,96	TEV ↑	Interleukin 1 beta
KCNJ6	1,71	1,18	0,69	TEV ↑; A7 ↓	Kaliumkanal
DIO1	1,78	1,68	0,94	TEV ↑	Dejodase 1
USP17	1,88	1,82	0,96	TEV ↑	Deubiquitinationsenzym, potentieller Tumorsupressor
STEAP1	1,95	1,78	0,91	TEV ↑	Metalloprotease, erhöht in Prostata Karzinomen
APOL1	2,03	1,26	0,62	TEV ↑; A7 ↓	Apolipoprotein L1
FKBPL	2,22	-1,19	0,38	A7 ↓	Anti-Tumormarker, prognostischer Marker bei Brustkrebs

Tabelle 35: Potenziell durch die Tweak-ICD regulierte Gene

In dieser Tabelle sind die Gene aufgelistet, bei welchen das Expressionverhältnis von Tweak-ICD-TEV-GFP/Tweak-ICD-A7-GFP $\leq -1,5$ oder $\geq +1,5$ betrug. Dabei wurden die mRNA-Spiegel der einzelnen Gene in den verschiedenen Zelllinien in ein Verhältnis zueinander gestellt. Die Abkürzung TEV steht hierbei für die Zelllinie, bei welcher das Konstrukt Tweak ICD-TEV-GFP transfiziert wurde. Die Abkürzung A7 steht für die Zelllinie, bei welcher das Konstrukt Tweak ICD-A7-GFP transfiziert wurde. pcDNA5.1 beschreibt die Verwendung eines Leervektors ohne ein zusätzliches Konstrukt. Tobacco Etch Virus (TEV), Cancer/Testis Antigen Family 45 Member A6 (CT45A6), Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2 (IFIT2), C1q And TNF Related 9 (C1QTNF9), Protein Kinase X-Linked (PRKX), Kallikrein-related peptidase 7 (KLK7), Interferon alpha 17 (IFNA17), Interleukin 1 beta (IL1B), Potassium Inwardly Rectifying Channel Subfamily J Member 6 (KCNJ6), Typ-I-Deiodinase (DIO1), Ubiquitin-specific protease 17 (USP17), Six-transmembrane epithelial antigen of the prostate (STEAP1), Apolipoprotein L1 (APOL1), FK506 binding protein - Prolyl Isomerase Like (FKBPL)

Die detektierten Transkripte wurden nach ihrer Expression sortiert und diejenigen als potentiell regulierte Kandidaten berücksichtigt, deren Tweak-ICD-TEV-GFP/Tweak-ICD-A7-GFP Expressionsverhältnis entweder $\leq -1,5$ oder $\geq +1,5$ war. Diese Kriterien trafen auf 13, für Proteine kodierende, Gene zu, die in Tabelle 35 aufgelistet sind.

Die Auswertung dieses Experimentes erfolgte durch eine Berechnung von Verhältnissen der einzelnen mRNA-Spiegel. So wurden die mRNA-Spiegel verschiedener Gene zwischen den Zellen mit dem A7-Konstrukt, dem TEV-Konstrukt und dem Leervektor pcDNA5.1 verglichen. Angenommen die ICD von Tweak moduliert in keiner Weise die Expression eines Genes, so würde sowohl in der Zelllinie A7, als auch der Zelllinie TEV und in der Zelllinie pcDNA 5.1 die gleichen Mengen an mRNA gemessen werden. Dabei wären alle Verhältnisse, die gebildet werden, also A7/TEV, A7/pcDNA5.1 und TEV/pcDNA5.1 gleich 1. Würde nur die membrangebundene Form der ICD von Tweak eine Modulation in der Genexpression, beispielsweise über Signaltransduktion oder Bindung anderer Proteine, bewirken, so würden erhöhte oder erniedrigte mRNA-Werte in der A7-Zelllinie gemessen werden, und gleiche Werte in den Zelllinien TEV und pcDNA5.1. Die gebildeten Verhältnisse wären also bei A7/TEV und A7/pcDNA5.1 ungleich 1, je nach Modulationsrichtung <1 , wenn die Genexpression bei membrangebundener ICD abnimmt oder >1 bei verstärkter Expression des Genes. Wird jedoch die Genexpression über die gelöste ICD, die beispielsweise in den Zellkern translozieren könnte, beeinflusst, so würden sich veränderte mRNA-Werte in der TEV-Zelllinie wiederfinden, bei konstanten Werten in pcDNA5.1 und A7. Hier wären die Verhältnisse für TEV/A7 und TEV/pcDNA5.1 ungleich 1. Eine Abnahme der Genexpression zeigt sich bei freigesetzter ICD (also bei Verwendung des TEV Konstruktes) für PRKX, einer Serin/Threoninkinase. Eine verminderte Genexpression bei festverankerter ICD (A7) zeigte sich für die Gene KCNJ6, codierend für einen Kaliumkanal, für APOL1, dem Gen für das Apolipoprotein L1, und für FKBPL, einem Gen für ein Protein, welches als Marker für Brustkrebs verwendet wird. Eine erhöhte Genexpression in der A7 Zelllinie findet sich bei CT45A6, einem Marker für Hodenkrebs, IFIT2, einem Apoptosemediator und C1QTNF9, codierend für das *Complement C1q and tumor necrosis factor-related protein 9A*. Eine erhöhte Genexpression bei freigesetzter ICD zeigt sich für KLK7, einer Peptidase und potentiell Tumormarker, IFNA17, codierend für Interferon alpha 17, IL1 β , Interleukin 1 beta, DIO1, der Dejodase 1, USP17, ein Gen codierend für ein Deubiquitinationsenzym, STEAP1, einer Metalloprotease und bei Prostatakarzinomen erhöht, sowie passend zu einer erniedrigten Expression in A7, eine erhöhte Genexpression von APOL1 und KCNJ6. Die Hypothese, dass die Tweak-ICD auf zellulärer Ebene eine funktionelle Relevanz besitzt, wird durch diese Beobachtungen erhärtet.

3.2. Charakterisierung von Substratkandidaten aus der CTLR – Familie

Neben Mitgliedern der TNF-Superfamilie stellen C-Typ-Lektin-Rezeptoren (CTLR) eine neue Familie von SPPL2-Substraten dar. So konnten die beiden Typ II Transmembranproteine Dectin-1 und LOX-1 als neue Substrate dieser Intramembranproteasen identifiziert werden [50]. Im Rahmen dieser Studie sollten daher neben Tweak auch die beiden CTLRs Dectin-2 und Mincle auf eine potentielle Prozessierung durch SPPL2a und SPPL2b untersucht werden. Während Dectin-2 einen wichtigen Oberflächenrezeptor vornehmlich myeloider Zellen für Mannose-reiche Glukane in den Zellwänden verschiedener Pathogene wie z.B. von Pilzen darstellt, detektiert Mincle spezifische Liganden auf Mykobakterien und Pilzen, wie *Candida albicans* und *Malassezia* [75, 76, 82, 134].

3.2.1. Expression von mDectin-2 und mMincle in humanen Standardzelllinien

Die Analyse einer möglichen Prozessierung von Dectin-2 und Mincle unterlag dem Modell, welches für Dectin-1 aufgestellt wurde, siehe Abbildung 5 . Ähnlich wie bei Tweak erfolgte dabei durch eine N-terminale Markierung mit einem HA-Epitop die Erstellung von Expressionskonstrukten um die Prozessierungsanalyse der beiden Proteine zu ermöglichen. Im Anschluss wurden Zellen mit diesen Konstrukten transfiziert und nach 24 Stunden mit Liganden, auch *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP) genannt, behandelt. Dabei zeigte sich für Dectin-1 eine Internalisierung des Rezeptors und eine anschließende Prozessierung durch die Intramembranproteasen SPPL2a und 2b. Auch für die Untersuchung von mDectin-2 und mMincle wurden als Zellsystem zunächst humane HEK293T-Zellen verwendet.

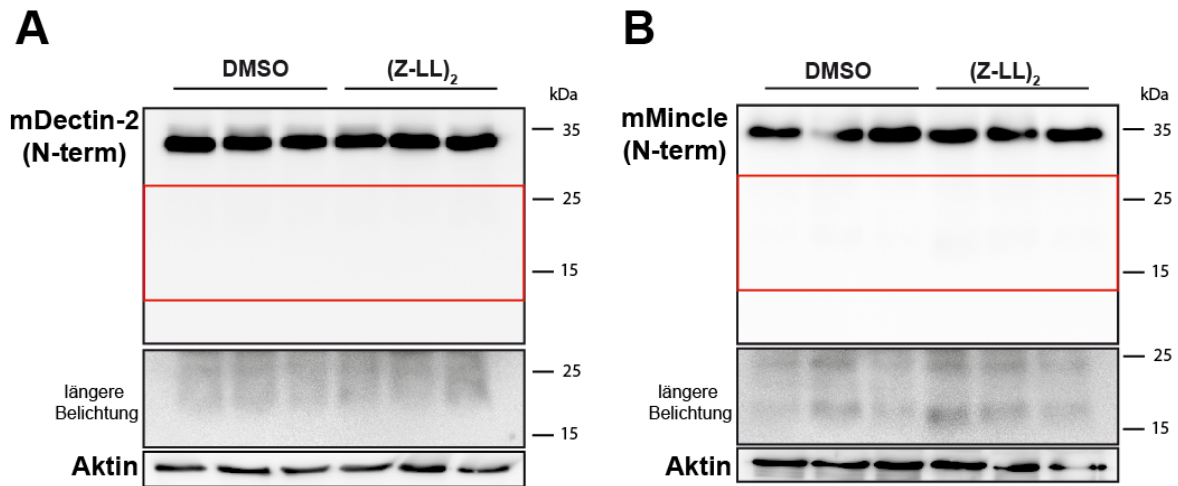


Abbildung 15: Analyse der Prozessierung von Dectin-2 und Mincle in HEK-Zellen

HEK Zellen wurden transient mit HA-mDectin-2 (A) oder HA-mMincle (B) transfiziert und für 6 Stunden mit DMSO oder 20 μ M (Z-LL)₂-Keton (ZLL) behandelt. HA-Dectin-2 und HA-Mincle wurden mit einem HA-Antikörper im Western Blot detektiert.

Zunächst wurden HEK-Zellen mit HA-mDectin-2 (Abbildung 15 A) oder HA-mMincle (Abbildung 15 B) transfiziert und mit DMSO oder ZLL behandelt, um eine mögliche Prozessierung durch SPPL2-Proteasen zu inhibieren. In beiden Ansätzen konnten nur nach langer Belichtungszeit dezente N-terminalen Fragmente (NTF) nachgewiesen werden, obwohl prominente Banden für die jeweiligen Volllänge-Rezeptoren beobachtet werden konnten. Auch eine Applikation von ZLL führte zu keiner Veränderung der jeweiligen Volllänge-Proteine oder einer NTF-Akkumulation. Somit konnte für beide Rezeptoren keine Prozessierung unter Überexpression in humanen Standard-Zelllinien beobachtet werden. Bevor die Schlussfolgerung gezogen werden konnte, dass diese Proteine demnach keine Substrate der Proteasen darstellen, musste zunächst der intrazelluläre Transport der Proteine an ihren Determinationsort: der Zellmembran untersucht werden. Diese Überlegung wurde dadurch gestützt, dass für Dectin-1 die Ligandenbindung an der Zelloberfläche ein starker Aktivator für eine Prozessierung darstellt, und somit die korrekte Lokalisation essenziell für die Analyse der Prozessierung von Intramembranproteinen zu sein scheint [66]. Um den Transport der Proteine an die Plasmamembran in den verwendeten humanen Zelllinien nachzuvollziehen, wurde die subzelluläre Lokalisation von HA-mDectin-2 und HA-mMincle in HeLa-Zellen mittels Immunfluoreszenz überprüft (siehe Abbildung 16).

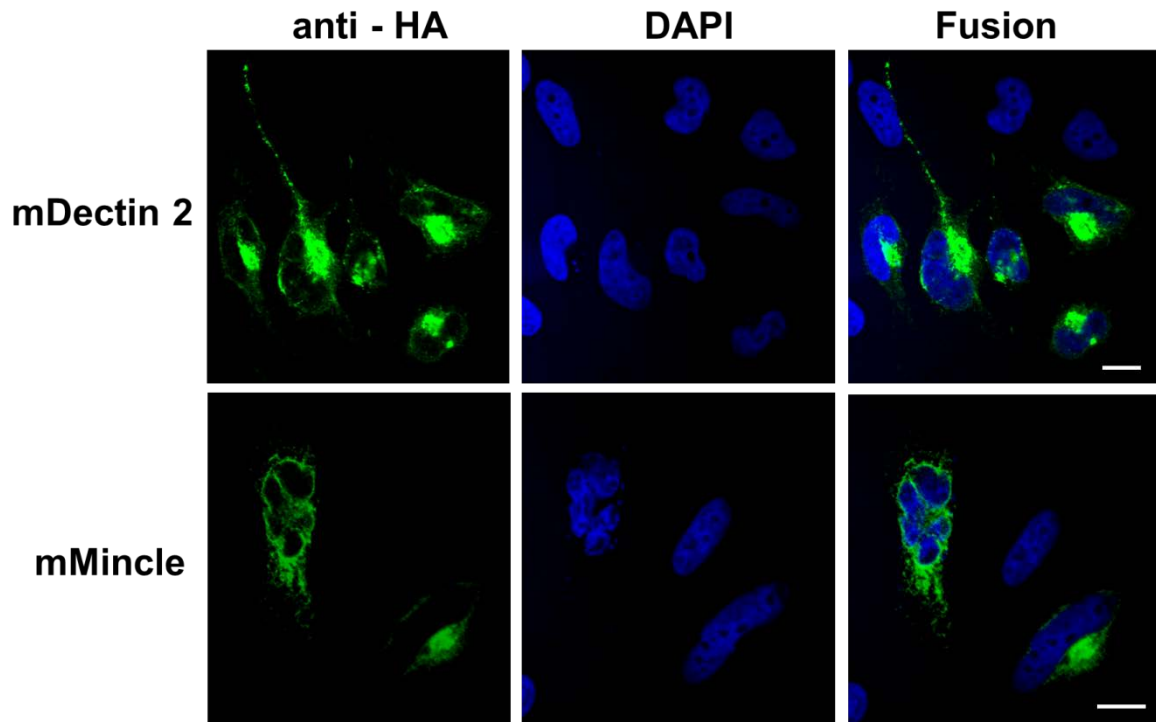


Abbildung 16: HA-mDectin-2 und HA-mMincle werden in HeLa-Zellen nicht an der Zelloberfläche exponiert

HeLa-Zellen wurden auf Deckgläser ausgesät und mit HA-mDectin-2 oder HA-mMincle transient transfiziert. Mithilfe der indirekten Immunfluoreszenz wurden nach Fixierung der Zellen die Fusionsproteine mit einem Antikörper gegen das HA-Epitop und einem Alexa488-konjugierten Zweitantikörper detektiert. Die Zellkerne wurden mittels 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) angefärbt. Maßstab $\approx 10 \mu\text{m}$.

Die immunzytochemischen Färbungen zeigten eine starke intrazelluläre Akkumulation der exprimierten Proteine in perinukleären Kompartimenten sowohl von Dectin-2 als auch Mincle. In dem gewählten FcR γ -defizienten HEK293T-Zellsystem konnte keine Oberflächenlokalisierung der beiden CTLRs festgestellt werden. Diese Oberflächenlokalisierung ist jedoch obligat, um eine mögliche Prozessierung durch SPPL2a und SPPL2b zu identifizieren, da SPPL2b in der Plasmamembran und SPPL2a im endolysosomalen System anzutreffen sind. Eine intrazelluläre Akkumulation der Rezeptoren würde eine Interaktion mit den Proteasen verhindern. Sowohl für Dectin-2 als auch für Mincle wird eine Bindungsstelle mit dem *fragment crystallisable receptor* (FcR γ) beschrieben. Diese ermöglicht mit einem ITAM-Motiv die Signaltransduktion nach erfolgter Ligandenbindung [86, 90]. Auch wird, zumindest für Mincle, eine Interaktion mit MCL beschrieben [98], durch die auch MCL über FcR γ Signaltransduktionskaskaden initiieren kann. Essentiell für die Funktion der CTLRs, kann die Bindung an FcR γ auch eine entscheidene Rolle für den korrekten Transport der Proteine spielen. So wurde für Dectin-2 und Mincle beschrieben, dass ohne eine Koexpression des FcR γ oder im Falle von Mincle

auch von MCL, keine Oberflächenlokalisation der CTLRs möglich ist [90, 98]. Mit dem HEK-Zellsystem wird eine humane Zelllinie verwendet, bei der unklar war, ob sie FcR γ und MCL exprimiert. Resultierend aus dieser Überlegung wurde, ähnlich dem von Lobato-Pascual et al. [98] beschriebenen Verfahren, eine Ko- bzw. Tripletransfektion mit entsprechenden Konstrukten codierend für murines FcR γ sowie MCL durchgeführt. Dafür wurde FcR γ mit einem C-terminalen V5-Epitop und MCL mit einem C-terminalen myc-Epitop versehen.

Da es sich bei den CTLRs um Rezeptoren handelt, die pathogenspezifische Liganden binden können, wurde zusätzlich zur Koexpression weiterer Proteine die Bedeutung von Liganden für die Oberflächenlokalisation einbezogen. So soll die Präsenz spezifischer Liganden die Oberflächenlokalisation sowohl von Mincle als auch von Dectin-2 [67, 135, 136] beeinflussen. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind noch nicht gänzlich untersucht eine erhöhte Oberflächenlokalisation konnte aber sowohl für Mincle als auch für Dectin-2 in Experimenten gezeigt werden [135, 137, 138]. Für Mincle wurde beschrieben, dass die zugrunde liegende Signalkaskade durch die Toll-like Rezeptoren (TLR) und insbesondere über das Protein *Myeloid differentiation primary response 88* (MyD88) induziert wird [138, 139]. Demnach ist anzunehmen, dass eine inflammatorische Primärantwort eine weitere Rekrutierung passender Rezeptoren zu induzieren vermag. Bei dem verwandten Dectin-1 Rezeptor hingegen konnte gezeigt werden, dass dieser nach Ligandenbindung internalisiert und lysosomal degradiert werden kann. Dies führt demnach nicht zwangsläufig zu einer erhöhten Oberflächenlokalisation, aber zur verstärkten Bildung N-terminaler Fragmente (NTF) dieses Rezeptors. Diese sind, detektiert mittels des Westernblot Verfahrens, demnach als Indikator für eine stattgehabte Prozessierung zu werten.

Basierend auf diesen Ergebnissen sollte ein möglicher Einfluss der Bindung des Dectin-2 Liganden Zymosan und des Mincle-Liganden HKMT auf die Stabilität der Volllänge-Rezeptoren untersucht werden.

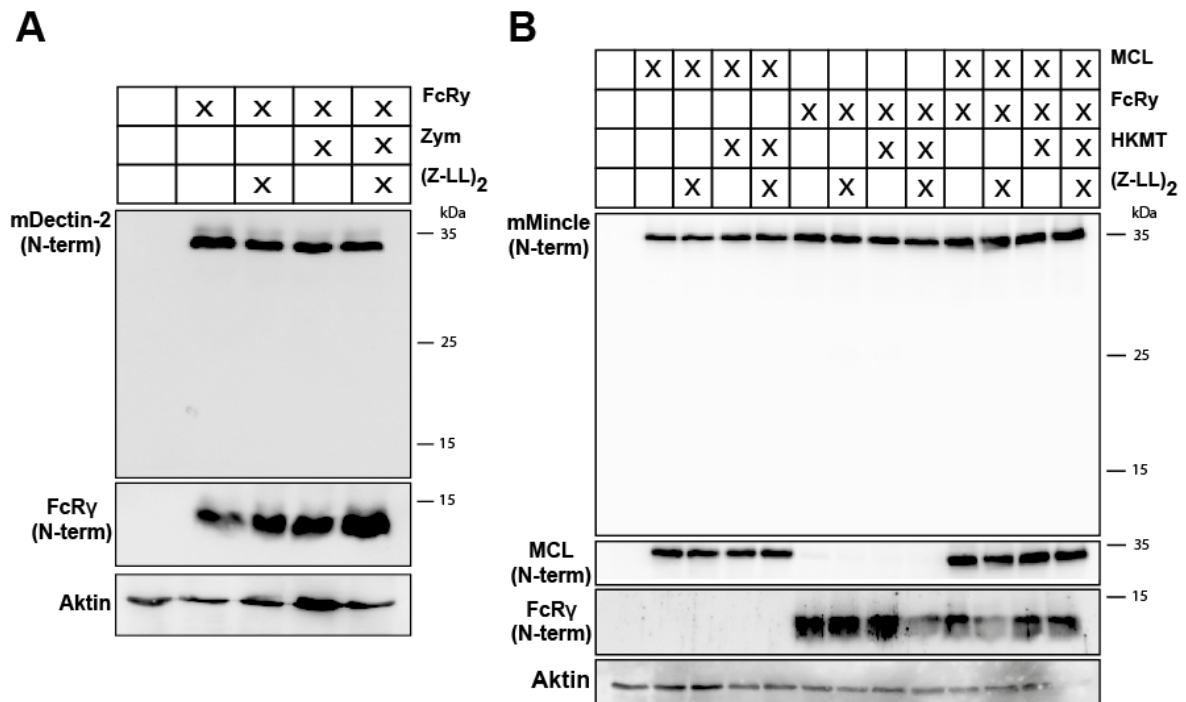


Abbildung 17: Unter Kotransfektion mit MCL und FcR γ erfolgt keine proteolytische Prozessierung von Dectin-2 und Mincle in HEK-Zellen

A: HEK293T Zellen wurden entsprechend der Beschriftung transient transfiziert und mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Zymosan sowie DMSO bzw. 40 μM (Z-LL) $_2$ -Keton (ZLL) behandelt. B: HEK Zellen wurden der Beschriftung folgend mit HA-mMincle, MCL-myc oder FcR γ -V5 transfiziert und mit 100 $\mu\text{g/ml}$ HKMT sowie DMSO bzw. 40 μM (Z-LL) $_2$ -Ketone (ZLL) behandelt. HA-Dectin-2 und HA-Mincle wurden in beiden Fällen mit einem HA-Antikörper im Western Blot detektiert, MCL-myc und FcR γ -V5 wurden mit Antikörpern gegen myc-, beziehungsweise V5-Epitop nachgewiesen. Dimethylsulfoxid (DMSO), Myeloid Leukemia Cell Differentiation Protein (MCL), Fc Rezeptor gamma (FcR γ), *Dendritic cell-associated C-type Lectin-2* (Dectin-2), *Macrophage inducible Ca $^{2+}$ -dependent Lectin Receptor* (Mincle)

Wie in Abbildung 17 ersichtlich, wurden HEK Zellen mit HA-mDectin-2 sowie FcR γ -V5 (A) oder HA-mMincle, MCL-myc und FcR γ (B) kotransfiziert und mit Liganden behandelt, für welche eine Bindung an diese Rezeptoren beschrieben wurde.

Auch in diesem Ansatz wurde keine deutliche Veränderung der Volllänge-Rezeptoren bei den verschiedenen Behandlungen festgestellt und es traten neben den Volllängenproteinen keine weiteren Banden auf, die mögliche NTFs repräsentieren könnten. In weiteren, hier nicht aufgeführten Ansätzen wurden unterschiedliche Konzentrationen der einzelnen Konstrukte zur Transfektion verwendet, um einen Mangel oder massiven Überschuss einzelner Proteine zu verhindern. Ferner wurden verschiedene Liganden eingesetzt, um eine eventuelle Oberflächenlokalisation der, potentiell in Vesikel gespeicherten, Proteine zu induzieren, und, sollten sich diese Rezeptoren wie Dectin-1 verhalten, eine Internalisierung und anschließende Prozessierung zu induzieren. Es konnte keine Veränderung der Banden in der Westernblot – Analyse beobachtet werden. So verbleiben die Möglichkeiten, dass

entweder (1) keine signifikante konstitutive oder liganden-abhängige Proteolyse der Rezeptoren stattfindet und somit keine Degradierungszwischenschritte in Form von NTFs zu detektieren sind, (2) keine adäquaten Liganden verwendet oder aber (3) eine suffiziente Oberflächenlokalisierung noch immer nicht erreicht wurde. Um (1) anzunehmen, müssen (2) und (3) ausgeschlossen werden. Dies zeigte sich für (2) als komplex. Eine Überlegung stellt dabei dar, die möglichen Liganden mittels eines Fluorophors zu markieren und eine Ko-Lokalisierung mittels Immunfluoreszenz zu überprüfen. Davon wurde aber im Rahmen dieser Arbeit abgesehen, zum einen in Anbetracht der Tatsache, dass in der Literatur die Liganden als geeignet beschrieben wurden, zum anderen, weil es auch für (2) essenziell ist, dass die Möglichkeit (3) untersucht und ausgeschlossen wird, da ohne Oberflächenlokalisierung auch keine externe Ligandenbindung möglich ist.

Aus diesem Grund wurde auch in den Ko- bzw. Tripletransfektionen die Oberflächenlokalisierung der Rezeptoren Dectin-2 und Mincle mittels Immunfluoreszenz überprüft, wie in Abbildung 18 dargestellt.

Da Zhu *et al.* aus dem Jahr 2013 beschrieben, dass Dectin-2 nicht nur mit FcR γ sondern analog zu Mincle auch mit MCL einen Komplex bildet [99], wurde auch bei Dectin-2 HeLa-Zellen mit allen entsprechenden Konstrukten, also Dectin-2, FcR γ und MCL, transfiziert (Abbildung 18). Aufgrund der verschiedenen Antikörperkombinationen konnte nur der zu untersuchende CTLR und FcR γ beziehungsweise MCL visualisiert werden.

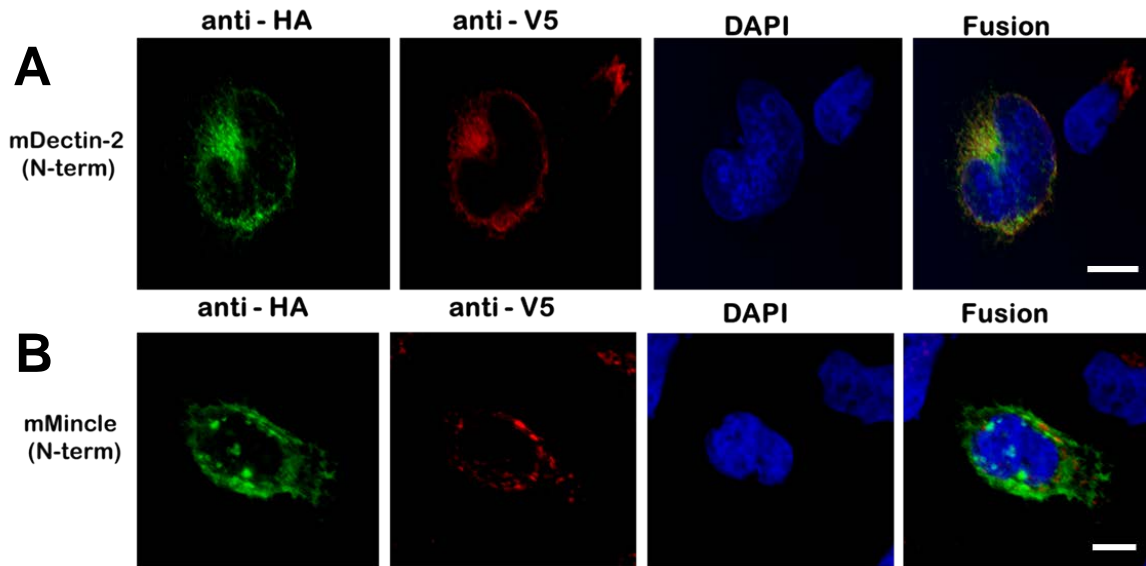


Abbildung 18: Die Kotransfektion mit MCL-myc und FcR γ -V5 bewirkt keine relevante Oberflächenlokalisierung von Dectin-2 und Mincle in HeLa-Zellen

HeLa-Zellen wurden auf Deckgläser ausgesät und mit (A) den Plasmiden für HA-mDectin-2, mFcR γ -V5 und mMCL-myc oder unter (B) mit HA-mMincle, mFcR γ -V5 und mMCL-myc transfiziert. Die HA- und V5-Antikörper wurden über sekundäre Fluorophor-gekoppelte Antikörper nachgewiesen. Jeder Ansatz wurde auf zwei Deckgläschen ausgesät und diese entweder mit Anti-HA und Anti-V5 oder mit Anti-HA und Anti-myc gefärbt, um die Lokalisation der jeweiligen Proteine nachzuweisen. Maßstab $\approx 10 \mu\text{m}$.

Bei diesen Versuchen wurde die zelluläre Verteilung der exprimierten Proteine mittels Immunfluoreszenz untersucht. Es zeigte sich sowohl für HA-mMincle als auch für HA-mDectin-2 weiterhin eine vornehmlich intrazelluläre Akkumulation (Abbildung 18). Zudem zeigt sich unter Berücksichtigung von FcR γ auch keine deutliche Ko-Lokalisation. Damit erscheint eine Komplexbildung nicht zu erfolgen und legt den Schluss nahe, dass weiterhin kein korrekter Transport in diesem zellulären Überexpressionssystem stattfindet.

Zur Quantifizierung des Einflusses von FcR γ und MCL auf die Oberflächenlokalisierung von Mincle und Dectin-2, wurden durchflusszytometrische Messungen durchgeführt, wie in Abbildung 19 gezeigt. Zu diesem Zweck wurden neue Konstrukte von Dectin-2 und Mincle erstellt, die zusätzlich zu dem N-terminalen HA-Epitop, ein FLAG-Epitop am C-terminalen, extrazellulärem Ende aufweisen, der bei Oberflächenlokalisierung extrazellulär präsentiert wird und so eine Durchflusszytometrie-Analyse möglich macht.

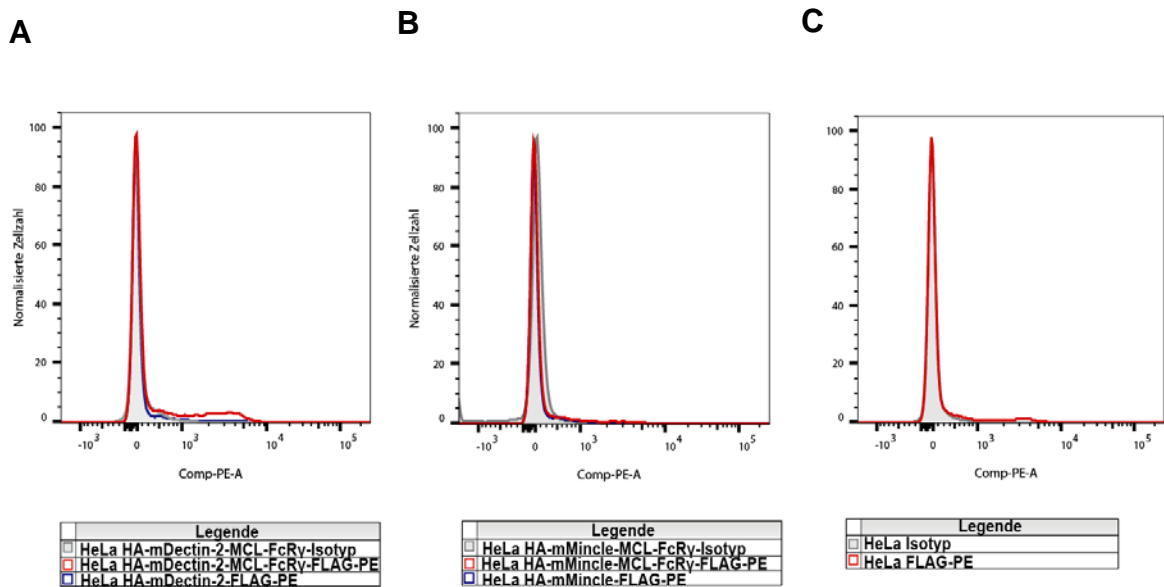


Abbildung 19: Fehlende Oberflächenlokalisierung von Dectin-2 und Mincle trotz Koexpression mit MCL und FcR γ

HeLa-Zellen wurden transient mit Expressionskonstrukten für HA-Dectin-2-FLAG (A) oder HA-Mincle-FLAG (B) sowie einem Leervektor (blaue Graphen) oder MCL und FcR γ (roter Graph) transfiziert. Nach dem Ablösen der Zellen wurden diese mit einem PE-gekoppelten FLAG-Antikörper inkubiert. Die Oberflächenlokalisierung der FLAG-getaggten Konstrukte wurde abschließend per Durchflusszytometrie validiert. Der graue Graph stellt die Isotyp-Kontrolle zum verwendeten Antikörper, welcher PE-gekoppelt ist, dar. Die Antikörper binden jeweils an das FLAG-Epitop, das an den C-Terminus der Proteine fusioniert ist.

HeLa Zellen wurden wie in Abbildung 19 A dargestellt mit HA-Dectin-2-FLAG mit dem Leervektor (blaue Linie in Abbildung 19 A) oder im Rahmen einer Tripletransfektion mit HA-mDectin-2, mFcR γ -V5 und mMCL-myc (rote Linie in Abbildung 19 A) transfiziert. In der Abbildung 19 B wurde ähnlich verfahren, jedoch mit Transfektion von HA-Mincle-FLAG anstelle von HA-mDectin-2-FLAG. Ähnlich wie in den bereits gezeigten Immunfluoreszenzen (Abbildung 18) konnte auch in diesem Setup keine signifikante Oberflächenlokalisierung der beiden CTLRs beobachtet werden, da in der Durchflusszytometrie mit den spezifischen Antikörpern kein deutlicher Unterschied zu den Isotypen-Kontrollen ermittelt wurde. Demzufolge ist anzunehmen, dass bei der Transfektion von Dectin-2 und Mincle in humanen Zelllinien, auch mit Koexpression anderer Proteine, kein messbarer Transport an die Plasmamembran erfolgt. Möglicherweise sind weitere, noch nicht identifizierte Proteine entscheidend an dem Transport von Dectin-2 und Mincle beteiligt, die in den verwendeten Zellsystemen nicht exprimiert werden.

3.2.2. Expression von Dectin-2 und Mincle in der murinen Makrophagenzelllinie J774.E

Basierend auf den bisher verwendeten Zellsystemen konnte keine endgültige Aussage über die Rolle von SPPL2a und SPPL2b bezüglich einer Prozessierung von Dectin-2 und Mincle getroffen werden, da dies einen Transport an die Plasmamembran voraussetzt.

Da die bislang einzigen bekannten Transportfaktoren für diese Rezeptoren, MCL und FcR γ , endogen in Immunzellen exprimiert werden, wurden verschiedene murine Zelllinien auf ihre Expression von MCL und FcR γ untersucht, um ein geeignetes Zellsystem für die Überexpression Epitop-markierter Dectin-2 und Mincle-Varianten zu identifizieren. Zu diesem Zweck wurde aus den B-Zelllinien WEHI und Bal17, sowie aus den Monozyten/Makrophagenzelllinien J774.E und RAW264.7 mRNA isoliert und diese mittels q-PCR auf die Expression von MCL und FcR γ untersucht.

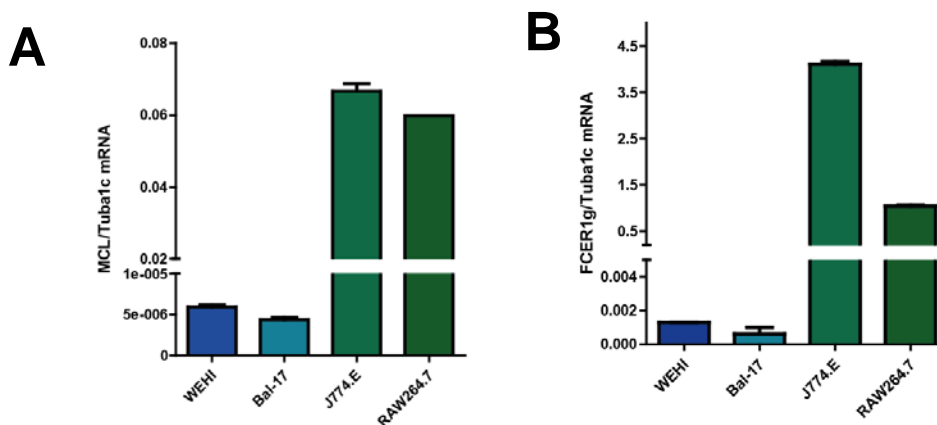


Abbildung 20: MCL und FcR γ werden verstärkt in myeloiden Zelllinien exprimiert

RNA wurde aus WEHI, Bal-17, J774.E und RAW264.7-Zellen isoliert und für die Synthese von cDNA verwendet. Die Expression von MCL (A) und FCER1g (B) wurden anschließend per qPCR quantifiziert und auf Tubulin Alpha 1c (Tuba1c) als Kontrolle normalisiert, indem die mRNA-Werte für die jeweiligen Proteine mit den Werten für Tubulin ins Verhältnis gesetzt wurden (y-Achse). Die Balken geben den Mittelwert \pm die Standardabweichung an, n = 2.

Die Analyse der RNA verschiedener myeloider und lymphoider Zelllinien zeigte deutliche Differenzen bezüglich der Expression der betrachteten Gene MCL und FcR γ (siehe Abbildung 20). So konnte in WEHI und Bal-17 Zellen eine Expression beider Gene nachgewiesen werden (siehe Abbildung 20). In RAW264.7-Zellen konnte eine 10.000-fach höhere Expressionsrate hinsichtlich MCL dokumentiert werden, jedoch zeigte sich bezüglich des Genes FCER1g eine geringere Expression als in J774.E-Zellen, welche eine 8.000-fach höhere Expression als Bal17-Zellen aufzeigte. Basierend auf diesen

Ergebnissen zeigte sich die Verwendung von J774.E Zellen für die geplanten Experimente als erfolgsversprechend.

Aufgrund der schlechten Transfizierbarkeit dieser Zelllinie mit Standardmethoden wurde ein Verfahren zur Generierung stabil HA-Dectin-2-FLAG oder HA-Mincle-FLAG exprimierender J774.E-Makrophagen mittels retroviraler Transduktion etabliert.

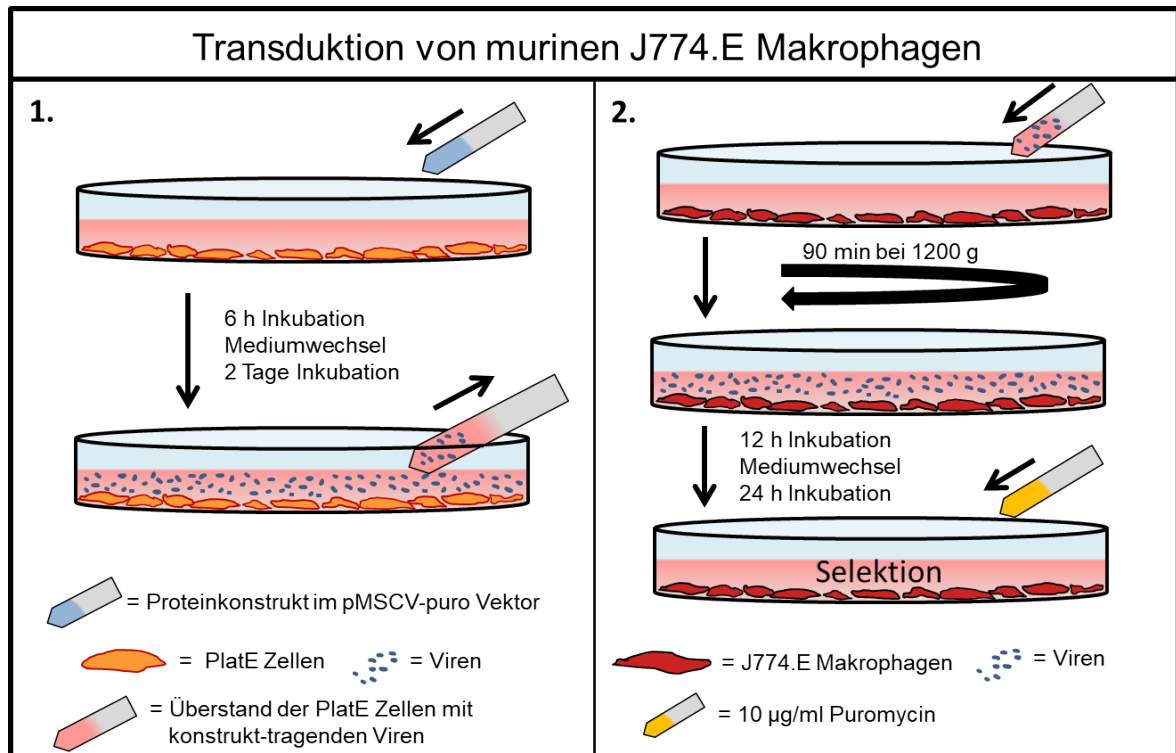


Abbildung 21: Stabile Transduktion muriner Makrophagen mithilfe von Viren

Die *Open Reading Frame*-Sequenzen, die für die Proteine HA-mDectin-2-FLAG sowie HA-mMincle-FLAG kodieren, wurden in den pMSCV-puro Vektor inseriert und mit diesen Plasmiden PlatinumE Zellen (PlatinumE) mithilfe von TurboFect transfiziert (1.). Nach sechs Stunden wurde das Medium gewechselt und die Zellen bei 37°C für zwei Tage inkubiert. Bei den PlatinumE Zellen handelt es sich um eine Verpackungszelllinie, welche die Herstellung von Viren ermöglicht. Die Viren verlassen die Zellen und reichern sich im Medium (= Überstand) an. Anschließend wurde der virushaltige Überstand abgenommen und auf die J774.E Makrophagen gegeben (2.). Diese wurden anschließend in Anwesenheit von 20 µg/ml Polybren bei 1200 g für 90 Minuten zentrifugiert und in dem, mit Viren versetzten, Medium für 12 Stunden inkubiert. Nach einem anschließenden Mediumwechsel sowie einem weiteren Tag Inkubation, wurde mit der Selektion der Zellen mithilfe von 10 µg/ml Puromycin begonnen.

Die für HA-mMincle-FLAG und HA-mDectin-2-FLAG kodierenden Sequenzen wurden in den pMSCV-puro Vektor umgesetzt, welcher zu dem gewünschten Konstrukt eine Reihe an Genen für ein replikationsunfähiges, nagerspezifisches Virus trägt. Dieser Vektor wurde in PlatinumE Zellen transfiziert, welche verschiedene, für die Assemblierung der Retroviren

erforderliche Proteine, stabil exprimieren. Die Viren, welche zudem in ihrem Erbgut die Information für HA-mDectin2-FLAG oder HA-mMincle-FLAG trugen, reichert sich im Medium der PlatinumE Zellen an und konnten mit den Zellkulturüberständen J774.E Makrophagen zugefügt werden. Die Viren gewährleisteten eine Integration der für die CTLRs kodierenden Sequenzen in das Genom der J774.E Zellen und ermöglichen so deren konstante Synthese.

3.2.2.1. Oberflächenlokalisierung von Dectin-2 und Mincle in transduzierten J774.E-Zellen

Basierend auf der oben beschriebenen Methode wurden J774.E-Zellen stabil mit HA-Dectin-2-FLAG und HA-Mincle-FLAG transduziert. Eine Oberflächenlokalisationsanalyse wurde anschließend mithilfe einer Durchflusszytometrie durchgeführt. Dabei wurde ein PE-gekoppelter FLAG-Antikörper verwendet, der an das extrazellulär zugängliche FLAG-Epitop oberflächenlokalisierter Rezeptoren binden kann.

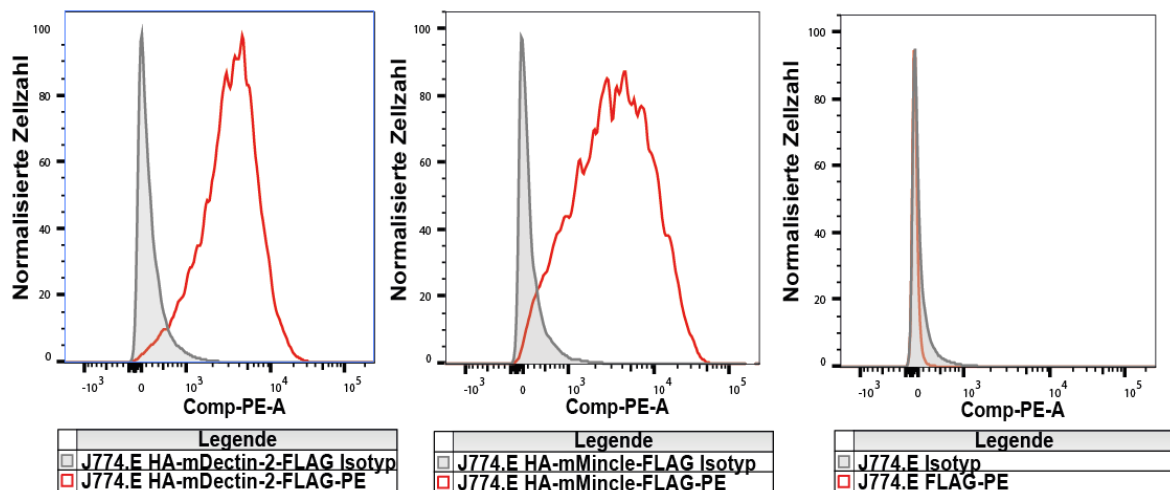


Abbildung 22: Dectin-2 und Mincle werden in J774.E Zellen an der Oberfläche exprimiert

J774.E Zellen wurden stabil mit Expressionskonstrukten für HA-Dectin-2-FLAG (A) oder HA-Mincle-FLAG (B) sowie einem Leervektor (C) transduziert. Nach dem Ablösen der Zellen wurden diese mit einem PE-gekoppelten FLAG-Antikörper inkubiert. Die Oberflächenlokalisierung der FLAG-getaggten Konstrukte wurde abschließend per Durchflusszytometrie validiert. Der rote Graph stellt jeweils das Signal des an den FLAG-Epitop bindenden Antikörpers dar, der graue Graph stellt die Isotyp-Kontrolle zum verwendeten Antikörper, welcher PE-gekoppelt ist, dar. Die Antikörper binden jeweils spezifisch das FLAG-Epitop, welches an den C-Terminus der Proteine fusioniert ist.

Wie in Abbildung 22 zu sehen, konnte diesmal durchflusszytometrisch eine Lokalisation von Dectin-2 und Mincle an der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Die roten Graphen in Abbildung 22 stellen die Signale des PE-gekoppelten FLAG-Antikörpers dar, welcher spezifisch an die Fusionsproteine HA-Dectin-2-FLAG beziehungsweise HA-Mincle-FLAG bindet. Als Kontrollprobe wurde eine, mit einem Leervektor stabil transduzierte, J774.E Zelllinie verwendet. So kann ausgeschlossen werden, dass die verwendeten Antikörper unspezifisch an J774.E Zellen binden. Eine Verifizierung der Selektivität der verwendeten fluoreszierenden Moleküle wurde durch die Isotyp-Kontrolle gewährleistet, welche in Abbildung 22 als roter Graph dargestellt wurde. In den erzeugten Zelllinien kann ein Transport von Dectin-2 und Mincle an die Plasmamembran, wie er für die endogenen Proteine beschrieben ist, beobachtet werden. Damit eignet sich dieses Zellsystem für die Analyse der proteolytischen Degradierung.

3.2.2.2. Prozessierung von Dectin-2 und Mincle in J774.E-Makrophagen

Die Prozessierung von Dectin-2 und Mincle wurde anhand von Westernblot-Analysen untersucht. Dabei wurden die stabil mit dem jeweiligen Konstrukt transduzierten J774.E Makrophagen nach der jeweiligen Behandlung lysiert.

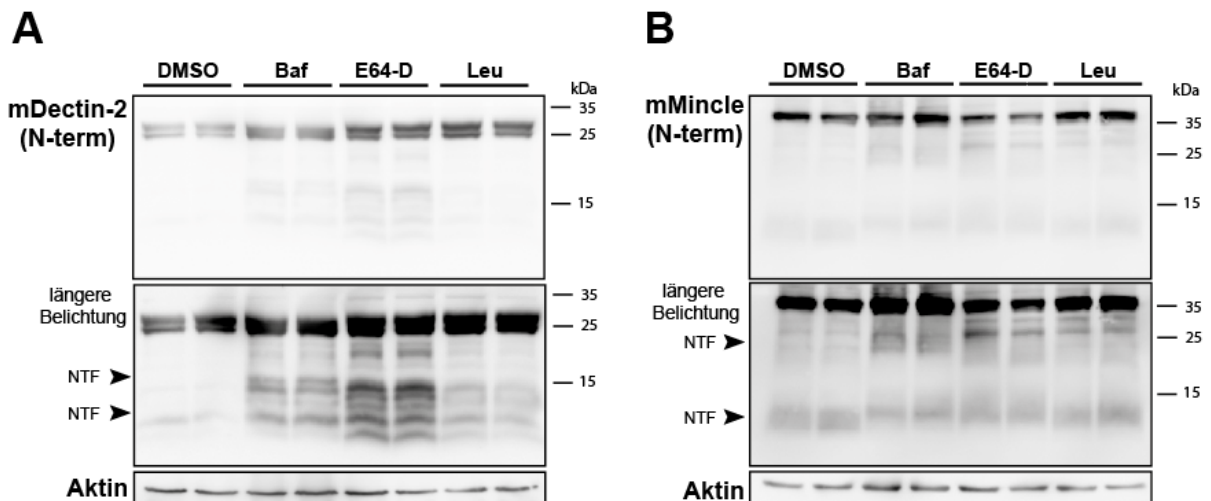


Abbildung 23: In endolysosomalen Kompartimenten werden NTFs von mDectin-2 (A) als auch die NTFs von mMincle (B) generiert
 J774.E Zellen wurden stabil mit HA-mDectin-2-FLAG (A) oder HA-mMincle-FLAG (B) transduziert und mit DMSO, 100 nM Bafilomycin a1, 40 μ M E64-D oder 100 μ M Leupeptin für 6 h behandelt. Die Prozessierung von HA-Dectin-2 und HA-Mincle wurde im Western Blot mit einem HA-Antikörper nachgewiesen.

Wie in Abbildung 23 zu sehen, zeigten sich in den stabil exprimierenden J774.E-Zellen neben den Volllängerezeptoren sowohl für Dectin-2 als auch für Mincle schwache NTF Banden unterschiedlicher Größe, die somit potenzielle Substrate für SPPL2-vermittelte Intramembranproteolyse darstellen und als Marker für einen Prozess der konstitutiven Prozessierung zu werten sind. Diese kontinuierliche Prozessierung wurde mithilfe von Inhibitoren verschiedener zellulärer Proteasen untersucht (A). Zu diesem Zweck erfolgte die Behandlung der stabil mit HA-Dectin-2-FLAG oder HA-Mincle-FLAG transduzierten J774.E-Makrophagen mit den Inhibitoren Bafilomycin, E64-D und Leupeptin für jeweils 6 Stunden mit nachfolgender Western Blot-Analyse (siehe Abbildung 23). Bafilomycin interagiert als Inhibitor des lysosomalen Systems, in dem die Substanz die H⁺-ATPase der Vesikel inhibiert und demnach die Entwicklung des für die lysosomale Prozessierung essentiellen niedrigen pH-Wertes stört. E64-D ist ein membranpermeables Ethyl Ester des Inhibitors E-64-c, welcher lysosomal Cystein-Proteasen inhibiert. Leupeptin inhibiert ebenfalls Cystein- sowie eine Reihe von Serin-Proteasen. Als Kontrolle wurde DMSO verwendet, das als Lösungsmittel der Inhibitoren diente.

In der Westernblot-Analyse wurde sowohl für Dectin-2 als auch für Mincle bei Applikation von Bafilomycin sowie mit E-64D eine dezente Akkumulation oder Stabilisierung der jeweiligen Volllänge-Proteine sichtbar (siehe Abbildung 23). Desweiteren wurden multiple NTFs von Dectin-2 in Anwesenheit von Bafilomycin sowie E-64D detektiert, was ein Indiz für eine alternative Prozessierung mit Darstellung der einzelnen Prozessierungsschritte darstellt. Bei Mincle fiel durch die Behandlung mit Bafilomycin eine Variation in der Größe des NTFs auf, so ist anzunehmen, dass bei Störungen des endolysosomalen Systems eine alternative Prozessierung einsetzt. Generell deuten diese Daten daraufhin, dass endo- und lysosomale Proteasen eine Rolle bei der Generierung und des Abbaus der NTFs sowohl von Dectin-2 als auch Mincle einnehmen.

Wie bereits an anderer Stelle erwähnt, konnte für Dectin-1 eine ligandenabhängige Internalisierung gezeigt werden. Daher bestand die Möglichkeit, dass, analog zu dem verwandten Dectin-1-Rezeptor, die Ligandenbindung und die damit potenziell einhergehende Internalisierung entscheidend für die Prozessierung der CTLRs sein könnte. Aus diesem Grund wurden die Zellen mit verschiedenen Liganden der beiden Rezeptoren behandelt (siehe Abbildung 24).

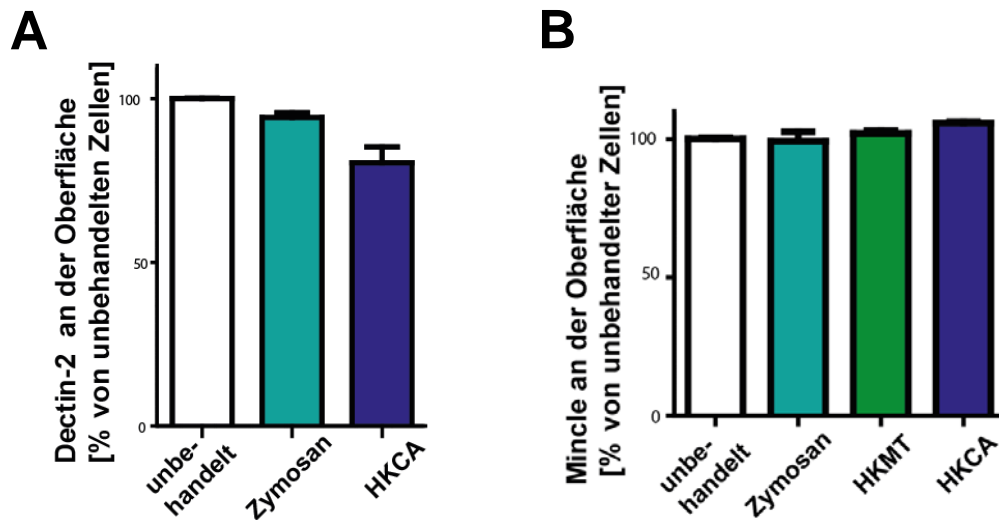


Abbildung 24: Mittels FACS-Analysen konnte bei mDectin-2 (A) und mMincle (B) nach Ligandenexposition keine ausgeprägte Internalisierung beobachtet werden

Die transduzierten Zellen wurden entweder für jeweils eine Stunde mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Zymosan, 100 $\mu\text{g/ml}$ HKMT oder HKCA (MOI = 10) behandelt. Die PE-gekoppelten Antikörper binden jeweils an den FLAG-Epitop, mit welchem die Proteine C-terminal markiert sind. Die Balken geben den Mittelwert der Oberflächenlokalisation in Abhängigkeit der unbehandelten Kontrolle der jeweiligen Proteine in Prozent als Mittelwert wieder \pm Standardabweichung, n = 2.

In Abbildung 24 wurden die transduzierten Zellen für eine Stunde mit verschiedenen Liganden behandelt und anschließend per Durchflußzytometrie auf eine Oberflächenlokalisation von Dectin-2 und Mincle hin analysiert. Es wurde ein PE-gekoppelter Antikörper gegen das C-terminalen FLAG-Epitop verwendet, wodurch die Spiegel der an der Zelloberfläche lokalisierten Proteine quantitativ bestimmt werden konnte. Dabei konnte keine signifikante Reduktion der Oberflächenlokalisation bei Präsenz der Liganden beobachtet werden, wobei eine Tendenz im Sinne einer reduzierten Oberflächenlokalisation, bei Dectin-2, nach HKCA-Behandlung sichtbar wurde (siehe Abbildung 24 A).

3.2.2.3. SPPL2-Proteasen beeinflussen den Abbau der NTFs von Dectin-2 und Mincle

Um die Relevanz von SPPL2a und SPPL2b für die Prozessierung von N-terminalen Fragmenten von Dectin-2 und Mincle nach der erfolgreichen Etablierung eines geeigneten Zellsystems zu untersuchen, wurde zunächst die Expression beider Proteasen in J774.E Makrophagen überprüft.

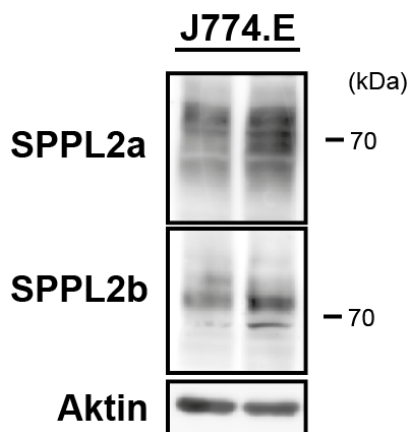


Abbildung 25: J774.E Makrophagen exprimieren SPPL2a und SPPL2b

J774.E Makrophagen wurden lysiert und mithilfe von spezifischen Antikörpern die endogenen SPPL2a- oder SPPL2b-Proteine nachgewiesen.

Unter Verwendung spezifischer gegen SPPL2a oder SPPL2b gerichteter Antikörper konnte mittels Westernblot eine mögliche Expression dieser beiden Proteasen in J774.E-Zellen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 25). Dies ermöglicht die Verwendung von ZLL zur Inhibierung der endogenen SPPL Proteasen und eine anschließende Analyse der Prozessierung der beiden zu untersuchenden CTLRs.

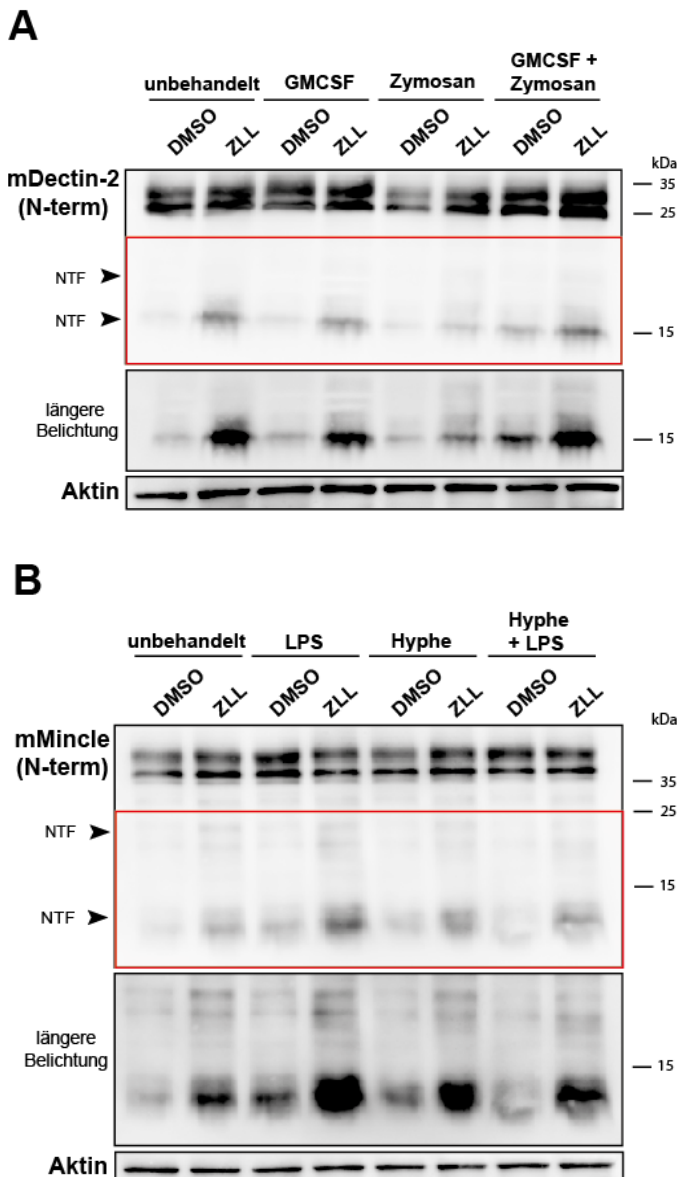


Abbildung 26: Die Prozessierung von Dectin-2 und Mincle wird durch den Inhibitor ZLL beeinflusst

A: J774.E Makrophagen wurden stabil mit HA-mDectin-2-FLAG transduziert und für 16 h mit 20 µg/ml GMCSF behandelt. 6,5 h vor Ablauf der 16 h erfolgte die Hinzugabe von DMSO oder 40 µM ZLL. 6 h vor Ablauf der 16h, also 10h nach initialem Behandlungsbeginn wurden die Zellen zudem mit dem Liganden Zymosan (50 µg/ml) behandelt.

B: J774.E Makrophagen wurden stabil mit HA-mMincle 2-FLAG transduziert und für 16 h mit 500 ng/ml LPS behandelt. 6,5 h vor Ablauf der 16 h erfolgte die Hinzugabe von DMSO oder 40 µM ZLL. 6 h vor Ablauf der 16h, also 10h nach initialem Behandlungsbeginn wurden die Zellen zudem mit dem Liganden *Heat-killed C. albicans* Hyphen (1:10) behandelt.

Die Prozessierung von HA-Dectin-2 und HA-Mincle wurde im Western Blot mit einem HA-Antikörper nachgewiesen. Zur Kontrolle des Proteinauftrags wurde Aktin detektiert.

Der Aufbau der Versuche erfolgte bei der Verwendung der beiden stabil transduzierten Makrophagenzelllinien gleich. Die Zellen wurden mit verschiedenen Liganden der beiden Rezeptoren behandelt (siehe

Abbildung 26). So wurde in dem hier exemplarisch dargestellten Versuch für Dectin-2-exprimierende Makrophagen Zymosan, eine Zellwandpräparation aus *S. cerevisiae* (A), sowie für Mincle hitze-inaktivierte Hyphen des pathogenen Pilz *Candida albicans* (Daniel Fischer, Jena) (B), verwendet. Dieser Versuchsaufbau wurde für eine Variation an beschriebenen, sowie möglichen neuen Liganden durchgeführt (siehe Anhang). So wurde bei Dectin-2 neben Zymosan auch Hitze-inaktiverter *Candida albicans* (HKCA), Hitze-inaktivertes *Mycobacterium tuberculosis* (HKMT), Mannan und die bereits erwähnten

Candida albicans-Hyphen und -Hefen (Jena), jeweils in verschiedenen Konzentrationen, verwendet. Auch Mincle-exprimierende Zellen wurden gleich dem Ansatz in Abbildung 26 mit beschriebenen, sowie potentiellen Liganden verschiedener Konzentrationen untersucht. Hierbei kamen ein lebender, gering virulenter *Mycobacterium tuberculosis* – Stamm (BCG), sowie HKCA, HKMT, TDB, frische *Candida albicans* Hyphen und Hefen und Zymosan zum Einsatz.

Ein weiterer Ansatz, welcher ebenfalls in

Abbildung 26 dargestellt ist, birgt der Versuch, 16 Stunden vor Ligandenexposition eine Aktivierung der Zellen mit Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor (GMCSF) oder Lipopolysacchariden (LPS) zu induzieren, welches zu einer vermehrten Oberflächenlokalisierung sowohl von Mincle als auch Dectin-2 führen soll [67, 69, 135, 140] und SPPL2s hochregulieren könnte. Dectin-2- oder Mincle-exprimierende Zellen wurden in verschiedenen Versuchen mit GMCSF oder LPS vorbehandelt und anschließend mit ZLL oder DMSO sowie mit verschiedenen Liganden behandelt, sodass ZLL/DMSO für 6,5 Stunden und die verschiedenen Liganden für 6 Stunden im Nährmedium anwesend waren. Um die Rolle der SPPLs bei einer möglichen Spaltung von Dectin-2 und Mincle zu analysieren, wurden die transduzierten Zellen, wie in der Beschriftung (Abbildung 26) dargestellt, entweder mit ZLL oder als Kontrolle mit DMSO behandelt, um eine Inhibition der SPPL zu induzieren und eine potentielle Relation zwischen der Aktivität der SPPLs und der Signalstärke des NTF zu untersuchen. Anschließend wurden jeweils die Volllänge- und NTF-Level zwischen behandelten und unbehandelten Zellen untersucht. Sowohl bei Behandlung mit GMCSF als auch LPS zeigte sich keine Veränderung des Volllängenproteins. Jedoch scheint die Behandlung mit LPS zumindest bei Mincle dessen Prozessierung deutlich zu erhöhen (siehe Abbildung 26). GMCSF hingegen zeigte keine signifikanten Modulationen im Degradierungsprozess.

In den

Abbildung 26 und 20 wird dargestellt, dass sowohl bei mDectin-2 als auch bei mMincle keine ligandenabhängige signifikante Reduktion der Volllängerezeptoren beobachtet werden konnte, was darauf hindeutet, dass im Gegensatz zu Dectin-1 keine Internalisierung der Rezeptoren stattfindet. Die NTF-Konzentrationen stellten sich bei Anwesenheit eines geeigneten Ligandes prominenter dar. Deutlich wurde dieses beispielsweise bei Mincle nach Verwendung von hitze-inaktivierten Hyphen des pathogenen Pilz *Candida albicans*. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass eine partielle Degradierung nach Ligandenbindung induziert wurde, jedoch war auch hier keine klare Veränderung der Volllängerezeptoren zu verzeichnen.

Eine deutliche Modifikation in Bezug auf die Prozessierung konnte hingegen bei Behandlung mit ZLL beobachtet werden. Es zeigte sich bei Anwesenheit des SPPL2a/b-Proteaseinhibitors ZLL eine deutliche Signalverstärkung der NTF-Banden. Das impliziert eine SPPL2-abhängige Degradierung der NTFs von Dectin-2 und Mincle und etabliert diese Proteine zumindest unter den getesteten Überexpressionsbedingungen als neue Substrate dieser Intramembranproteasen.

3.2.3. Einfluss der Proteasen SPPL2a und SPPL2b auf die Funktion der Rezeptoren Dectin-2 und Mincle

In der Literatur wurden in Dectin-2- oder Mincle-defizienten Mausmodellen eine kompromittierte Antwort des Immunsystems in Anwesenheit von Liganden für diese Rezeptoren beschrieben [59, 63, 77, 93, 141-143]. Da keine direkte Internalisierung der Rezeptoren Dectin-2 und Mincle beobachtet werden konnte (Abbildung 24), wurde, zur Einschätzung der Auswirkungen von Dectin-2 und Mincle, vor allem bei gestörter Proteolyse durch Fehlen von SPPL2a und 2b, die Induktion einer Signaltransduktion anhand zweier Modellsysteme untersucht.

Für die Versuche wurden Wildtypmäuse und Tiere, welche sich mit einem Knockout der Gene für die Proteasen SPPL2a und SPPL2b (Doppelknockout, dKO) auszeichnen, verwendet. Nach Gewinnung von, aus dem Knochenmark differenzierten dendritischen Zellen (BMDC) sowie Makrophagen (BMDM) und Peritonealmakrophagen wurde deren Reaktion nach Stimulation der C-typ Lektin Rezeptoren, wozu auch Dectin-2 bzw. Mincle gehören, mit passenden Pathogenen analysiert. Dabei muss darauf hingewiesen werden, dass keine spezifischen Liganden für diese beiden Rezeptoren bekannt sind und so eine Verwendung der Liganden immer bedeutet, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit alle Rezeptoren der CTL-Familie beteiligt sind. Gemessen wurden hierfür die Produktion Reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) sowie die Bildung verschiedener Zytokine.

3.2.3.1. SPPL2-Expression wird durch Behandlung mit Liganden erhöht

Ob die Anwesenheit von Pathogenen Einfluss auf die Expression von SPPL2a und 2b ausübt, kann mithilfe eines Assays zur Detektion endogener SPPL2a und 2b Expression, erfolgen. Dieser Ansatz stellt eine indirekte Interpretation der intrazellulären Signaltransduktion dar, welcher sich dann auf Ebene der Proteinexpression manifestiert.

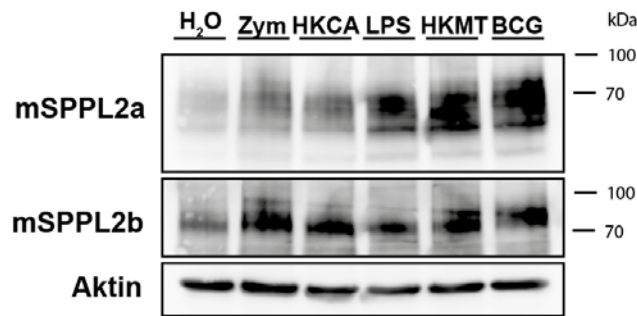


Abbildung 27: CTLR- und TLR-Liganden beeinflussen die Expression von SPPL2 Proteasen

Aus dem Knochenmark von C57BL/6 Mäusen wurden BMDMs differenziert und für 24 Stunden mit 50 µg/ml Zymosan (Zym), Hitze-inaktiviertem *Candida albicans* (MOI = 10), 500 ng/ml LPS, 50 µg/ml Hitze-inaktiviertem *Mycobacterium tuberculosis* (HKMT) sowie lebenden, gering virulenten *Mycobacterium tuberculosis* Bacille Calmette-Guérin (BCG) (MOI = 30) behandelt.

Dafür wurden BMDMs unter 24-stündiger Anwesenheit von Zymosan, HKCA, LPS HKMT und BCGs inkubiert und anschließend per Westernblot-Analyse auf die Expression von SPPL2a und SPPL2b untersucht. Es konnte eine deutliche Zunahme der Bandenintensität bei Behandlung mit den verschiedenen Liganden beobachtet werden, wobei die Zugabe der Mykobakterien den stärksten Effekt zeigte. Somit konnte eine Hochregulation der Intramembranproteasen durch die getesteten CTLR- und TLR-Liganden festgestellt werden, was auf eine funktionelle Bedeutung dieser Proteasen bei der Immunantwort auf die verwendeten Liganden hindeutet.

3.2.3.2. Die Bildung von Reaktiven Sauerstoffspezies wurde von SPPL2a und 2b nicht beeinflusst

Zur Abwehr pathogener Keime dienen dem Organismus neben der Aufnahme dieser in phagozytierende Zellen des Immunsystems auch die Generierung von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Als ROS werden all jene instabilen Metabolite des Sauerstoffmoleküls (O_2) bezeichnet, welche aufgrund ihrer hohen Reaktivität verschiedenste Interaktionen eingehen können, zu denen auch die mit pathogenen Erregern zählen [144].

Da bei Kontakt mit vielen Pathogenen eine ROS-Aktivierung in verschiedenen Immunzellen beschrieben wurde und Mincle und Dectin-2 damit in Verbindung gebracht wurden [145], sollte ermittelt werden, inwiefern SPPL2-Proteasen diese Reaktionen modifizieren können.

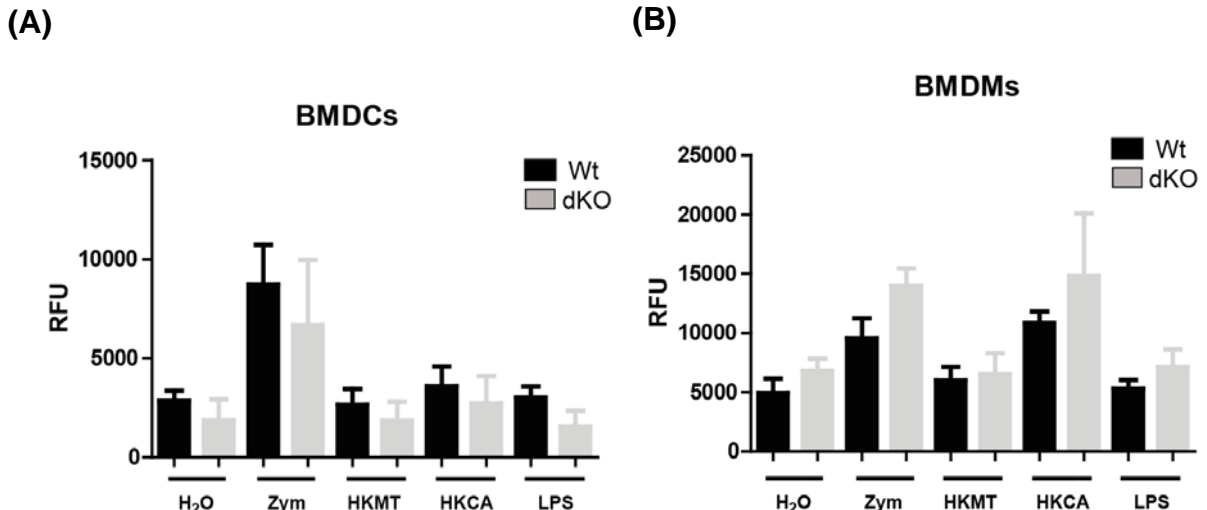


Abbildung 28: Defizienz für SPPL2a/b hat keinen Einfluss auf die Generierung von ROS

Wildtyp (Wt) und SPPL2a/b doppel-defiziente (dKO) BMDCs (A) bzw. BMDMs (Bone marrow derived macrophages) (B) wurden für 45 Minuten mit DCF-DA behandelt und anschließend mit 50 µg/ml Zymosan (Zym), Hitzeinaktiviertem *Candida albicans* (HKCA, MOI = 10), 100 µg/ml Hitzeinaktivierten *Mycobacterium tuberculosis* (HKMT) oder 0,5 µg/ml Lipopolysaccharide (LPS) behandelt und die ROS-Entwicklung über 120 Minuten gemessen.

Die Balken unter A und B stellen die relative Fluoreszenz-Einheiten (RFU) von n = 3 Experimenten als Mittelwert ± Standardabweichung dar.

Es wurde 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) als Indikator der ROS verwendet. Durch die Inkubation der jeweiligen Zellen mit DCF-DA diffundiert dieses in die Zellen und wird durch eine intrazelluläre Esterase deacetyliert, wodurch es seine membranpermeablen Eigenschaften verliert und nicht-fluoreszierend in den Zellen verbleibt. Bei Ligandenabhängiger Synthese von ROS kommt es zur Reaktion mit dem Indikator, wodurch dieser zu einer fluoreszierenden Verbindung oxidiert wird.

Es konnte, abhängig von den verwendeten Zelltypen, eine signifikante Produktion von ROS nach Zugabe von Zymosan und bei den BMDMs auch von HKCA festgestellt werden (siehe Abbildung 28), wodurch die Funktionalität der Methode generell validiert werden konnte. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp und doppeldefizienten Zellen, wobei die Tendenz einer verringerten ROS-Produktion bei dKO BMDCs im Vergleich zu Wildtyp BMDCs bei allen verwendeten Liganden und der Wasserprobe auffiel (siehe Abbildung 28 A). Auch die Analyse der ROS-Produktion in den Makrophagen ließ eine leichte Variation zwischen SPPL2a und SPPL2b-defizienten und Wildtyp-Zellen im Sinne einer vermehrten ROS-Synthese erkennen (siehe Abbildung 28 B). Allerdings waren die Werte der produzierten ROS zwischen den Zellen der einzelnen Mäuse in der Wildtyp-beziehungsweise Doppelknockoutgruppe variabel, sodass keine klare Interpretation möglich war.

3.2.3.3. Zytokinantworten von murinen Primärzellen bei Exposition mit Liganden für CTLRs

Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) bietet eine Möglichkeit der quantitativen Bestimmung von sezernierten Zytokinen nach deren Ausschüttung durch Immunzellen. Neben der Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies reagieren Immunzellen auch mit der Ausschüttung von Zytokinen auf den Kontakt mit verschiedenen Pathogenen. Da die Westernblotdaten eine Degradierung der NTFs sowohl von Dectin-2 als auch Mincle durch die Proteasen SPPL2a und SPPL2b belegen, wurden Versuche geplant, bei denen die Zytokinausschüttung verschiedener Immunzellen nach Stimulation der beiden CTLRs in Abhängigkeit von der Anwesenheit von SPPL2a und SPPL2b analysiert werden sollte. Im Rahmen dieser Experimente wurden die Konzentrationen verschiedener Zytokine in den Zellkulturüberständen muriner BMDMs, BMDCs und Peritonealmakrophagen gemessen. Die Immunzellen wurden nach Vollendung der Differenzierungsphase mit den bereits beschriebenen CTLR-Liganden behandelt. Wie auch bei der Westernblotanalyse wurde Zymosan, HKMT, HKCA, *Mycobacterium tuberculosis*, *Candida albicans* Hefen und Hyphen und LPS in das Kulturmedium gegeben und diese Nährmedien nach 24 Stunden gesammelt und aufbereitet. In einem weiteren Ansatz wurden die Zellen zunächst für 16 h mit 500 ng/ml LPS behandelt, um die Expression von SPPL2a und SPPL2b sowie der jeweiligen Rezeptoren zu induzieren, bevor mit den bereits erwähnten Liganden stimuliert wurde. Mittels ELISA wurden diese Überstände auf die Zytokine TNF α , IL-1 β , IL-10, IL-12p40 sowie IL-12p70 untersucht.

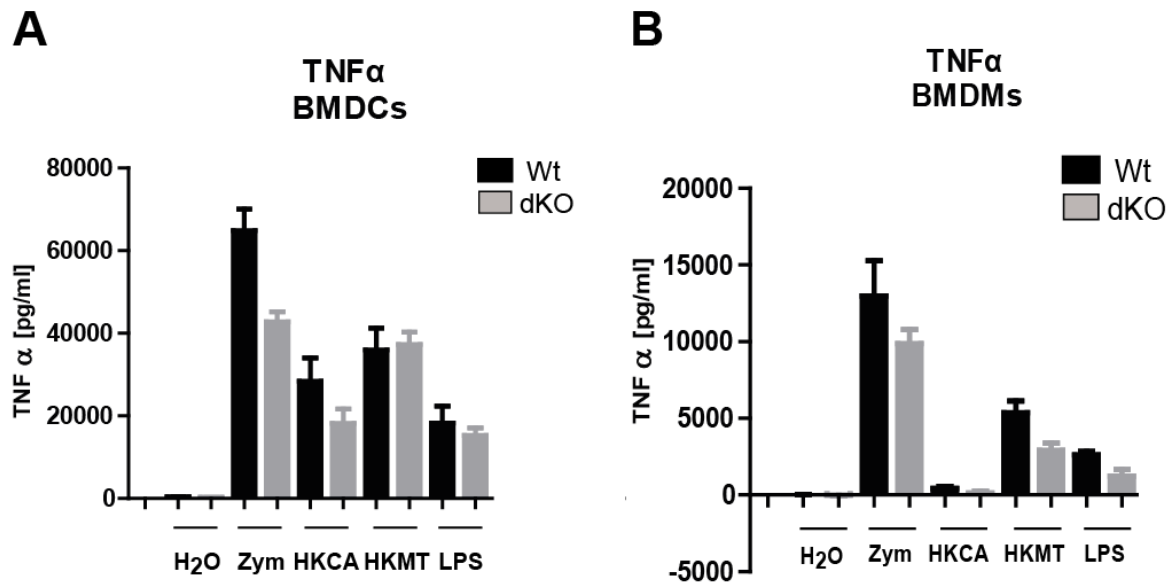


Abbildung 29: Einfluss von SPPL2-Proteasen auf die Sekretion von TNF α

Wildtyp (Wt) und SPPL2a/b doppelt-defiziente (dKO) BMDCs (A) und BMDMs (B) wurden mit 50 μ g/ml Zymosan (Zym), Hitze-inaktivierter *Candida albicans* (HKCA, MOI = 10), 100 μ g/ml Hitze-inaktiviertem *Mycobacterium tuberculosis* (HKMT) oder 0,5 μ g/ml Lipopolysaccharide (LPS) für 24 h bei 37 °C behandelt. Anschließend wurden die Überstände abgenommen und die TNF α Konzentration mithilfe eines ELISA bestimmt.

Die Balken stellen die mittleren TNF α Konzentrationen von Zellen, die aus dem Knochenmark von n = 3 Tieren differenziert wurden, \pm Standard-Abweichung dar. Für die statistische Analyse wurde eine One-way ANOVA mit Tukey *post hoc* Test angewendet.

Der Nachweis von TNF α mithilfe des ELISA zeigte dezente Modulationen, werden die von Wildtyp und Doppelknockout Zellen ausgeschütteten Konzentrationen miteinander verglichen. Dies fand sich sowohl bei BMDCs, als auch bei BMDMs wieder (siehe Abbildung 29). Dabei zeigte sich vor allem für Zymosan eine Reduktion der TNF α Produktion in den Doppelknockout Zellen bei den BMDCs. Auch bei Behandlung mit HKMT zeigte sich die Tendenz einer reduzierten Zytokinantwort. Jedoch erreichten diese Variationen keine Signifikanz.

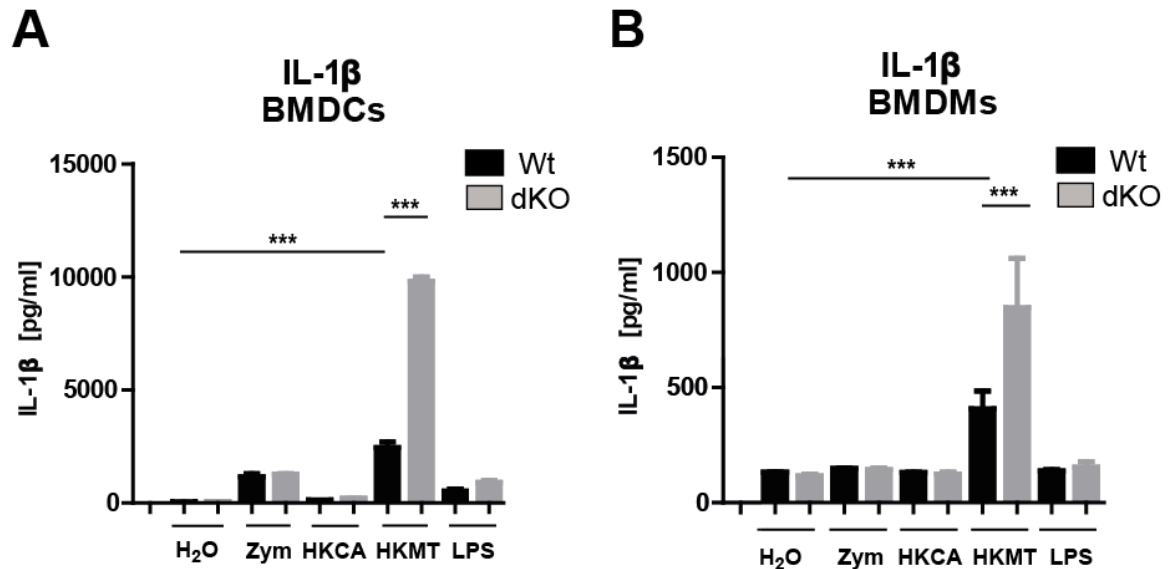


Abbildung 30: SPPL2a und 2b defiziente BMDCs und BMDMs produzieren signifikant mehr IL-1 β bei Behandlung mit HKMT

Wildtyp (Wt) und SPPL2a/b doppelt-defiziente (dKO) BMDCs (A) und BMDMs (B) wurden mit 50 μ g/ml Zymosan (Zym), Hitze-inaktiviertem *Candida albicans* (HKCA, MOI = 10), 100 μ g/ml Hitze-inaktiviertem *Mycobacterium tuberculosis* (HKMT) oder 0,5 μ g/ml Lipopolysaccharide (LPS) für 24 h bei 37 °C behandelt.

Anschließend wurden die Überstände abgenommen und die IL-1 β Konzentration mithilfe eines ELISA bestimmt. Die Balken stellen die mittlere IL-1 β Konzentrationen von Zellen, die aus dem Knochenmark von n = 3 Tieren differenziert wurden mit Standard-Abweichung dar. Für die statistische Analyse wurde eine One-way ANOVA mit Tukey *post hoc* Test angewendet. *** = p < 0,001

Die Analyse der IL-1 β -Produktion von BMDCs und BMDMs ergab signifikante Unterschiede zwischen SPPL2a und SPPL2b exprimierenden und -defizienten Zellen. So konnte in beiden Zellsystemen nach Stimulation mit HKMT eine signifikante Erhöhung der IL-1 β -Sekretion in den proteasedefizienten Zellen gemessen werden. Dies ist insofern überraschend, da dies in direktem Kontrast zu den Beobachtungen mit dem ebenfalls proinflammatorischen TNF steht, das in der Tendenz eher vermindert sezerniert wurde (Abbildung 23). Im Gegensatz zu der HKMT-Behandlung konnte allerdings keine klar veränderte IL-1 β -Sekretion nach Stimulation mit Zymosan, HKCA oder LPS detektiert werden.

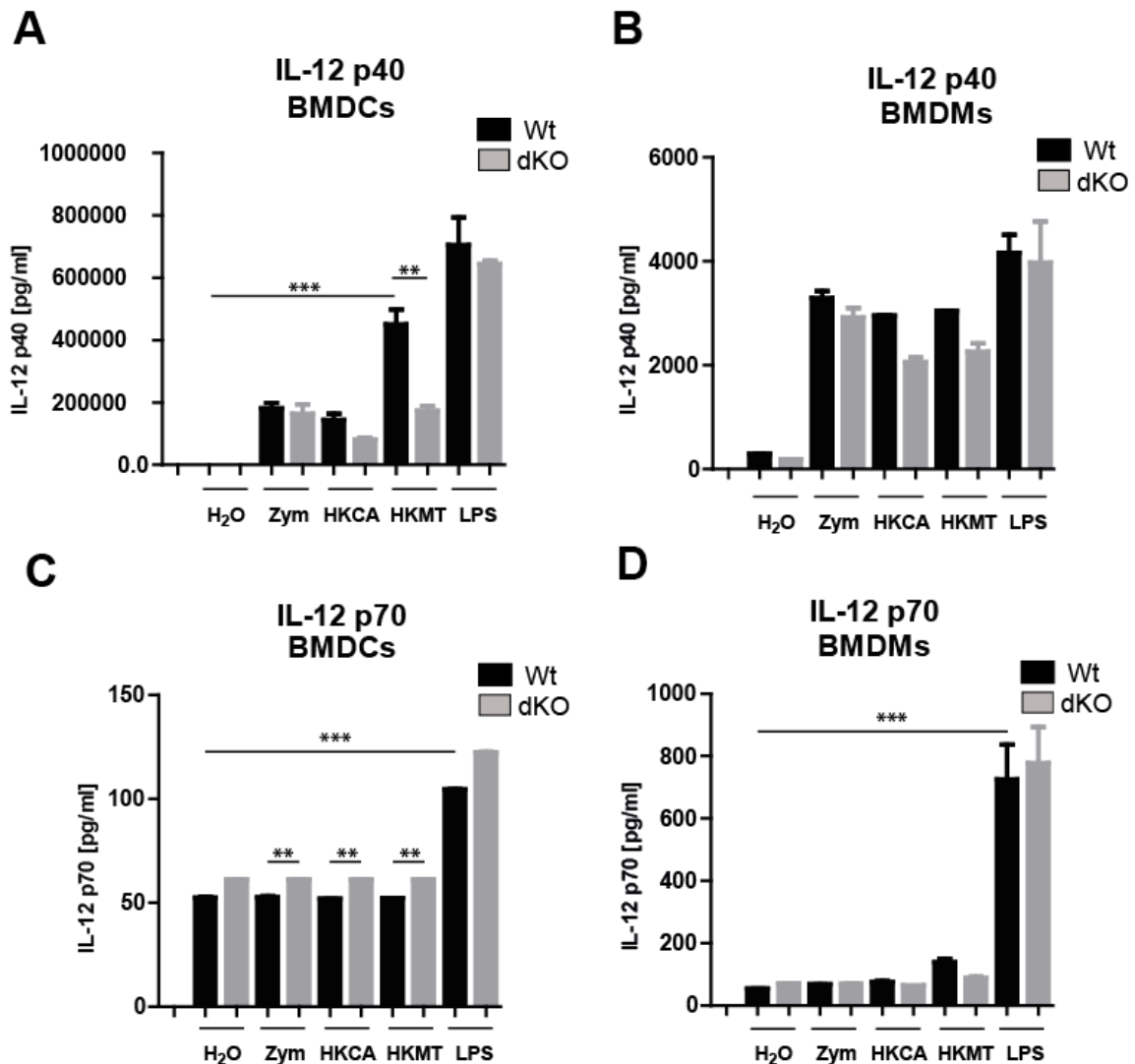


Abbildung 31: SPPL2a/b-Doppeldefizienz beeinflusst die Sekretion verschiedener Zytokine der IL-12-Familie

Wildtyp (Wt) und SPPL2a/b doppelt-defiziente (dKO) BMDCs (A) + (C) und BMDMs (B) + (D) wurden mit 50 µg/ml Zymosan (Zym), Hitze-inaktiviertem *Candida albicans* (HKCA, MOI = 10), 100 µg/ml Hitze-inaktiviertem *Mycobacterium tuberculosis* (HKMT) oder 0,5 µg/ml Lipopolysaccharide (LPS) für 24 h behandelt. Anschließend wurden die Überstände abgenommen und die IL-12p40 unter (A, B) sowie die IL-12p70 unter (C, D) Konzentration mithilfe spezifischer ELISA bestimmt.

Die Balken stellen die IL-12p40/70 Konzentrationen von Zellen, die aus dem Knochenmark von jeweils n = 3 Tieren differenziert wurden, mit Standardabweichung dar. Für die statistische Analyse wurde eine One-way ANOVA mit Tukey post hoc Test angewendet. ** = p < 0,01; *** = p < 0,001

Das aktive IL-12 besteht aus einem Heterodimer, zusammengesetzt aus einer α-Untereinheit mit einem Molekulargewicht von 35 kDa, aus diesem Grunde auch als IL-12p35 bezeichnet, und einer β-Untereinheit, mit 40 kDa auch als IL-12p40 in der Literatur geführt. Durch eine Komplexbildung dieser Untereinheiten entsteht IL-12p70, das aktive Zytokin, welches ähnlich IL-1β oder TNFα eine pro-inflammatorische Immunantwort induziert.

Grundsätzlich aktivierende Einflüsse der Liganden auf die Sekretion von IL-12 konnten sowohl bei BMDCs als auch bei BMDMs durch Nachweis von IL-12p40 dargestellt werden (siehe Abbildung 31 A + B). Eine signifikante Reduktion in der IL-12p40 Antwort zeigte sich im SPPL2a/b-dKO bei den BMDCs in Anwesenheit von HKMT (A). Bei den BMDMs zeigen sich bei Anwesenheit von HKCA und HKMT eine dezent verringerte IL-12p40 Sekretion bei dem dKO im Vergleich zum Wt.

Eine relevante Sekretion von IL-12p70-Level konnte sowohl in BMDCs als auch in BMDMs nach Stimulation mit LPS beobachtet werden, wohingegen die Behandlung mit anderen Liganden keine Unterschiede hinsichtlich der IL12p70-Sekretion im Vergleich zur Behandlung mit reinem Wasser aufzeigten. Es zeigt sich aber, dass in jedem der Ansätze eine signifikante Erhöhung der IL-12p70 Level bei den dKO BMDCs im Vergleich zu den Wildtyp BMDCs vorliegt und somit den Proteasen SPPL2a und SPPL2b eine relevante Rolle in der Sekretion von IL-12p70 zugeschrieben werden kann.

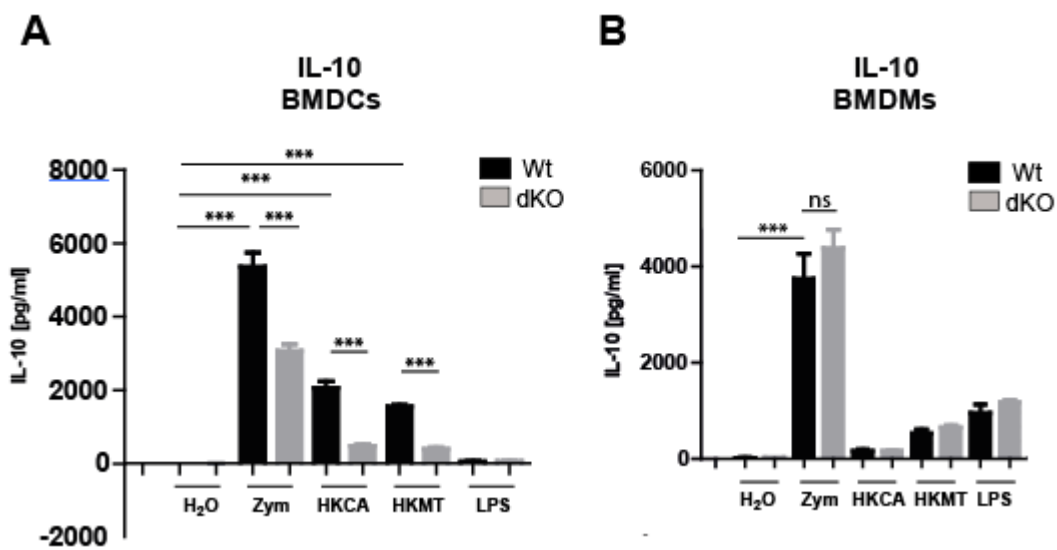


Abbildung 32: SPPL2a/b doppelt-defiziente BMDCs zeigen eine deutlich verringerte IL-10-Sekretion

A und B: Wildtyp (Wt) und SPPL2a/b doppelt-defiziente (dKO) BMDCs (A) und BMDMs (B) wurden mit 50 µg/ml Zymosan (Zym), Hitze-inaktiviertem *Candida albicans* (HKCA, MOI = 10), 100 µg/ml Hitze-inaktiviertem *Mycobacterium tuberculosis* (HKMT) oder 0,5 µg/ml Lipopolysaccharide (LPS) für 24 h behandelt.

Anschließend wurden die Überstände abgenommen und die IL-10 Konzentration mithilfe eines spezifischen ELISA bestimmt. Die Balken stellen die mittlere IL-10 Konzentrationen von Zellen, die aus dem Knochenmark von n = 3 Tieren differenziert wurden, ± Standard-Abweichung dar.

Für die statistische Analyse wurde eine One-way ANOVA mit Tukey *post hoc* Test angewendet. *** p < 0,001; ns = nicht signifikant.

IL-10 wirkt als einziges getestetes Zytokin anti-inflammatorisch und demzufolge kontrollierend auf die durch Pathogene induzierte Immunantwort.

Die Ausschüttung von IL-10 zeigte sich bei BMDCs in Abwesenheit der Proteasen deutlich vermindert (siehe Abbildung 32 A). Diese verringerte Sekretion wurde bei allen verwendeten Liganden beobachtet, wohingegen die Behandlung mit LPS zu keiner IL-10 Sekretion führte. Im Gegensatz zu den Ergebnissen für BMDCs wurde im Fall der Makrophagen keine signifikante Erhöhung der Zytokinproduktion nach Stimulation mit Zymosan zwischen den Genotypen sichtbar.

Insgesamt kann also festgehalten werden, dass SPPL2a und SPPL2b selektiv die Sekretion einzelner Zytokine nach Stimulation diverser CTLRs beeinflussen.

4. Diskussion

Das maßgebliche Ziel dieser Doktorarbeit umfasste die Identifizierung neuer Substrate von SPPL2a und SPPL2b. Sinnvoll ist es dabei, durch die Berücksichtigung möglicher oder gesicherter Substrateigenschaften eine erste Vorauswahl zu treffen, um die Anzahl der zu betrachtenden Kandidaten einzugrenzen. Es wurden Proteine aus Proteinfamilien untersucht, von denen bereits bekannt war, dass bei anderen Mitgliedern eine Prozessierung durch SPPL2a und -2b erfolgt. Wichtig zur Eignung als SPPL2a- oder 2b-Substrat stellte sich dabei die Orientierung der in der Membran liegenden Proteine dar. Alle bis dato identifizierte Substrate liegen in Typ II Orientierung vor. Zudem wurde für viele Substrate ein initiales Abspalten der Ektodomäne, also des C-terminalen Endes, beschrieben. Demnach scheint eine kurze extrazelluläre Sequenz die Wahrscheinlichkeit einer Prozessierung durch die Proteasen SPPL2a und 2b zu erhöhen, wenn auch die Möglichkeit nicht kategorisch ausgeschlossen werden sollte, dass auch Proteine mit längeren Ektodomänen Substrate darstellen, wie es bei SPPL 3 der Fall ist [32, 36]. Zu beachten ist allerdings, dass es keine gesicherten Kenntnisse über die Konsensuschnittstelle von SPP/SPPL Proteasen gibt.

Zudem schien eine Analyse der Abhängigkeit einer Degradierung zur intrazellulären Signaltransduktion und Modulation sowie Initiation einer Immunantwort interessant, weshalb auch diese untersucht wurden, allerdings in limitiertem Umfang.

4.1. Limitationen von Überexpressionssystemen für die Identifizierung von SPPL2a- und 2b-Substraten

Einer der am häufigsten verwendeten Methoden zur Analyse einer proteolytischen Prozessierung von Proteinen stellt die transiente Transfektion einer Zelllinie mit einer anschließenden Westernblot Analyse dar [35, 49, 50, 146]. Die Transfektion ermöglicht die Überexprimierung der zu untersuchenden Proteine. Als nützlich erweist sich dabei, dass nicht für jedes Protein ein Antikörper entwickelt werden muss, sondern der zuverlässige, gut etablierte Antikörper gegen das, an das Konstrukt angefügte, HA-Epitop verwendet werden kann. Auch eine Kotransfektion mit der aktiven Protease oder einer inaktiven Variante kommen zur Anwendung. Als etablierte Zellsysteme eignen sich HEK- oder HeLa-Zelllinien, welche in der Grundlagenforschung ubiquitär verwendet werden. Bei beiden Zelllinien handelt es sich um menschliche Zellen, welche durch den Verlust von

regulatorischen Proteinen und Signalkaskaden ein unbegrenztes Replikationsvermögen besitzen. In unserer Arbeitsgruppe wurde die Analyse mit murinen Proteinen zur Identifizierung neuer Substrate durchgeführt. Diese werden nun durch Transfektion in eben jenen menschlichen, stark veränderten Zellen exprimiert. Zumeist gelingt dies problemlos und so kann ein einfaches Modell verwendet werden, um die gewünschten Proteine und deren Funktion zu beurteilen. So konnte dieser Assay bisher erfolgreich Dectin-1 und LOX-1 eingesetzt und eine Proteolyse durch die beiden Proteasen SPPL2a und 2b nachgewiesen werden [50]. Auch für Tweak konnte im Rahmen dieser Arbeit diese Methode verwendet werden. Ein Defizit dieser Herangehensweise wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit bei der Untersuchung einer möglichen Proteolyse von Mincle und Dectin-2 offengelegt. Eine Expression der Proteine konnte zwar auch in diesen humanen Zelllinien erfolgreich erzielt werden, jedoch konnte bei keinem der beiden Rezeptoren eine Oberflächenlokalisierung nachgewiesen werden (Abbildung 19). Das Ausbleiben eines gerichteten Transports der Proteine zu ihren Zielmembranen führt zur intrazellulären Akkumulation der Proteine (Abbildung 16). Diese Beobachtung wurde auch in der Literatur beschrieben und daraus die Erklärung, dass diese Proteine in einem funktionellen Komplex mit anderen Proteinen, wie dem Fc Rezeptor γ oder MCL vorliegen, hergeleitet [63, 90, 98, 137, 138, 147]. Während Dectin-1 über ein autarkes Signalmotiv (hemITAM) verfügt [148-150], bedarf es zur Induktion der Signalkaskade bei den Rezeptoren Dectin-2 und Mincle der Bindung an den Fc Rezeptor γ . Dieser vermag mittels des ITAM-Motives die Aufgabe der Signaltransduktion zu übernehmen, siehe Abbildung 4 [62, 63, 86, 98, 99, 137, 138, 151-155]. Eine solche Regulation der Translokation von komplex-bildenden Proteinen ist sehr gut belegt. Beispielhaft sei die γ -Sekretase erwähnt. Bei dieser Protease findet eine effiziente Translokation erst nach erfolgreicher Zusammensetzung des Enzymkomplexes aus allen vier Untereinheiten statt [156-158]. Somit lässt sich erklären, warum humane Standardzelllinien eine relevante Oberflächenlokalisierung von Dectin-1 aufweisen, wohingegen für Dectin-2 und Mincle die Zellmembran dieser Zellen nicht erreichten. Ausgehend von der Hypothese, dass weitere Proteine für den Transport und Einbau von Dectin-2 und Mincle in die Zellmembran benötigt werden, wurden Ko- oder aber Tripletransfektionen mit ausgewählten Proteinen durchgeführt. Zusammenfassend konnten FcR γ sowie MCL in den von uns verwendeten humanen Zellsystemen die Aufgabe einer funktionellen Translokation nicht erfüllen. Möglicherweise liegt dieses an den Speziesunterschieden und eine Beteiligung weiterer, bislang nicht identifizierter Proteine. Desweiteren handelt es sich bei HEK- und HeLa-Zellen um Epithelzellen, die diese immunzellspezifischen Proteine nicht endogen exprimieren [63, 90, 159]. Nicht schlüssig zu erklären ist, warum einige andere Arbeitsgruppen durchaus Erfolg mit dem durchgeführten Koexpressionsansätzen von Dectin-2 und Mincle mit FcR γ und MCL hatten.

Die Versuche einer Koexpression von drei Rezeptoren basierte auf der Publikation von Lobato-Pascual et al. 2013. In diesen Experimenten wurden allerdings Proteine von Ratten verwendet, und nicht murine, wie in dieser Arbeit. Denkbar wäre, dass spezifische Eigenschaften der Proteine von Ratten einen effektiven Transport an die Zellmembran ermöglichen, welche den murinen Äquivalenten fehlen. Allerdings zeigen sich bei dem Vergleich der Proteinsequenzen dieser Spezies miteinander nur wenige Unterschiede, beispielsweise in den Sequenzen der Extrazellulärdomänen von Mincle und Dectin-2. Insgesamt erschien daher diese Überlegung nicht sehr plausibel.

Eine weitere Möglichkeit ist, dass es Unterschiede hinsichtlich der technischen Durchführung gab. Bei Lobato-Pascual et al. 2013 wurden andere Zelltransfektionsansätze verwendet, wobei die Angaben der verwendeten Plasmidkonzentration im Überexpressionsansatz fehlen. Denkbar erscheint daher, dass eine höhere Expressionsstärke eine vermehrte Oberflächenlokalisierung induzieren könnte. Zudem schloßen Lobato-Pascual et al. eine gewisse intrazelluläre Akkumulation nicht aus. Auch in dieser Arbeit konnten geringe Mengen an Protein an die Oberfläche gelangen, in der Immunfluoreszenz zeigte sich hingegen eine signifikante Akkumulation intrazellulär. Auch zwischen den HEK – und HeLa Laborstämmen dürfte es Unterschiede geben. Als zielführend erwies sich hingegen die Etablierung eines physiologischeren Assays mit einer Zelllinie, deren Ursprung sich im Immunsystem finden lässt. Unter der Berücksichtigung, dass FcR γ und MCL relevante Faktoren für eine Oberflächenlokalisierung darstellen, wurde eine Immunzelllinie bezüglich der Expression dieser Proteine ausgesucht (Abbildung 20). Die Besonderheit von Tweak ist dessen nahezu ubiquitäre Expression in allen Zelltypen, [106, 110, 119, 122, 124, 127, 160-165]. Somit stellen HEK und HeLa Zellen ein praktikables System für die Analyse der Prozessierung von Tweak dar.

4.2. Mitglieder der CTLR-Familie zeigen Variationen in ihrer Funktion bei Anwesenheit von Pathogenen oder Liganden

Mincle und Dectin-2 werden in Immunzellen exprimiert [67-69, 71-73, 83, 135, 136, 166-168] und dienen der Pathogenbindung und der Induktion einer Immunantwort. So kann die Vermutung aufgestellt werden, dass es zu einer gesteigerten Proteolyse der Rezeptoren bei Anwesenheit und Bindung von Liganden kommen kann. Dieses Phänomen wurde für Dectin-1 beschrieben, wo bei Zugabe eines geeigneten Ligandens eine Phagozytose des Liganden-Rezeptor-Komplexes induziert werden konnte. Im Rahmen dieser Phagozytose wurde Dectin-1 vermehrt degradiert und ein deutlicher Anstieg des NTFs beobachtet [66]. Durch eine hohe Vergleichbarkeit der einzelnen Mitglieder dieser Rezeptorfamilie

untereinander, erschien auch bei Dectin-2 und Mincle eine Fähigkeit der Phagozytose von Partikeln möglich.

Bedeutend, auch für die hier beschriebenen Versuche, ist, dass viele Liganden oder inaktivierte Pathogenpräparationen von verschiedenen Rezeptoren der CLR Familie erkannt werden und somit keine spezifischen Liganden existieren [59, 75, 81, 91, 94, 98, 169-172]. Eine Möglichkeit dieser funktionellen Redundanz könnte sein, dass Erreger, wie beispielsweise *Malassezia*, im Rahmen der Proliferation Stadien durchlaufen, in welchen unterschiedliche Glykoproteine exprimiert werden [95, 173]. Dectin-2 erkennt *Malassezia* durch O-glykosylierte Mannose-reiche Glykoproteine [78], während Mincle denselben Erreger durch an Mannitol gebundene Fettsäuren und Glyceroglykolipide erkennt [76, 78]. Dies kann als funktionelles Sicherheitsnetz des Immunsystems gewertet werden, und ermöglicht so, wie die TLR abhängigen Mincle-lokalisierung an die Zelloberfläche zeigt, eine intra- sowie interzelluläre Rekrutierung weiterer Proteine zur Pathogenbekämpfung.

Anders als bei Dectin-1 scheint dabei die Pathogenelimination durch Internalisierung nicht im Vordergrund zu stehen, vielmehr die Initiierung einer intrazellulären Signalkaskade mit nachfolgender Ausschüttung von extrazellulären Botenstoffen. Wells et al. beschrieben für Mincle lediglich die Vermittlung einer inflammatorischen Antwort ohne eine Fähigkeit der Phagozytose [75], auch Chinthamani et al., Rabes et al. sowie Sharma, Simonson et al. konnten keine Mincle-abhängige Phagozytose feststellen [75, 141, 174-176]. Lobato-Pascual et al. 2013 beschrieben für Mincle eine Phagozytose mithilfe von Antikörpergekoppelten Partikeln [98]. Dabei sei aber angemerkt, dass dieses Verfahren speziell hergestellte Antikörper gegen den Mincle Rezeptor als Liganden verwendet und die physiologische Relevanz daher unklar bleibt. Pathogene liegen häufig in größerer Molekülstruktur vor, eine Phagozytose ist damit schwieriger zu realisieren. Patin, Orr et al. beschrieben die Rolle von Mincle in Bezug auf die Phagozytose als noch nicht abschließend geklärt. Auch für Dectin-2 kann die Frage nach einer den Rezeptor mit einschließenden Phagozytose nicht abschließend geklärt werden, die aktuelle Literatur beschreibt jedoch keine Phagozytose des Rezeptors [177]. Kimura, Inoue et al. beschrieben zwar eine durch Dectin-2 vermittelte Phagozytose in Kupffer Zellen, konnten jedoch keinen an Dectin-2 bindenden Liganden identifizieren und keine direkte Internalisierung von Dectin-2 nachweisen [178], sondern beobachteten nur indirekt, dass bei Fehlen von Dectin-2 keine suffiziente Phagozytose stattfindet. Für ein weiteres Mitglied der CLR, DC-SIGN, legen erste Untersuchungen nahe, dass eine Phagozytose in Anwesenheit von DC-SIGN stattfindet. Dabei wurde eine primär nicht phagozytierende Zelllinie mit humanem DC-SIGN transfiziert und anschließend in Anwesenheit von Liganden die Phagozytose beobachtet [179, 180]. Dies könnte jedoch auch durch eine DC-SIGN vermittelte Signalkaskade erfolgen, die eine Phagozytose initiiert. Desweiteren stellt sich die genauere Analyse der

Phagozytose für DC-SIGN als schwierig dar, da kein direktes murines Korrelat zu dem humanen Protein vorliegt, sondern bis zu acht ähnliche murine Proteine beschrieben wurden [181]. Für eines dieser murinen Proteine, DC-SIGNR1, wurde die Bindung von Zymosan und HKCA beschrieben, es konnte aber keine Phagozytose beobachtet werden [182]. Auch für den *dendritic cell natural killer Lektin group receptor-1* (DNGR-1) konnte keine Phagozytose beobachtet werden [183]. Somit zeichnen sich auch weitere Mitglieder der CTLRs durch eine Funktionalität ohne Phagozytose aus.

Eine Besonderheit stellt LOX-1 dar. Für diesen Rezeptor wurde oxLDL als spezifischer Ligand beschrieben [184]. Desweiteren scheint LOX-1 aber auch eine funktionelle Relevanz abseits seiner Funktion als Rezeptors zu besitzen. Mentrup et al. konnten zeigen, dass die Initiierung der MAP Kinasen, und damit die Aktivierung von ERK und p38, auch unabhängig von der Bindung oder der Aufnahme des Liganden durch eine Akkumulation des NTFs als tonisches Signaling stattfindet [50]. Es zeigte sich zudem eine Degradierung von LOX-1 durch SPPL2s, welche sich unabhängig von der Bindung eines Ligandens zeigte und, gleich den hier beobachteten Degradierungen für Mincle und Dectin-2, kontinuierlich stattfindet [50]. Demnach könnte die Funktionalität und der Degradierungsprozess von Dectin-2 und Mincle mit LOX-1 vergleichbar sein und sich demnach grundlegend von Dectin-1 unterscheiden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die in Tabelle 18 aufgelisteten Liganden oder Pathogene verwendet, um eine mögliche Beeinflussung bei Anwesenheit von PAMPs auf das Vollängenprotein oder die in der Membran verbleibenden NTFs von Dectin-2 und Mincle zu untersuchen. Durch das nicht abschließend geklärte Ligandenspektrum wurde versucht, ein weites Spektrum an Liganden zu verwenden und die in

Abbildung 26 verwendete Liganden zeigen repräsentative Ergebnisse. Bei HKCA und HKMT handelt es sich um hitzeinaktivierte *Candida albicans* und *Mykobakterium Tuberculosis*, welche PAMPs exprimieren, die sowohl von Dectin-2 als auch von Mincle erkannt werden [75, 82, 83, 99, 134, 153, 171]. Zudem wurden durch Daniel Fischer, HKI Jena hergestellte Hyphen und Hefen von *Candida albicans*, welche ebenfalls hitzeinaktiviert wurden, verwendet. Dabei sei anzumerken, dass für Mincle keine Informationen über das Erkennen von *C. albicans* Hyphen vorliegt, diese jedoch die invasive und pathogene Form von *C. albicans* darstellen [63, 171, 185] und eine Immunantwort in Form einer IL-1 β Produktion stattfindet [63]. Sudbery et al. beschrieben zudem, dass die *C. albicans* Hefen zunächst ohne Pathogenität im Epithel vorliegen, und vorallem die Umwandlung zur pathogenen Hyphe eine Immunantwort auslösen würden [185]. Aus diesem Grund erschien eine Betrachtung dieses potentiellen Ligandens relevant. Eine Stimulation der Zellen mit LPS und GMCSF wurde ebenfalls durchgeführt, da zum Teil eine Abhängigkeit dieser Stimuli, durch Aktivierung von Immunzellen, für eine korrekte

Funktion von CTLRs beschrieben wurde und die endogene Expression von SPPLs erhöht wird [67, 69, 73, 135, 137, 168, 186]. Es konnte bei keiner Behandlung eine Internalisierung oder Varianz in der Proteolyse der Rezeptoren beobachtet werden. Dieses ist stellvertretend in

Abbildung 26 dargestellt, sodass eine direkte Phagozytose durch Dectin-2 und Mincle, zumindest in J774.E Makrophagen, nicht beobachtet wurde.

Auch bei Lox-1, ebenfalls zur Familie der CTLRs gehörend, unterliegt die Internalisierung des Rezeptors keiner Dependenz zur Bindung von oxLDL [50]. Durch eine Akkumulation des NTFs von LOX-1 scheint direkt durch das NTF ein autonomes Signaling induziert zu werden, sodass die Möglichkeit auch für Dectin-2 und Mincle in Erwägung gezogen werden sollte. Dies unterstreicht eine Variation in der Familie der CTLRs, welche sich ansonsten funktionell sehr ähnlich zu sein scheinen. Zudem stellt die umfangreiche, aber zum Teil widersprüchliche, Literatur bezüglich geeigneter Liganden eine mögliche Hypothese zur Erklärung der hier beobachteten fehlenden Internalisierung dar: so besteht die Möglichkeit, wie auch Patin, Orr et al. beschreiben, dass bis zum gegenwärtigen Stand der Forschung der richtige Stimulus, der zur Internalisierung der Rezeptoren führt, noch nicht gefunden werden konnte.

4.3. Proteolytische Prozessierung der neu entdeckten SPPL Substrate Tweak, Dectin-2 und Mincle

Nachdem für die drei potenziellen Substrate geeignete Assays etabliert wurden, konnte mit der genaueren Betrachtung der Degradierung dieser Proteine begonnen werden. Wie bereits beschrieben, stellt die proteolytische Prozessierung der Ektodomäne des Proteins, zumeist den initialen Schritt in der Degradierung von Substraten der SPPL2a und 2b dar [26, 36, 187, 188], weswegen dieser Schritt für die drei zu testenden Substrate analysiert wurde.

Der primäre Schritt der Generierung eines löslichen Liganden von Tweak wird durch Furin realisiert. Die Endoprotease Furin gehört zur Familie der Suptilisin-like Serinproteasen. So besitzt Furin eine katalytische Triade, in welcher die drei Aminosäuren Aspartat (D), Histidin (H) und Serin (S) das katalytische Zentrum bilden. In der Literatur wird als Konsensus-Schnittstelle des Furins eine Abfolge der Aminosäuren R - X - R – R konstatiert, wobei R für Arginin und X für eine beliebige Aminosäure steht [104, 189, 190]. Diese Aminosäuresequenz ist extrazellulär beziehungsweise intraluminal sowohl bei murinem als auch bei humanem Tweak zweimal vertreten und Furin wird als Tweak-prozessierende Protease beschrieben, wobei die präferierte Schnittstelle die N-terminal gelegene Sequenz

an Position 93-94 darstellt [104, 115, 191]. Chicheportiche et al. beschrieben bei Analyse der Extrazellulärdomäne multiple Banden, die aufgesplittert erschienen und als variable Zwischenstufen interpretiert wurden. In dieser Arbeit zeigten sich zwei NTF, welche sich zwei Proteasen zuordnen lassen. Das NTF 1 wird durch Furin generiert, wohingegen für NTF 2 bislang keine Protease identifiziert werden konnte, siehe Abbildung 33.

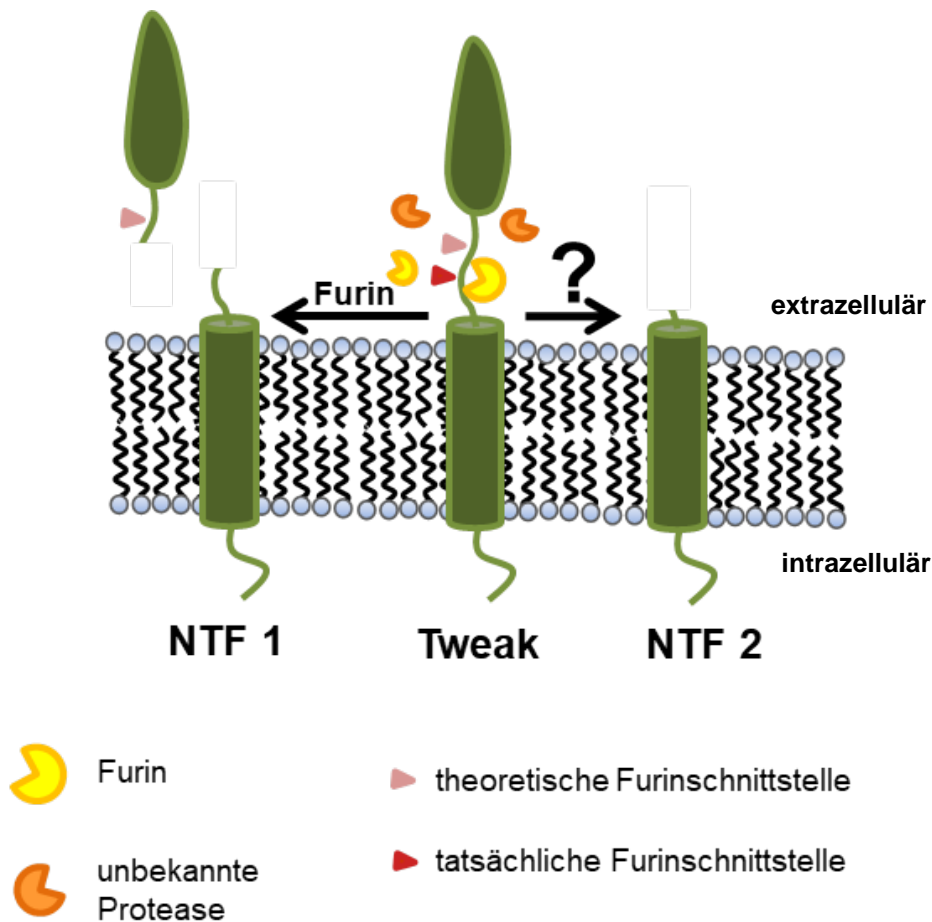


Abbildung 33: Prozessierung des Volllängenproteins Tweak in zwei N-terminale Fragmente

Die Prozessierung von Tweak erfolgt durch zwei Proteasen. Dabei präferiert die Protease Furin, obwohl zwei mögliche Schnittstellen in Tweak vorliegen, die Schnittstelle an Position 90-93, es entsteht das NTF 1. Zudem wird Tweak noch weiter N-terminal von einer bislang unbekannt Protease prozessiert (NTF 2).

Ein besseres Verständnis der Degradierung und somit Regulation von Tweak sollte Gegenstand weiterer Forschung darstellen, um neue Ansätze zur möglichen therapeutischen Modulation dieses Proteins aufzuzeigen, welches von zentraler Bedeutung für das Immunsystem ist.

Die bislang beschriebenen Funktionen von Tweak beziehen sich zumeist auf den freigesetzten Liganden, welcher sich aus einem Trimer aus drei homologen löslichen

Tweak-Einheiten aus dem C-terminalen Ende von Tweak zusammensetzt [122]. Bei Bindung an den Fn14-Rezeptor, welcher zur Familie der TNF-Rezeptoren gehört, wird eine Reihe an Signalkaskaden aktiviert, wobei die Stimulation des klassischen und alternativen NF κ B-Signalweges den zentralen Fokus der gegenwärtigen Forschung darstellt [192]. Mit der Generierung zweier N-terminaler Fragmente sind somit auch zwei initiale Prozessierungswege des Tweak Proteins unabhängig voneinander möglich. In dieser Arbeit konnte aufgezeigt werden, dass beide NTFs Substrate der Intramembranproteasen darstellen, siehe Abbildung 10 und Abbildung 35. Damit wird die Bedeutung der Intramembranproteasen für die Prozessierung von Tweak deutlich.

Anders als bei Tweak ist in der Literatur keine Spaltung von Dectin-2 und Mincle beschrieben, welche ein NTF generieren könnte. Bei Dectin-1 findet der primäre Schritt des Abbaus im endolysosomalen Kompartiment statt. Demnach wurde die Hypothese aufgestellt, dass auch bei Dectin-2 und Mincle eine primäre Proteolyse in diesem Kompartiment vorliegt [145]. In Abbildung 23 konnte gezeigt werden, dass durch Beeinflussung der proteolytischen Aktivität innerhalb des endolysosomalen Kompartimentes eine Modulation in Bezug auf die Vollängenproteine beobachtet wurde. Auffällig ist, dass bei Anwendung dieser unspezifischen Proteaseninhibitoren nicht nur das Gesamtprotein im Westernblot Veränderungen aufzeigt, sondern auch die durch das HA-Epitop darstellbaren N-terminalen Fragmente zum Teil deutlich in ihrer Größe variieren und teilweise auch akkumulieren. Dies ist mit einer alternativen Proteolyse vereinbar, entweder durch andere Proteasen im lysosomalen Kompartiment, die bei Akkumulation der Proteine diese als Substrate übernehmen, durch sequenzielle Aktivität verschiedener Proteasen oder durch Akkumulation der Proteine an der Zelloberfläche und extrazelluläre Degradierung.

Insgesamt sei anzumerken, dass nur sehr wenig Internalisierung der beschriebenen Proteine beobachtet wurde. Wird, wie für LOX-1 bereits berichtet, angenommen, dass eine konstitutive Internalisierung und Prozessierung stattfindet, liegt dabei zumeist eine deutlich langsamere Kinetik als bei der ligandenabhängigen Internalisierung vor. Zudem besteht eine deutliche Diskrepanz in der Menge des prozessierten Proteins. Demnach können Effekte weitaus schwerer beobachtet werden und eine längere Zeitspanne erfordern. Dies legt auch der beobachtete Effekt nahe, dass erst 16 Stunden nach Ligandenexposition eine signifikant erhöhte Oberflächenlokalisation von Mincle und Dectin-2 beobachtet wurde [138].

Durch die endogene Expression von SPPL2a sowie 2b (Abbildung 25) war es möglich, den Einfluss der Proteasen auf die Prozessierung von Dectin-2 und Mincle zu untersuchen. Bei

beiden Proteinen konnte eine Proteolyse der NTFs von Dectin-2 und Mincle durch die Intramembranproteasen SPPL2a und 2b nachgewiesen werden (Abbildung 26). Der inhibitorische Effekt auf SPPL2a und 2b blieb konstant nachweisbar, unabhängig von der Anwesenheit verschiedener Liganden. Somit zeigt sich, dass eine Prozessierung der NTFs durch SPPL2a und 2b konstitutiv stattfindet, entweder direkt in der Membran oder aber durch eine geringe Internalisierung und anschließender lysosomaler Degradierung.

4.3.1. Alternative Degradierungswege

Anders als bei Dectin-1 zeigte sich bei Dectin-2 und Mincle bei Behandlung mit dem SPPL2a/2b Inhibitor ZLL ein geringerer Effekt in Bezug auf eine Modulation des NTFs. Einen Grund dafür sahen wir in dem relativ konstanten Verhältnis der sich noch an der Oberfläche der Zellen befindenden Proteine zu ihren NTFs an. Dadurch kann, anders als bei Dectin-1, keine plötzlich einsetzende, einen Großteil der exprimierten Proteine umfassende Prozessierung erfolgen und es resultiert lediglich eine basale Generierung von NTFs. Diese können dann in ihrem sekundären Degradierungsprozess durch ZLL moduliert werden, die Effekte zeigen sich dadurch aber schwächer als bei Dectin-1. Die fehlende Internalisierung könnte hier also eine mögliche Erklärung bieten. Eine weitere Möglichkeit kann ein *Recycling* der Rezeptoren darstellen, wobei die Rezeptoren mithilfe von Vesikeln nach intrazellulär verlagert werden und bei Bedarf durch Fusion wieder an die Zelloberfläche rückverlagert werden und so eine Prozessierung umgehen.

Auch der lysosomale Abbau über den *endosomal sorting complex required for transport* (ESCRT)-Weg muss in Betracht gezogen werden. Diese Theorie zeigt neben der Möglichkeit einer direkten lysosomalen Proteolyse einen weiteren Degradierungsweg auf. Hierbei werden Oberflächenproteine durch Vesikelbildung internalisiert und durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Proteine weiter in intraluminale Vesikel verpackt [193-195]. Dabei werden große Vesikel generiert, *multivesicular bodies* (MVB) genannt, welche eine Vielzahl an kleineren Vesikeln beinhalten [196].

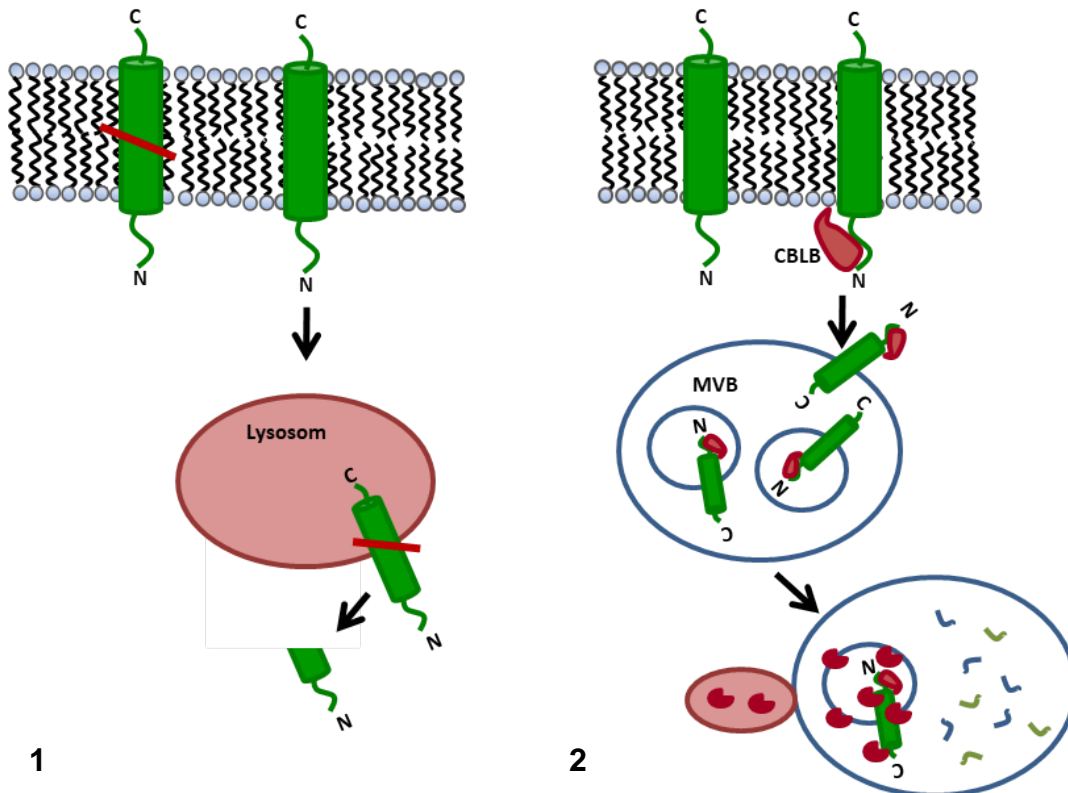


Abbildung 34: Vergleich des lysosomalen Abbaus von Proteinen mit dem ESCRT-Weg

Unter 1 werden Proteine entweder direkt in der Zellmembran oder aber im Lysosomen degradiert. In beiden Fällen wird das NTF in das Zytosol der Zelle freigesetzt und kann dort dann Funktionen übernehmen. Unter 2 wird der ESCRT -Weg dargestellt. Beginnend mit der Ubiquitinierung durch CBLB werden die so markierten Proteine in Multivesikuläre Körper (MVB) eingeschlossen und durch die nachfolgende Fusion mit Lysosomen komplett degradiert. Ein NTF wird bei diesem Weg nicht freigesetzt und ist somit nicht nachweisbar.

Induziert wird der Prozess des ESCRT durch die Ubiquitinierung des sich an der Oberfläche befindenden Proteins. Dies wird beispielsweise durch die E3 Ubiquitin Ligase *Casitas B-lineage lymphoma protein b* (CBLB) realisiert. Eine Markierung des Proteins führt zur Internalisierung und Sortierung in intraluminale Vesikel von MVBs. Es erfolgt, wie in Abbildung 34 dargestellt, nach Fusion der MVBs mit den Lysosomen, eine Degradierung der Proteine [197, 198]. Dies führt dazu, dass Proteinfragmente, anders als bei RIP, nicht ins Cytosol freigesetzt werden, und auch eine Detektierung der NTFs durch Degradierung behindert werden kann. Diese Alternative wurde sowohl für Dectin-1, als auch für Dectin-2 und Mincle beschrieben [145, 199]. Es konnte gezeigt werden, dass Mäuse, welche defizient für CBLB sind, deutlich effizienter die Aktivierung der angeborenen Immunantwort bei einer *C. albicans*-Infektionen modulieren konnten, als Wildtyp-Mäuse [145]. Die Defizienz für CBLB resultiert in einer verminderten Ubiquitinierung von Dectin-1, Dectin-2 und Mincle und verhindert somit den Abbau dieser. Dadurch können die nun weiterhin an

der Oberfläche lokalisierten Rezeptoren Pathogene erkennen und eine Immunantwort induzieren. Dies zeigt auf, dass dieser Weg der Degradierung eine physiologische Relevanz hat und eine Analyse, welcher Degradierungsprozess *in-vivo* dominiert, notwendig ist. Interessant wäre die Entwicklung eines murinen Antikörpers direkt gegen den N-terminus von Dectin-2 und Mincle. Mit diesem könnten murine Zellen des Immunsystems hinsichtlich der Degradierungswege untersucht werden und Rückschlüsse über den bevorzugten Prozessierungsweg geschlossen werden.

Eine weitere Möglichkeit, welche sich auch auf den hier beschriebenen Assay anwenden ließe, wäre die Verwendung von CBLB Knock-out Zellen oder siRNA gewesen. Diese hätten *in-vitro* den ESCRT Degradierungsweg unterbunden und dann möglicherweise eine deutlich prominentere Degradierung über RIP und die SPPL2s hervorgerufen.

4.4. Funktionelle Bedeutung der Proteolyse durch SPPL2a und 2b

4.4.1. Tweak

Neben der biochemischen Charakterisierung von proteolytischen Ereignissen ist die funktionelle Analyse dieser Prozesse von entscheidender Bedeutung. So konnte bei bereits bekannten Substraten der Proteasen SPPL2a/2b gezeigt werden, dass diese Proteasefamilie in unterschiedlicher Weise auf die intrazelluläre Signalweiterleitung einwirkt.

Die Rolle des membrangebundenen Tweaks stand lange nicht im Vordergrund der Forschung und so ist es umso erwähnenswerter, dass neuere Forschungsergebnisse zum Teil signifikante Unterschiede zwischen dem löslichen Tweak und der membrangebundenen Form aufzeigen konnten. Trebing et al zeigen, dass zwar eine effektive Induktion des alternativen NFκB-Signalweges sowohl durch den löslichen Tweak-Liganden als auch durch membrangebundenes Tweak möglich ist, der klassische NFκB-Signalweg hingegen lediglich durch die membrangebundene Form aktiviert werden kann [192]. Dies könnte eine spezifische Intervention ermöglichen mit der Inhibierung oder auch Aktivierung von Signalkaskaden, z.B. durch den Einsatz von Antikörper, die in die Funktionsweise des löslichen oder membrangebundenen Tweaks eingreifen können [192, 200]. Durch die funktionelle Bedeutung der membrangebundenen Form von Tweak ist ein genaueres Verständnis hinsichtlich der Prozessierung von Tweak notwendig. Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass Tweaks NTFs Substrate für die Proteasen SPPL2a und 2b

darstellen (siehe Abbildung 10 sowie Abbildung 11), zeigt sich somit auch eine mögliche Bedeutung dieser Proteasen für die von Tweak induzierten Signalwege, siehe Abbildung 35.

Der Abbau der NTFs könnte eine Modulation der Signalweiterleitung durch bindende Rezeptoren bedeuten. Durch die Degradierung der NTFs, welche mithilfe eines Signalmotives oder durch Komplexbildung mit anderen, signal-induzierenden Proteinen auf zelluläre Vorgänge Einfluss nimmt, kann die Signalantwort unterbrochen werden. Dies zeigten wir zum Beispiel für Dectin-1 [66]. Aber auch die Akkumulation der N-terminalen Fragmente kann zur Aktivierung von Signalkaskaden führen, wie z.B. für LOX-1 gezeigt [50]. Eine andere Möglichkeit der Modulation intrazellulärer Prozesse besteht in dem Freisetzen der ICD bei Degradierung des NTFs. Dadurch befindet sich ein kleiner Teil eines Proteins im Zytoplasma und kann in den Nukleus translozieren und die Genexpression beeinflussen. Das Freisetzen einer ICD mit anschließender Translokation in den Nukleus konnte zum Beispiel für Notch, einem Substrat der γ -Sekretase, nachgewiesen werden [19]. Auch bei weiteren Partizipanten der regulierten Intramembranproteolyse, wie CD74, TNF und ITM2B, konnte eine Translokation in den Nukleus nachgewiesen werden [114, 146, 201].

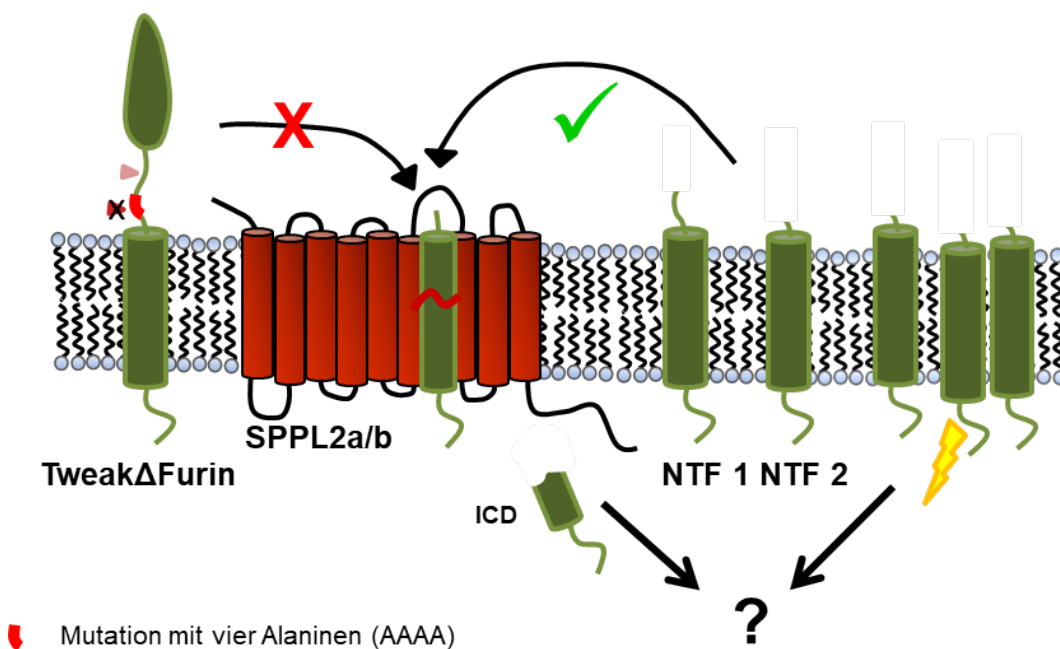


Abbildung 35: Beide N-terminalen Fragmente unterliegen einer Prozessierung durch die Intramembranproteasen SPPL2a und 2b

Sowohl das NTF 1 als auch das NTF 2 akkumulieren durch Inhibierung der Proteasen SPPL2a/2b. Wird die Furinschnittstelle an Position 90-93 modifiziert, findet keine Prozessierung von Tweak durch Furin sowie eine weitere Prozessierung durch SPPL2a/2b statt. Eine Akkumulation der NTFs könnte zu einer intrazellulären Signalweiterleitung führen, oder aber eine, durch die SPPL2a/b-Proteasen, freigesetzte ICD intrazellulär Funktionen ausüben.

Tweak stellt als Mitglied der Familie der Tumor Nekrose Faktoren ein Protein dar, welches nach Prozessierung sowohl über die Freisetzung eines löslichen Ligandens als auch über den in der Membran verbleibenden Rest Einfluss auf die Genexpression ausüben könnte. Die Degradierung von Tweaks NTF setzt vermutlich eine kurze, 18 Aminosäure umfassende Sequenz frei, welche keine Nukleäre Lokalisations Sequenzen (NLS) [202, 203] besitzt. Es ist jedoch beschrieben, dass auch ohne eine NLS eine Translokation in den Nukleus für kleine Proteinfragmente, wie die ICD von Tweak, möglich ist [204].

Eine Analyse bezüglich der möglichen Translokation in den Nukleus und anschließenden Genregulation wurde im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt, siehe Abbildung 13. In diesem Assay wurde mittels Genexpressionanalyse durch einen Microarray untersucht, ob eine modifizierte Genexpression zwischen den Zelllinien mit freigesetzter Tweak-ICD sowie verankerter ICD vorlag. Eine Übersicht der verbliebenen 13, für Proteine kodierende, Gene ist in Tabelle 35 dargestellt. Bei der Transkriptomanalyse handelt es sich lediglich um ein initiales Screening, eine anschließende zwingend notwendige Validierung zur definitiven Interpretation wurde nicht durchgeführt. Die Unterschiede zeigten sich lediglich in schwacher Ausprägung.

Interessant ist die Reduktion der mRNA für das Gen PRKX, codierend für eine Serin / Threoninkinase. Diese spielt eine Rolle für die Differenzierung von myeloischen Zellen [30, 31], für die Angiogenese [32] durch endotheliale Zellproliferation sowie die renale Epithelzellmigration [33-35]. In den Zellen mit dem TEV-Konstrukt fallen reduzierte mRNA-Level gegenüber denen der A7 und pcDNA5.1 Zellen auf. In der Literatur finden sich vielfach Hinweise darauf, dass das lösliche Tweak entscheidend zur Induktion der Neovaskularisation sowohl bei Entzündung als auch im Rahmen von Tumoren beiträgt [125, 162, 190, 205-210]. Es könnte daher sein, dass die Liberierung der ICD von Tweak regulierende Einflüsse auf eine übermäßige Gefäßproliferation hat. So ist es denkbar, dass nach Shedding und Freisetzung des löslichen Tweaks, aber auch bei übermäßiger Expression des membrangebundenen Tweaks, die physiologische Bremse dieses Signalweges in der Degradierung des membrangebundenen Anteils liegt.

Interleukin 1 beta stellt einen potenten Entzündungsmediator dar und spielt eine Rolle bei der TH17 - Zelldifferenzierung [38]. In TEV-Zellen wurden erhöhte mRNA-Spiegel nachgewiesen. Dies geht konform mit aktuellen Forschungsergebnissen, nach welchen Tweak als Mitglied der Tumore Nekrose Faktor Familie eine relevante aktivierende Rolle im Entzündungsprozess spielt [106, 124, 126, 127].

Auch für die Dejodase 1 (DIO1) wurden erhöhte mRNA-Level in TEV-Konstrukten beobachtet. Als wichtiges Enzym im thyreoidischen System katalysiert die DIO1 die Aktivierung sowie die Inaktivierung der Schilddrüsenhormone.

Die mRNA – Spiegel für die Ubiquitin Specific Peptidase 17 (USP 17) und die Six-Transmembrane Epithelial Antigen Of Prostate 1 (STEAP 1) zeigten sich in TEV-Zellen ebenfalls erhöht. USP 17 wird als ein Tumor-Suppressor-Gen beschrieben, so zeigte eine Expression dieser Peptidase in hoch-aggressiven Hirntumoren einen milderen Krankheitsverlauf als in USP 17 negativen Hirntumoren. Bei Überexpression zeigte sich ein reduziertes Tumorstadium [39]. In der Literatur findet sich für eine Reihe verschiedener Hirntumoren, vor allem aber für das Glioblastom, eine Korrelation der Progression und Aggressivität der Tumoren mit der Expression des Fn14 Rezeptor [211-216]. Dieser Rezeptor bindet sowohl das lösliche als auch das membrangebundene Tweak [120, 123, 190, 205, 217-221]. Tweak erhöht die Expression des Fn14 Genes signifikant [222-225] und so stellt sich die Frage ob, und wenn ja, welche Rolle Tweak in der Entwicklung und dem Wachstum von Hirntumoren spielt. Diese wichtige Frage ist mit dem jetzigen Wissenstand noch nicht zu beantworten, die Vielzahl der Studien auf diesem Gebiet zeigen jedoch auf, welches Potential diese Forschungsrichtung für das Verständnis und somit auch der Therapie dieser Tumore haben könnte.

Für die Metalloprotease STEAP 1 wurde eine Überexpression in Prostatakarzinomen beobachtet [40]. Die Expression dieser Protease konnte in eine mögliche Abhängigkeit mit dem Gleason-Score, dem internationalen histologisch-basierten Gradierungssystem für Prostatakarzinome, gesetzt werden [41], was neue diagnostische und mögliche therapeutische Ansätze in Aussicht stellt [42]. Armstrong et al konnten 2016 zeigen, dass Tweak zumindest über den alternativen NFκB-Signalweg mit der Invasivität des Prostatakarzinoms korreliert, somit scheint auch hier das Ergebnis des Microarrays in Einklang mit aktuellen Forschungsergebnissen zu sein.

Für das Gen Kallikrein-related peptidase 7 (KLK7) wurde eine Erhöhung der mRNA-Level bei einer freien ICD im Zytoplasma der Zellen im Vergleich zu A7-Zellen beobachtet. Diese Peptidase wurde mit einer erhöhten Zellproliferation in Verbindung gebracht, so konnte in Kolonkarzinomen eine erhöhte Expression beobachtet werden [36]. Auch in Melanomen wurde eine vermehrte Expression nachgewiesen, in benignen Näevi jedoch wurde keine Variation im Expressionsmuster beschrieben. KLK7 könnte als diagnostische Bedeutung im Sinne eines Tumormarkers zukommen [37]. Sowohl für das kolorektale Karzinom als auch bei Melanomen zeigten sich erhöhte Tweak Expressionsmuster, sodass für Tweak eine prokanzerogene Rolle in Betracht gezogen wurde [110, 224, 226-228]. Erhöhte Tweak-Expression kann gleichzeitig auch in einer vermehrten Degradierung und somit erhöhten ICD-Leveln resultieren. Diese ICD-Level könnten Einfluss auf die Proteinexpression von KLK7 ausüben, die gerade in der Tumorentstehung eine Rolle zu spielen scheint. Jedoch sei zu erwähnen, dass für bestimmte Tumoren eine erhöhte Tweak Expression zu einer erhöhten Apoptoserate, und somit zu reduziertem Tumorstadium, führte [128, 223].

Bekanntermaßen gab diese Eigenschaft dem Protein Tweak und der Tumor Nekrose Faktor Familie ihren Namen.

Die proliferative oder pro-apoptotische Wirkung könnte mit der membran-gebundenen oder der löslichen Form Tweaks assoziiert sein, da diese unterschiedliche Signalwege des NFκB Weges induzieren. In der Literatur existieren verschiedene Ansichten hinsichtlich des exakten Mechanismus der Signaltransduktion von membrangebundenen und löslichem Tweak. In einem Ansatz wurde Tweak gezielt an Zellmembranen gebunden [192]. Dafür wurde ein Konstrukt hergestellt, welches aus dem löslichen Teil von Tweak besteht, das an ein Antikörperfragment gekoppelt ist. Dieses kann so modifiziert werden, dass es an spezifische Antigene auf Zellen bindet. Das Konstrukt besitzt demnach so lange die Eigenschaften löslichen Tweaks, bis es an antigenexprimierende Zellen bindet. Durch diese sekundär membrangebundene Variante besteht nun die Möglichkeit, gezielt eine Aktivierung des klassischen NFκB Signalweges zu induzieren [192].

Andere Studien beschreiben jedoch auch bei löslichem Tweak, wenn auch in geringem Maße, eine Aktivierung des klassischen NFκB Signalweges [111, 200].

Damit bleibt weiterhin zu diskutieren, in welchem Maß eine membrangebundene Variante des Tweak im Unterschied zum löslichen Liganden in die Signalwege eingreift, und ob nicht möglicherweise die Erklärung für die Diversität in der Liberierung der ICD oder in der Degradierung des NTF von Tweak und damit einer möglichen Unterbrechung der Signalweiterleitung liegt. Damit würde der Degradierung von Tweaks NTFs, und somit den SPPL2a und SPPL2b Proteasen eine weitere wichtige Bedeutung zukommen. Die Rolle von Tweak ist im Moment nicht abschließend zu beurteilen, doch die Beispiele zeigen die Relevanz eines besseren Verständnisses hinsichtlich der Funktionsweise und Degradierung dieses Proteins auf.

4.4.2.4. Funktionelle Relevanz der CTLR-Prozessierung

Die Hauptfunktion von Dectin-2 und Mincle liegt in der Induktion einer Signalkaskade und die Cytokinproduktion nach Stimulation dieser Rezeptoren wurde vielfach beschrieben [62, 76, 84, 86, 90, 151, 171, 229]. Diese Initiation einer Signalkaskade birgt die Möglichkeit, auch ohne Phagozytose der CTLRs eine Aktivierung von Immunzellen und die Initiation der Phagozytose durch andere Rezeptoren zu vermitteln [67, 135, 140, 143, 230-233]. Durch die Komplexbildung von Dectin-2 und Mincle mit dem FcRγ, welcher durch ein ITAM-Motiv die Signalweiterleitung in die Zelle zu induzieren vermag [59, 62, 76, 90, 168, 234], können Signalwege aktiviert und die Zytokinsekretion reguliert werden.

Aus diesem Grund erschien eine *in-vitro* Analyse von murinen BMDM und BMDC bezüglich ihrer Zytokinproduktion auf die oben beschriebenen Liganden als geeignetes Verfahren, um zu überprüfen, ob nicht nur ein Abbau von Dectin-2 und Mincle durch SPPL2a und 2b vorliegt, sondern ob tatsächlich auch eine SPPL2a und 2b-abhängige Wirkung auf die Immunantwort bei Behandlung von murinen Abwehrzellen mit PAMPs festzustellen ist.

Dabei wurden die Zytokinantworten von SPPL2a/2b defizienten mit SPPL2a/2b exprimierenden BMDM und BMDC verglichen. Da für Dectin-2 und Mincle eine Funktionalität hinsichtlich der Induktion einer Zytokinantwort beschrieben ist, und hier gezeigt wurde, dass diese zudem Substrate von SPPL2a/2b darstellen, kann nun untersucht werden, ob eine Prozessierung der CTLRs die Immunantwort beeinflusst. Dabei scheint zunächst die Hypothese, dass es durch Degradierung der CTLRs zu einer Unterbrechung der Signalantwort kommt, naheliegend, wie es für LOX-1 beschrieben wurde [50]. Es kann aber auch, aufgrund der dadurch freigesetzten ICD dieser Proteine, zu einer verstärkten Immunantwort nach erfolgter Prozessierung kommen. Eine dritte mögliche Überlegung bestünde in der Annahme, dass sich die Rezeptoren unterschiedlich verhalten, je nachdem in welcher Weise sie an FcR γ binden.

Eine Reduktion in der Zytokinproduktion konnte bei doppelt-defizienten BMDMs und BMDCs für TNF α , IL-12p40 für eine Reihe von Liganden und bei BMDCs und Peritonealmakrophagen für IL-10 bei Zymosanbehandlung beobachtet werden, wie beispielsweise in Abbildung 32 ersichtlich. Eine deutlich vermehrte Zytokinsekretion konnte bezüglich IL-1 β bei Anwesenheit von HKMT und IL-12p70 sowohl bei doppelt-defizienten BMDMs als auch BMDCs gezeigt werden, siehe Abbildung 30.

TNF α , IL-12p40/70 und IL-1 β stellen proinflammatorische Zytokine dar, welche bei der Aktivierung des Immunsystems, beispielsweise durch die Induktion von TH1 und TH17-Zellen eine Rolle spielen [97, 155, 235-240]. IL-10 interagiert als Gegenspieler und verhindert so eine überschießende Immunantwort, welche gravierende Folgen für den Organismus haben könnte.

Dass es zu einer erhöhten Freisetzung von Zytokinen in SPPL2a/2b-defizienten Zellen kommt, ließe sich durch eine fehlende Degradierung der signalweiterleitenden Rezeptoren erklären, die nun ungehindert ihre Funktion ausüben können. Dem liegt die Überlegung zugrunde, dass es durch eine Akkumulation des NTFs zu einer vermehrten Interaktion mit dem FcR γ , oder aber, ähnlich wie bei LOX-1, zu einer Oligomerisierung der NTFs untereinander kommen könnte, die in der Aktivierung einer Signalantwort resultiert.

Ein anderer Ansatz stellt die Überlegung dar, dass beispielsweise die Prozessierung von Dectin-2 mit anschließender Freisetzung der ICD eine Initiation der Signalkaskade möglich macht. So ließe sich, bei SPPL2a/b-defizienten Zellen, die verminderte TNF α -Freisetzung bei Behandlung mit Zymosan erklären. Warum jedoch bei TNF α , IL-12p40 und IL-10 eine

deutlich reduzierte Zytokinproduktion in den doppelt-defizienten Zellen gemessen wurde, erscheint dann überraschend. Hier könnte eine Hypothese, basierend auf den unterschiedlichen Bindungsstellen für FcR γ bei Mincle und Dectin-2, aufgestellt werden: Bei Mincle findet die Bindung an FcR γ an dem Arginin in Position 42, also in der Transmembrandomäne des Proteins, statt. Anders verhält es sich bei Dectin-2, wo in der Transmembrandomäne kein Arginin vorkommt, welches zur Bindung eines ITAM-Signalmoleküls wie den FcR γ benötigt wird. Ein Arginin kommt aber in der ICD von Dectin-2 an Stelle 17 vor und es konnte gezeigt werden, dass die Bindung an FcR γ durch ein in der ICD vorkommendes Arginin vermittelt wird [90, 152]. So könnte eine Degradierung durch SPPL2a/2b eine Unterbrechung der durch Mincle induzierten Signalkaskade bedeuten, wohingegen für Dectin-2 weiterhin eine Signalweiterleitung möglich erscheint. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, warum in SPPL2a/b exprimierenden BMDMs und BMDCs eine Behandlung mit HKMT in einer deutlich geringeren IL-10 Sezernierung resultiert, als bei einer identischen Behandlung von SPPL2a/b defizienten BMDMs und BMDCs, wie in Abbildung 32 zu sehen.

Ein wichtiger Aspekt in der Interpretation der Zytokinproduktion stellt die Berücksichtigung der funktionellen Relevanz von CD74 dar. Bei CD74 handelt es sich um ein Protein in Typ II Orientierung, für welches als erstes eine SPPL2a abhängige Proteolyse *in-vivo* nachgewiesen wurde [47]. Dieses multifunktionale Protein ist maßgeblich an der Antigenpräsentation mittels MHCII, aber auch bei der Regulation des endosomalen Transportes, der Zellmigration oder bei der Induktion von Signalwegen beteiligt [241]. Dies allein legt nahe, dass eine dysfunktionale Degradierung eine deutliche Störung in der empfindlichen Kaskade des Immunsystems darstellen kann. So konnten Schneppenheim, Hüttl et al. 2013 nachweisen, dass es bei Fehlen der Protease SPPL2a zu einer deutlichen Reifestörung der B-Zellen mit Arrest dieser im Stadium T1 sowie einer signifikanten Reduktion von dendritischen Zellen kam [43, 242, 243]. Zudem zeigten B-Zellen eine verminderte Expression der B-Zell aktivierenden Faktor-Rezeptoren (BAFFR) und eine abgeschwächte Induzierung der Signalkaskaden, welche sich abhängig des B-Zell Rezeptors zeigten und beispielsweise über die Splenic Tyrosine kinase (Syk) ablaufen [48]. Dabei stellte vor allem die Akkumulation des NTFs von CD74 die Ursache dieser unreifen B-Zellen dar. Auch die Initiierung intrazellulärer Signalkaskaden stellt eine wichtige Funktion von CD74 dar. Als Rezeptor für Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) wird so die Aktivierung einer Immunantwort, unter anderem auch über die Ausschüttung weiterer Zytokine, induziert [244-246]. In diesem Kontext müssen Zytokinanalysen in Zellsystemen, welchen SPPL2a fehlt, vorsichtig betrachtet werden. Die Beteiligung der Zytokinantwort durch die Akkumulation des NTFs von CD74 scheint zumindest in BMDCs, und in abgeschwächter Form auch in Makrophagen, von Relevanz zu sein. Untersuchung zur

Reproduzierbarkeit der hier dargestellten Ergebnisse in einem Mausmodell, welches sich sowohl defizient in SPPL2a und CD74 zeigt, ist demnach sinnvoll, um abzuschätzen, ob die hier beobachteten Effekte auch dort nachzuweisen, und somit unabhängig von CD74, sind. Dies wurde durch Gradtke et al. [247] durchgeführt und die Zytokinantworten auf die Stimuli HKMT sowie BCG von murine BMDCs verglichen. Dabei wurden (a) Wildtyp-BMDCs, (b) BMDCs, welche sich defizient für SPPL2a zeigen und (c) BMDCs, welchen sowohl SPPL2a als auch CD74 fehlt, verwendet. Damit umgeht man die weiter oben beschriebene Problematik einer CD74 NTF Akkumulation und einer daraus resultierenden Beeinträchtigung von B-Zellen. Hierbei zeigten sich Unterschiede in Bezug auf die Sekretion von IL-10, IL-1 β und bei TNF α [247]. IL-10 betreffend wurde eine signifikante Reduktion der Zytokinsekretion bei SPPL2a Knockout BMDCs im Vergleich zum Wildtyp beobachtet. In den BMDCs, welchen sowohl CD74 als auch SPPL2a fehlt zeigte sich hingegen kein Unterschied zu den Wildtyp BMDCs. Damit kann die verminderte IL-10 Sekretion auf die CD74 NTF Akkumulation zurückgeführt werden. In dieser Arbeit wurde ebenfalls eine signifikante IL-10 Reduktion beobachtet (siehe Abbildung 32), die somit auch CD74 abhängig ist.

Hinsichtlich IL-1 β wurde eine signifikante Elevation der Sekretion im SPPL2a Knockout zu den Wildtyp BMDCs beschrieben [247]. Da dieser Effekt ebenfalls in den SPPL2a/CD74 defizienten BMDCs aufgehoben wird, kann für CD74 auch in Bezug auf die IL-1 β Sekretion eine wichtige Rolle präsumiert werden. In dieser Arbeit zeigte sich eine signifikante Erhöhung der IL-1 β Sekretion (siehe Abbildung 30), dieser Effekt scheint demnach auch nicht primär von den CLRn abzuhängen.

Im Falle von TNF α wurden für SPPL2a defiziente BMDCs eine erhöhte Sekretion beschrieben. Hier zeigte sich jedoch im SPPL2a/CD74 defizientem Vergleich kein gleichsinniger oder aufgehobener Effekt, sondern eine signifikante Reduktion der TNF α -Sekretion. Auch in dieser Arbeit zeigte sich eine Reduktion der Sekretion (Abbildung 29). Damit kann der Rückschluss erfolgen, dass ein Fehlen von SPPL2a, unabhängig von der Rolle der Protease in Bezug auf CD74, einen Effekt auf die Zytokinsekretion von TNF α , bei Anwesenheit von Liganden der CLRn, ausübt. Dies könnte vereinbar sein mit der gestörten Prozessierung von Dectin-1, Dectin-2 oder aber Mincle. Auch die Sekretion von IL-12, unter anderem mit den Vertretern IL-12p40 und IL-12p70, wurde untersucht. Dabei zeigte sich keine Veränderung der Zytokinsekretion, weder für den SPPL2a Knockout, noch für den SPPL2a/CD74 Knockout, in Bezug auf die Wildtyp BMDCs. In dieser Arbeit zeigten sich jedoch signifikante Effekte, sowohl für IL-12p40 als auch IL-12p70 (Abbildung 31). Der Doppelknockout SPPL2a/2b wies eine relevante Reduktion der IL-12p40 Sekretion im Vergleich zu dem Wildtyp auf. Eine signifikante Erhöhung der Zytokinsekretion zeigte sich in Bezug auf IL-12p70 bei dem Doppelknockout im Vergleich zu den Wildtyp BMDCs (siehe

Abbildung 31), wobei sich jedoch keine Variation einer Zytokinantwort hinsichtlich der Anwesenheit eines Ligandens zeigte. Damit zeigt sich ein signifikanter Unterschied der Zytokinsekretion zwischen SPPL2a Knockout und SPPL2a/2b Knockout BMDCs sowohl für TNF α als auch für IL-12p40 sowie IL-12p70 auf. Interessant wäre eine Analyse der Zytokinsekretion in SPPL2b Knockout BMDCs, welche Hinweise auf die funktionelle Relevanz von SPPL2b bieten könnte. Dies ist insofern insbesondere für die CTLRs Dectin-2 und Mincle interessant, da SPPL2b an der Plasmamembran anzutreffen ist, wohingegen SPPL2a im endolysosomalen Kompartiment angesiedelt ist. Da diese beiden Rezeptoren nicht primär an der Phagozytose beteiligt zu sein scheinen, könnte demnach eine Prozessierung vor allem durch SPPL2b stattfinden. Die Unterschiede der Zytokinantworten zwischen SPPL2a und SPPL2a/2b Knockout BMDCs könnte demnach indirekt den Rückschluss zulassen, dass diese CTLRs aufgrund ihrer gestörten Prozessierung, möglicherweise durch SPPL2b, an der Modulation der Zytokinsekretion beteiligt sind. Letztendlich sollte aber darauf hingewiesen werden, dass in einem so komplexen System wie dem Immunsystem eine Betrachtung einzelner Proteine immer mit Einschränkungen verbunden ist. Die genaue Funktion und ihre Beteiligung bei der Modulierung einer Immunantwort sind für die Familie der CTLRs ungeklärt und sollten weiterhin Gegenstand intensiver Forschung darstellen. Das detailliertere Verständnis dieser besonderen Rezeptorengruppe birgt vielfältige Möglichkeiten für die Etablierung geeigneter Therapieverfahren. Da die Mitglieder der CTLRs sich bezüglich ihrer Pathogenbindung zu unterstützen scheinen, kann eine Möglichkeit, diese über ihren Abbau zu beeinflussen, einen wichtigen Ansatz darstellen.

4.5. Ausblick

Die in dieser Arbeit neu identifizierten Substrate für die Intramembranproteasen SPPL2a und SPPL2b werfen viele neue Fragen auf.

So zeigten sich für die NTFs von Tweak eine Prozessierung durch SPPL2a und SPPL2b. Die Freisetzung einer ICD von Tweak führt möglicherweise zu einer Veränderung in der Genexpression. Hier könnte eine genauere Analyse der Lokalisation der ICD Aufschluss über deren Funktionalität ermöglichen. In Frage würde dafür ein Assay kommen, welcher auf dem Prinzip des *β -galactosidase enzyme fragment complementation* (β GEFC) Systems beruht. Dabei wird ein Fragment an die ICD von Tweak gebunden. Transloziert die ICD in den Zellkern und trifft dort auf das Gegenstück, so kann die katalytische Aktivität nachgewiesen werden. Auch eine genauere Untersuchung der einzelnen Signalkaskaden und die Relevanz der Anwesenheit der NTFs auf die Aktivität derselben könnte interessante Resultate erzielen.

Für die beiden CTLRs Dectin-2 und Mincle stellt die genauere Untersuchung der Pathogenbindung eine wichtige Säule in der weiteren Interpretation dar. Hier könnten zunächst die verwendeten Liganden mit einem Fluoreszenzmarker markiert und so eine Ko-Lokalisierung der Rezeptoren mit dem Liganden nachgewiesen werden. Würde eine Pathogenbindung zweifelsfrei nachgewiesen, könnte die Beteiligung an der Phagozytose weiter entschlüsselt werden. Auch die Verwendung spezifischer Antikörper gegen die CRD der Rezeptoren könnten Hinweise auf eine Spezifität der Signalkaskaden und Zytokinsekretion ermöglichen. Die Interpretation der Zytokinantwort in einem reinen SPPL2b Knockout wäre ebenfalls sehr interessant und aufschlussreich für das weitere Verständnis der pathophysiologischen Rolle von SPPL2b.

Ein weiterer wichtiger Punkt stellt für alle drei Proteine eine Analyse der endogenen NTFs in Knockout Mausmodellen dar. Hier wären spezifische, gegen das N-terminale Ende des Proteins gerichtete Antikörper sehr interessant. Damit würde der Nachweis endogenen Tweaks, Dectin-2 und Mincle gelingen, sowie der Nachweis einer Akkumulation der NTFs auch *in-vivo*.

5. Zusammenfassung

Das Immunsystem spielt eine zentrale Rolle bei zahlreichen Erkrankungen und eine genaue Kenntnis der Mechanismen, die zur Aktivierung oder Hemmung führen, ist für rationale Strategien in der Entwicklung neuer Pharmaka unerlässlich.

Die Intramembranproteasen *Signal Peptide Peptidase Like* (SPPL) 2a und 2b prozessieren Proteine, welche in Typ II Orientierung in der Zellmembran vorliegen. Dabei zeichnen sie sich durch die Fähigkeit aus, Proteine in der hydrophoben Membran zu spalten und beteiligen sich demnach an dem Prozess der Regulierten Intramembranen Proteolyse (RIP).

Ein Freisetzen der, in das Zytosol der Zelle ragenden, Fragmente kann Einfluss auf die Funktionalität der Zelle haben, wie beispielsweise die Modulation der Proteinbiosynthese durch Translokation des Fragmentes in den Nukleolus oder aber durch eine Interaktion in die komplexen intrazellulären Signalkaskaden. In dieser Arbeit wurden Proteine hinsichtlich einer möglichen Proteolyse von SPPL2a und SPPL2b untersucht.

Bei dem *tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis* (Tweak) handelt es sich um ein Protein aus der Familie der Tumor Nekrose Faktoren. In dieser Arbeit konnte, nach initialer Prozessierung durch die Protease Furin sowie einer unbekanntenen Protease, eine weitere Proteolyse durch die beiden Intramembranproteasen nachgewiesen werden. Zudem wurde mithilfe einer Transkriptomanalyse die Wirkung der, durch die Prozessierung von SPPL2a und 2b freigesetzten, intrazellulären Domäne von Tweak auf eine veränderte Genexpression untersucht.

Bei den *Macrophage inducible Ca²⁺-dependent lectin receptor* (Mincle) und *Dendritic cell-associated C-type lectin-2* (Dectin-2) handelt es sich um zwei Proteine aus der Gruppe der C-type lectin Rezeptoren, welche eine zentrale Rolle bei der Immunantwort auf Pilze und Bakterien spielen. Hier wurde erstmals eine SPPL2a und SPPL2b abhängige Degradierung beider Proteine nachgewiesen werden. Bei diesen Versuchen zeigte sich ferner, dass eine Oberflächenlokalisation in humanen Standardzelllinien epithelialen Ursprungs nicht gelingt. Die funktionelle Analyse wurde daher in einer stabil, viral-transduzierten murinen Makrophagenzelllinie durchgeführt. Als Liganden wurden unter anderem Zymosan und hitze-inaktiverter *Candida albicans* verwendet. Anders als beispielsweise bei Dectin-1 zeigte sich hier nach Ligandenbindung keine Internalisierung, sodass die Funktionen dieser beiden Rezeptoren in der Induktion einer Immunantwort, beispielsweise durch Zytokine, zu liegen scheint.

Aus diesem Grund wurde in Immunzellen von doppelt-defizienten Mäusen für SPPL2a und SPPL2b im Vergleich zu Wildtypzellen die Bildung von Reaktiven Sauerstoffspezies sowie von Zytokinen dieser Zellen in Abhängigkeit verschiedener Liganden untersucht und interpretiert. Hier zeigten sich zum Teil deutliche Unterschiede zwischen Immunzellen, die beide Proteasen exprimieren und solchen von SPPL2a/2b Knockout Mäusen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Tweak, Dectin-2 und Mincle Substrate der beiden Intramembranproteasen SPPL2a und SPPL2b darstellen.

Mit einer nähereren Betrachtung der möglichen Funktionen der intrazellulären Domäne von Tweak, sowie der Analyse der Immunantworten in SPPL2a und SPPL2b defizienten Mäusen in Anwesenheit von pathogenen Liganden wurde damit ein weiterer Schritt hin zu einem besseren Verständnis der pathophysiologischen Rolle dieser beiden Proteasen im immunologischen Geschehen ermöglicht.

6. Literaturverzeichnis

1. Wolfe, M.S., et al., *Are presenilins intramembrane-cleaving proteases? Implications for the molecular mechanism of Alzheimer's disease*. *Biochemistry*, 1999. **38**(35): p. 11223-30.
2. Krogh, A., et al., *Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes*. *J Mol Biol*, 2001. **305**(3): p. 567-80.
3. von Heijne, G., *The membrane protein universe: what's out there and why bother?* *J Intern Med*, 2007. **261**(6): p. 543-57.
4. Lemberg, M.K., et al., *Intramembrane proteolysis of signal peptides: an essential step in the generation of HLA-E epitopes*. *J Immunol*, 2001. **167**(11): p. 6441-6.
5. Lemberg, M.K., et al., *Mechanism of intramembrane proteolysis investigated with purified rhomboid proteases*. *EMBO J*, 2005. **24**(3): p. 464-72.
6. Weihofen, A., et al., *Identification of signal peptide peptidase, a presenilin-type aspartic protease*. *Science*, 2002. **296**(5576): p. 2215-8.
7. Ponting, C.P., et al., *Identification of a novel family of presenilin homologues*. *Hum Mol Genet*, 2002. **11**(9): p. 1037-44.
8. Rawson, R.B., et al., *Complementation cloning of S2P, a gene encoding a putative metalloprotease required for intramembrane cleavage of SREBPs*. *Mol Cell*, 1997. **1**(1): p. 47-57.
9. Brown, M.S., et al., *Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans*. *Cell*, 2000. **100**(4): p. 391-8.
10. Lemberg, M.K., *Intramembrane proteolysis in regulated protein trafficking*. *Traffic*, 2011. **12**(9): p. 1109-18.
11. Lal, M. and M. Caplan, *Regulated intramembrane proteolysis: signaling pathways and biological functions*. *Physiology (Bethesda)*, 2011. **26**(1): p. 34-44.
12. Avci, D. and M.K. Lemberg, *Clipping or Extracting: Two Ways to Membrane Protein Degradation*. *Trends Cell Biol*, 2015. **25**(10): p. 611-22.
13. Bergbold, N. and M.K. Lemberg, *Emerging role of rhomboid family proteins in mammalian biology and disease*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1828**(12): p. 2840-8.
14. Fluhrer, R., et al., *A gamma-secretase-like intramembrane cleavage of TNFalpha by the GxGD aspartyl protease SPPL2b*. *Nat Cell Biol*, 2006. **8**(8): p. 894-6.

15. Urban, S. and M. Freeman, *Intramembrane proteolysis controls diverse signalling pathways throughout evolution*. *Curr Opin Genet Dev*, 2002. **12**(5): p. 512-8.
16. Weihofen, A. and B. Martoglio, *Intramembrane-cleaving proteases: controlled liberation of proteins and bioactive peptides*. *Trends Cell Biol*, 2003. **13**(2): p. 71-8.
17. Brown, M.S. and J.L. Goldstein, *A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(20): p. 11041-8.
18. Horton, J.D., et al., *Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(21): p. 12027-32.
19. De Strooper, B., et al., *A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain*. *Nature*, 1999. **398**(6727): p. 518-22.
20. Kimberly, W.T., et al., *The intracellular domain of the beta-amyloid precursor protein is stabilized by Fe65 and translocates to the nucleus in a notch-like manner*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(43): p. 40288-92.
21. Schroeter, E.H., J.A. Kisslinger, and R. Kopan, *Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain*. *Nature*, 1998. **393**(6683): p. 382-6.
22. Sakai, J., et al., *Sterol-regulated release of SREBP-2 from cell membranes requires two sequential cleavages, one within a transmembrane segment*. *Cell*, 1996. **85**(7): p. 1037-46.
23. Urban, S., J.R. Lee, and M. Freeman, *Drosophila rhomboid-1 defines a family of putative intramembrane serine proteases*. *Cell*, 2001. **107**(2): p. 173-82.
24. Yamasaki, A., et al., *The GxGD motif of presenilin contributes to catalytic function and substrate identification of gamma-secretase*. *J Neurosci*, 2006. **26**(14): p. 3821-8.
25. Krawitz, P., et al., *Differential localization and identification of a critical aspartate suggest non-redundant proteolytic functions of the presenilin homologues SPPL2b and SPPL3*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(47): p. 39515-23.
26. Martin, L., R. Fluhrer, and C. Haass, *Substrate requirements for SPPL2b-dependent regulated intramembrane proteolysis*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(9): p. 5662-70.
27. Francis, R., et al., *aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation*. *Dev Cell*, 2002. **3**(1): p. 85-97.

28. Gu, Y., et al., *APH-1 interacts with mature and immature forms of presenilins and nicastrin and may play a role in maturation of presenilin.nicastrin complexes*. J Biol Chem, 2003. **278**(9): p. 7374-80.
29. Lee, S.F., et al., *Mammalian APH-1 interacts with presenilin and nicastrin and is required for intramembrane proteolysis of amyloid-beta precursor protein and Notch*. J Biol Chem, 2002. **277**(47): p. 45013-9.
30. Friedmann, E., et al., *Consensus analysis of signal peptide peptidase and homologous human aspartic proteases reveals opposite topology of catalytic domains compared with presenilins*. J Biol Chem, 2004. **279**(49): p. 50790-8.
31. Voss, M., B. Schroder, and R. Fluhner, *Mechanism, specificity, and physiology of signal peptide peptidase (SPP) and SPP-like proteases*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1828**(12): p. 2828-39.
32. Kuhn, P.H., et al., *Secretome analysis identifies novel signal Peptide peptidase-like 3 (Sppl3) substrates and reveals a role of Sppl3 in multiple Golgi glycosylation pathways*. Mol Cell Proteomics, 2015. **14**(6): p. 1584-98.
33. Voss, M., et al., *Shedding of glycan-modifying enzymes by signal peptide peptidase-like 3 (SPPL3) regulates cellular N-glycosylation*. EMBO J, 2014. **33**(24): p. 2890-905.
34. Behnke, J., et al., *Signal-peptide-peptidase-like 2a (SPPL2a) is targeted to lysosomes/late endosomes by a tyrosine motif in its C-terminal tail*. FEBS Lett, 2011. **585**(19): p. 2951-7.
35. Schneppenheim, J., et al., *Signal-peptide-peptidase-like 2a is required for CD74 intramembrane proteolysis in human B cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2014. **451**(1): p. 48-53.
36. Mentrup, T., R. Fluhner, and B. Schroder, *Latest emerging functions of SPP/SPPL intramembrane proteases*. Eur J Cell Biol, 2017. **96**(5): p. 372-382.
37. Mentrup, T., et al., *Signal peptide peptidase and SPP-like proteases - Possible therapeutic targets?* Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2017. **1864**(11 Pt B): p. 2169-2182.
38. Niemeyer, J., et al., *The intramembrane protease SPPL2c promotes male germ cell development by cleaving phospholamban*. EMBO Rep, 2019. **20**(3).
39. Papadopoulou, A.A., et al., *Signal Peptide Peptidase-Like 2c (SPPL2c) impairs vesicular transport and cleavage of SNARE proteins*. EMBO Rep, 2019. **20**(3).
40. Fleck, D., et al., *Proteolytic Processing of Neuregulin 1 Type III by Three Intramembrane-cleaving Proteases*. The Journal of biological chemistry, 2016. **291**(1): p. 318-333.

41. Voss, M., et al., *Foamy virus envelope protein is a substrate for signal peptide peptidase like-3 (SPPL3)*. J Biol Chem, 2012.
42. Freeman, M., *Rhomboid proteases and their biological functions*. Annu Rev Genet, 2008. **42**: p. 191-210.
43. Schneppenheim, J., et al., *The intramembrane proteases signal Peptide peptidase-like 2a and 2b have distinct functions in vivo*. Mol Cell Biol, 2014. **34**(8): p. 1398-411.
44. Fluhrer, R., et al., *Intramembrane proteolysis of GXGD-type aspartyl proteases is slowed by a familial Alzheimer disease-like mutation*. J Biol Chem, 2008. **283**(44): p. 30121-8.
45. Bronckers, A.L., et al., *The intramembrane protease SPPL2A is critical for tooth enamel formation*. J Bone Miner Res, 2013.
46. Schneppenheim, J., et al., *The intramembrane protease SPPL2a promotes B cell development and controls endosomal traffic by cleavage of the invariant chain*. J Exp Med, 2012.
47. Schneppenheim, J., et al., *The intramembrane proteases signal Peptide peptidase-like 2a and 2b have distinct functions in vivo*. Mol Cell Biol, 2014. **34**(8): p. 1398-411.
48. Hüttl, S., et al., *Processing of CD74 by the Intramembrane Protease SPPL2a Is Critical for B Cell Receptor Signaling in Transitional B Cells*. J Immunol, 2015. **195**(4): p. 1548-63.
49. Hüttl, S., et al., *Substrate determinants of signal peptide peptidase-like 2a (SPPL2a)-mediated intramembrane proteolysis of the invariant chain CD74*. Biochem J, 2016. **473**(10): p. 1405-22.
50. Mentrup, T., et al., *Atherogenic LOX-1 signaling is controlled by SPPL2-mediated intramembrane proteolysis*. J Exp Med, 2019. **216**(4): p. 807-830.
51. Di Pietro, N., G. Formoso, and A. Pandolfi, *Physiology and pathophysiology of oxLDL uptake by vascular wall cells in atherosclerosis*. Vascul Pharmacol, 2016.
52. Steinberg, D., et al., *Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity*. N Engl J Med, 1989. **320**(14): p. 915-24.
53. Gimbrone, M.A., Jr. and G. García-Cardena, *Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis*. Circ Res, 2016. **118**(4): p. 620-36.
54. Cominacini, L., et al., *Oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) binding to ox-LDL receptor-1 in endothelial cells induces the activation of NF-kappaB through an increased production of intracellular reactive oxygen species*. J Biol Chem, 2000. **275**(17): p. 12633-8.

55. Mehta, J.L., *The role of LOX-1, a novel lectin-like receptor for oxidized low density lipoprotein, in atherosclerosis*. Can J Cardiol, 2004. **20 Suppl B**: p. 32B-36B.
56. Chen, K., et al., *Adhesion molecule expression in fibroblasts: alteration in fibroblast biology after transfection with LOX-1 plasmids*. Hypertension, 2005. **46**(3): p. 622-7.
57. Hoving, J.C., G.J. Wilson, and G.D. Brown, *Signalling C-type lectin receptors, microbial recognition and immunity*. Cell Microbiol, 2014. **16**(2): p. 185-94.
58. LeibundGut-Landmann, S., et al., *Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17*. Nat Immunol, 2007. **8**(6): p. 630-8.
59. Robinson, M.J., et al., *Dectin-2 is a Syk-coupled pattern recognition receptor crucial for Th17 responses to fungal infection*. J Exp Med, 2009. **206**(9): p. 2037-51.
60. Drummond, R.A., et al., *The role of Syk/CARD9 coupled C-type lectins in antifungal immunity*. Eur J Immunol, 2011. **41**(2): p. 276-81.
61. Kumagai, Y. and S. Akira, *Identification and functions of pattern-recognition receptors*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(5): p. 985-92.
62. Kanazawa, N., *Dendritic cell immunoreceptors: C-type lectin receptors for pattern-recognition and signaling on antigen-presenting cells*. J Dermatol Sci, 2007. **45**(2): p. 77-86.
63. Kingeter, L.M. and X. Lin, *C-type lectin receptor-induced NF-kappaB activation in innate immune and inflammatory responses*. Cell Mol Immunol, 2012. **9**(2): p. 105-12.
64. Portnoy, J.M., P.B. Williams, and C.S. Barnes, *Innate Immune Responses to Fungal Allergens*. Curr Allergy Asthma Rep, 2016. **16**(9): p. 62.
65. Henderson, R.A., et al., *HLA-A2.1-associated peptides from a mutant cell line: a second pathway of antigen presentation*. Science, 1992. **255**(5049): p. 1264-6.
66. Mentrup, T., et al., *Phagosomal signalling of the C-type lectin receptor Dectin-1 is terminated by intramembrane proteolysis*. Nat Commun, 2022. **13**(1): p. 1880.
67. Matsumoto, M., et al., *A novel LPS-inducible C-type lectin is a transcriptional target of NF-IL6 in macrophages*. J Immunol, 1999. **163**(9): p. 5039-48.
68. Ariizumi, K., et al., *Cloning of a second dendritic cell-associated C-type lectin (dectin-2) and its alternatively spliced isoforms*. J Biol Chem, 2000. **275**(16): p. 11957-63.

69. Gavino, A.C., et al., *Identification and expression profiling of a human C-type lectin, structurally homologous to mouse dectin-2*. *Exp Dermatol*, 2005. **14**(4): p. 281-8.
70. Hermanz-Falcon, P., et al., *Cloning of human DECTIN-1, a novel C-type lectin-like receptor gene expressed on dendritic cells*. *Immunogenetics*, 2001. **53**(4): p. 288-95.
71. Bonkobara, M., et al., *Epidermal Langerhans cell-targeted gene expression by a dectin-2 promoter*. *J Immunol*, 2001. **167**(12): p. 6893-900.
72. Arce, I., et al., *The human C-type lectin CLECSF8 is a novel monocyte/macrophage endocytic receptor*. *Eur J Immunol*, 2004. **34**(1): p. 210-20.
73. Kawata, K., et al., *Mincle and human B cell function*. *J Autoimmun*, 2012. **39**(4): p. 315-22.
74. Zhao, G., et al., *The role of Mincle in innate immune to fungal keratitis*. *J Infect Dev Ctries*, 2017. **11**(1): p. 89-97.
75. Wells, C.A., et al., *The macrophage-inducible C-type lectin, mincle, is an essential component of the innate immune response to Candida albicans*. *J Immunol*, 2008. **180**(11): p. 7404-13.
76. Yamasaki, S., et al., *C-type lectin Mincle is an activating receptor for pathogenic fungus, Malassezia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(6): p. 1897-902.
77. Kerscher, B., J.A. Willment, and G.D. Brown, *The Dectin-2 family of C-type lectin-like receptors: an update*. *Int Immunol*, 2013. **25**(5): p. 271-7.
78. Ishikawa, T., et al., *Identification of distinct ligands for the C-type lectin receptors Mincle and Dectin-2 in the pathogenic fungus Malassezia*. *Cell Host Microbe*, 2013. **13**(4): p. 477-88.
79. Kottom, T.J., et al., *The Interaction of Pneumocystis with the C-Type Lectin Receptor Mincle Exerts a Significant Role in Host Defense against Infection*. *J Immunol*, 2017. **198**(9): p. 3515-3525.
80. Goyal, S., et al., *The Interaction of Human Pathogenic Fungi With C-Type Lectin Receptors*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 1261.
81. Schoenen, H., et al., *Cutting edge: Mincle is essential for recognition and adjuvanticity of the mycobacterial cord factor and its synthetic analog trehalose-dibehenate*. *J Immunol*, 2010. **184**(6): p. 2756-60.
82. Bugarcic, A., et al., *Human and mouse macrophage-inducible C-type lectin (Mincle) bind Candida albicans*. *Glycobiology*, 2008. **18**(9): p. 679-85.

83. Behler, F., et al., *Role of Mincle in alveolar macrophage-dependent innate immunity against mycobacterial infections in mice*. J Immunol, 2012. **189**(6): p. 3121-9.
84. Marakalala, M.J., L.M. Graham, and G.D. Brown, *The role of Syk/CARD9-coupled C-type lectin receptors in immunity to Mycobacterium tuberculosis infections*. Clin Dev Immunol, 2010. **2010**: p. 567571.
85. Matsunaga, I. and D.B. Moody, *Mincle is a long sought receptor for mycobacterial cord factor*. J Exp Med, 2009. **206**(13): p. 2865-8.
86. Yamasaki, S., et al., *Mincle is an ITAM-coupled activating receptor that senses damaged cells*. Nat Immunol, 2008. **9**(10): p. 1179-88.
87. Seifert, L., et al., *The necrosome promotes pancreatic oncogenesis via CXCL1 and Mincle-induced immune suppression*. Nature, 2016. **532**(7598): p. 245-9.
88. Miyake, Y., et al., *Self and nonself recognition through C-type lectin receptor, Mincle*. Self Nonself, 2010. **1**(4): p. 310-313.
89. Mori, D., K. Shibata, and S. Yamasaki, *C-Type Lectin Receptor Dectin-2 Binds to an Endogenous Protein beta-Glucuronidase on Dendritic Cells*. PLoS One, 2017. **12**(1): p. e0169562.
90. Sato, K., et al., *Dectin-2 is a pattern recognition receptor for fungi that couples with the Fc receptor gamma chain to induce innate immune responses*. J Biol Chem, 2006. **281**(50): p. 38854-66.
91. McGreal, E.P., et al., *The carbohydrate-recognition domain of Dectin-2 is a C-type lectin with specificity for high mannose*. Glycobiology, 2006. **16**(5): p. 422-30.
92. Brown, G.D., et al., *Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages*. J Exp Med, 2002. **196**(3): p. 407-12.
93. Saijo, S., et al., *Dectin-2 recognition of alpha-mannans and induction of Th17 cell differentiation is essential for host defense against Candida albicans*. Immunity, 2010. **32**(5): p. 681-91.
94. Feinberg, H., et al., *Mechanism of pathogen recognition by human dectin-2*. J Biol Chem, 2017. **292**(32): p. 13402-13414.
95. Shibata, N., et al., *The cell wall galactomannan antigen from Malassezia furfur and Malassezia pachydermatis contains beta-1,6-linked linear galactofuranosyl residues and its detection has diagnostic potential*. Microbiology, 2009. **155**(Pt 10): p. 3420-9.
96. Wang, H., et al., *C-type lectin receptors differentially induce th17 cells and vaccine immunity to the endemic mycosis of North America*. J Immunol, 2014. **192**(3): p. 1107-19.

97. Wuthrich, M., et al., *Fonsecaea pedrosoi*-induced Th17-cell differentiation in mice is fostered by Dectin-2 and suppressed by Mincle recognition. *Eur J Immunol*, 2015. **45**(9): p. 2542-52.
98. Lobato-Pascual, A., et al., *Mincle*, the receptor for mycobacterial cord factor, forms a functional receptor complex with MCL and *FcepsilonRI-gamma*. *Eur J Immunol*, 2013. **43**(12): p. 3167-74.
99. Zhu, L.L., et al., *C-type lectin receptors Dectin-3 and Dectin-2 form a heterodimeric pattern-recognition receptor for host defense against fungal infection*. *Immunity*, 2013. **39**(2): p. 324-34.
100. Yan, X., et al., *Dectin-2 Deficiency Modulates Th1 Differentiation and Improves Wound Healing After Myocardial Infarction*. *Circ Res*, 2017.
101. Netea, M.G., et al., *An integrated model of the recognition of Candida albicans by the innate immune system*. *Nat Rev Microbiol*, 2008. **6**(1): p. 67-78.
102. Vautier, S., G. Sousa Mda, and G.D. Brown, *C-type lectins, fungi and Th17 responses*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2010. **21**(6): p. 405-12.
103. Desel, C., et al., *The Mincle-activating adjuvant TDB induces MyD88-dependent Th1 and Th17 responses through IL-1R signaling*. *PLoS One*, 2013. **8**(1): p. e53531.
104. Chicheportiche, Y., et al., *TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(51): p. 32401-10.
105. Hehlgans, T. and K. Pfeffer, *The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games*. *Immunology*, 2005. **115**(1): p. 1-20.
106. Polek, T.C., et al., *TWEAK mediates signal transduction and differentiation of RAW264.7 cells in the absence of Fn14/TweakR. Evidence for a second TWEAK receptor*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(34): p. 32317-23.
107. Michaelson, J.S., et al., *Development of an Fn14 agonistic antibody as an anti-tumor agent*. *MAbs*, 2011. **3**(4): p. 362-75.
108. Bodmer, J.L., P. Schneider, and J. Tschopp, *The molecular architecture of the TNF superfamily*. *Trends Biochem Sci*, 2002. **27**(1): p. 19-26.
109. Gilmore, T.D., *Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives*. *Oncogene*, 2006. **25**(51): p. 6680-6684.
110. Kawakita, T., et al., *Functional expression of TWEAK in human colonic adenocarcinoma cells*. *Int J Oncol*, 2005. **26**(1): p. 87-93.
111. Roos, C., et al., *Soluble and transmembrane TNF-like weak inducer of apoptosis differentially activate the classical and*

- noncanonical NF-kappa B pathway*. J Immunol, 2010. **185**(3): p. 1593-605.
112. Marsters, S.A., et al., *Identification of a ligand for the death-domain-containing receptor Apo3*. Curr Biol, 1998. **8**(9): p. 525-8.
 113. Kirkin, V., et al., *The Fas ligand intracellular domain is released by ADAM10 and SPPL2a cleavage in T-cells*. Cell Death Differ, 2007. **14**(9): p. 1678-87.
 114. Friedmann, E., et al., *SPPL2a and SPPL2b promote intramembrane proteolysis of TNFalpha in activated dendritic cells to trigger IL-12 production*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(8): p. 843-8.
 115. Winkles, J.A., *The TWEAK-Fn14 cytokine-receptor axis: discovery, biology and therapeutic targeting*. Nat Rev Drug Discov, 2008. **7**(5): p. 411-25.
 116. Winkles, J.A., et al., *Role of TWEAK and Fn14 in tumor biology*. Front Biosci, 2007. **12**: p. 2761-71.
 117. Winkles, J.A., N.L. Tran, and M.E. Berens, *TWEAK and Fn14: new molecular targets for cancer therapy?* Cancer Lett, 2006. **235**(1): p. 11-7.
 118. Wiley, S.R., et al., *A novel TNF receptor family member binds TWEAK and is implicated in angiogenesis*. Immunity, 2001. **15**(5): p. 837-46.
 119. Wiley, S.R. and J.A. Winkles, *TWEAK, a member of the TNF superfamily, is a multifunctional cytokine that binds the TweakR/Fn14 receptor*. Cytokine Growth Factor Rev, 2003. **14**(3-4): p. 241-9.
 120. Bossen, C., et al., *Interactions of tumor necrosis factor (TNF) and TNF receptor family members in the mouse and human*. J Biol Chem, 2006. **281**(20): p. 13964-71.
 121. Ye, H., et al., *The structural basis for the recognition of diverse receptor sequences by TRAF2*. Mol Cell, 1999. **4**(3): p. 321-30.
 122. Schneider, P., et al., *TWEAK can induce cell death via endogenous TNF and TNF receptor 1*. Eur J Immunol, 1999. **29**(6): p. 1785-92.
 123. Brown, S.A., et al., *The Fn14 cytoplasmic tail binds tumour-necrosis-factor-receptor-associated factors 1, 2, 3 and 5 and mediates nuclear factor-kappaB activation*. Biochem J, 2003. **371**(Pt 2): p. 395-403.
 124. Desplat-Jego, S., et al., *TWEAK is expressed by glial cells, induces astrocyte proliferation and increases EAE severity*. J Neuroimmunol, 2002. **133**(1-2): p. 116-23.
 125. Lynch, C.N., et al., *TWEAK induces angiogenesis and proliferation of endothelial cells*. J Biol Chem, 1999. **274**(13): p. 8455-9.

126. Harada, N., et al., *Pro-inflammatory effect of TWEAK/Fn14 interaction on human umbilical vein endothelial cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. **299**(3): p. 488-93.
127. Saas, P., et al., *TWEAK stimulation of astrocytes and the proinflammatory consequences*. *Glia*, 2000. **32**(1): p. 102-7.
128. Nakayama, M., et al., *Multiple pathways of TWEAK-induced cell death*. *J Immunol*, 2002. **168**(2): p. 734-43.
129. Nakayama, M., et al., *Involvement of TWEAK in interferon gamma-stimulated monocyte cytotoxicity*. *J Exp Med*, 2000. **192**(9): p. 1373-80.
130. Nakayama, M., et al., *Fibroblast growth factor-inducible 14 mediates multiple pathways of TWEAK-induced cell death*. *J Immunol*, 2003. **170**(1): p. 341-8.
131. Boname, J.M., et al., *Cleavage by signal peptide peptidase is required for the degradation of selected tail-anchored proteins*. *J Cell Biol*, 2014. **205**(6): p. 847-62.
132. Fluhrer, R. and C. Haass, *Signal peptide peptidases and gamma-secretase: cousins of the same protease family?* *Neurodegener Dis*, 2007. **4**(2-3): p. 112-6.
133. Weihofen, A., et al., *Release of signal peptide fragments into the cytosol requires cleavage in the transmembrane region by a protease activity that is specifically blocked by a novel cysteine protease inhibitor*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(40): p. 30951-6.
134. Ishikawa, E., et al., *Direct recognition of the mycobacterial glycolipid, trehalose dimycolate, by C-type lectin Mincle*. *J Exp Med*, 2009. **206**(13): p. 2879-88.
135. Taylor, P.R., et al., *Dectin-2 is predominantly myeloid restricted and exhibits unique activation-dependent expression on maturing inflammatory monocytes elicited in vivo*. *Eur J Immunol*, 2005. **35**(7): p. 2163-74.
136. Vijayan, D., et al., *Mincle polarizes human monocyte and neutrophil responses to *Candida albicans**. *Immunol Cell Biol*, 2012. **90**(9): p. 889-95.
137. Kerscher, B., et al., *Mycobacterial receptor, *Clec4d* (CLECSF8, MCL), is coregulated with Mincle and upregulated on mouse myeloid cells following microbial challenge*. *Eur J Immunol*, 2016. **46**(2): p. 381-9.
138. Kerscher, B., et al., *Signalling through MyD88 drives surface expression of the mycobacterial receptors MCL (*Clecsf8*, *Clec4d*) and Mincle (*Clec4e*) following microbial stimulation*. *Microbes Infect*, 2016. **18**(7-8): p. 505-9.

139. Rodríguez, N., et al., *MyD88-dependent changes in the pulmonary transcriptome after infection with Chlamydia pneumoniae*. *Physiol Genomics*, 2007. **30**(2): p. 134-45.
140. Patin, E.C., et al., *Mincle-mediated anti-inflammatory IL-10 response counter-regulates IL-12 in vitro*. *Innate Immun*, 2016. **22**(3): p. 181-5.
141. Sharma, A., et al., *Mincle regulates autophagy to control neutrophil extracellular trap formation*. *J Infect Dis*, 2017.
142. Sharma, A., et al., *Protective role of Mincle in bacterial pneumonia by regulation of neutrophil mediated phagocytosis and extracellular trap formation*. *J Infect Dis*, 2014. **209**(11): p. 1837-46.
143. Richardson, M.B., et al., *Mycobacterium tuberculosis beta-gentiobiosyl diacylglycerides signal through the pattern recognition receptor Mincle: total synthesis and structure activity relationships*. *Chem Commun (Camb)*, 2015. **51**(81): p. 15027-30.
144. Rahal, A., et al., *Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay*. *Biomed Res Int*, 2014. **2014**: p. 761264.
145. Xiao, Y., et al., *Targeting CBLB as a potential therapeutic approach for disseminated candidiasis*. *Nat Med*, 2016.
146. Mentrup, T., et al., *A Cell-Based Assay Reveals Nuclear Translocation of Intracellular Domains Released by SPPL Proteases*. *Traffic*, 2015. **16**(8): p. 871-92.
147. Miyake, Y., O.H. Masatsugu, and S. Yamasaki, *C-Type Lectin Receptor MCL Facilitates Mincle Expression and Signaling through Complex Formation*. *J Immunol*, 2015. **194**(11): p. 5366-74.
148. Ariizumi, K., et al., *Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(26): p. 20157-67.
149. Yokota, K., et al., *Identification of a human homologue of the dendritic cell-associated C-type lectin-1, dectin-1*. *Gene*, 2001. **272**(1-2): p. 51-60.
150. Grunebach, F., et al., *Molecular and functional characterization of human Dectin-1*. *Exp Hematol*, 2002. **30**(11): p. 1309-15.
151. Gross, O., et al., *Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity*. *Nature*, 2006. **442**(7103): p. 651-6.
152. Saijo, S. and Y. Iwakura, *Dectin-1 and Dectin-2 in innate immunity against fungi*. *Int Immunol*, 2011. **23**(8): p. 467-72.
153. Yonekawa, A., et al., *Dectin-2 is a direct receptor for mannose-capped lipoarabinomannan of mycobacteria*. *Immunity*, 2014. **41**(3): p. 402-13.

154. Sun, H., et al., *Activation of NF-kappaB and respiratory burst following Aspergillus fumigatus stimulation of macrophages*. Immunobiology, 2014. **219**(1): p. 25-36.
155. Deng, Z., et al., *Tyrosine phosphatase SHP-2 mediates C-type lectin receptor-induced activation of the kinase Syk and anti-fungal TH17 responses*. Nat Immunol, 2015. **16**(6): p. 642-52.
156. Kaether, C., C. Haass, and H. Steiner, *Assembly, trafficking and function of gamma-secretase*. Neurodegener Dis, 2006. **3**(4-5): p. 275-83.
157. Kim, S.H., et al., *Evidence that assembly of an active gamma-secretase complex occurs in the early compartments of the secretory pathway*. J Biol Chem, 2004. **279**(47): p. 48615-9.
158. Capell, A., et al., *Gamma-secretase complex assembly within the early secretory pathway*. J Biol Chem, 2005. **280**(8): p. 6471-8.
159. Miyake, Y., et al., *C-type lectin MCL is an FcRgamma-coupled receptor that mediates the adjuvanticity of mycobacterial cord factor*. Immunity, 2013. **38**(5): p. 1050-62.
160. Hu, S., et al., *Characterization of TNFRSF19, a novel member of the tumor necrosis factor receptor superfamily*. Genomics, 1999. **62**(1): p. 103-7.
161. Donohue, P.J., et al., *TWEAK is an endothelial cell growth and chemotactic factor that also potentiates FGF-2 and VEGF-A mitogenic activity*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(4): p. 594-600.
162. Kawakita, T., et al., *Functional expression of TWEAK in human hepatocellular carcinoma: possible implication in cell proliferation and tumor angiogenesis*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **318**(3): p. 726-33.
163. Sugito, T., et al., *Transient TWEAK overexpression leads to a general salivary epithelial cell proliferation*. Oral Dis, 2009. **15**(1): p. 76-81.
164. Desplat-Jego, S., et al., *TWEAK is expressed at the cell surface of monocytes during multiple sclerosis*. J Leukoc Biol, 2009. **85**(1): p. 132-5.
165. Kataria, N.G., et al., *Expression of tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) and its receptor, fibroblast growth factor-inducible 14 protein (Fn14), in healthy tissues and in tissues affected by periodontitis*. J Periodontal Res, 2010. **45**(4): p. 564-73.
166. Flornes, L.M., et al., *Identification of lectin-like receptors expressed by antigen presenting cells and neutrophils and their mapping to a novel gene complex*. Immunogenetics, 2004. **56**(7): p. 506-17.

167. Bonkobara, M., et al., *Identification and gene expression of bovine C-type lectin dectin-2*. *Vet Immunol Immunopathol*, 2006. **110**(1-2): p. 179-86.
168. Graham, L.M. and G.D. Brown, *The Dectin-2 family of C-type lectins in immunity and homeostasis*. *Cytokine*, 2009. **48**(1-2): p. 148-55.
169. Yabe, R., Y. Iwakura, and S. Saijo, *The Role of C-Type Lectin Receptors C-type lectin receptors in the Host Defense Against Microbial Pathogens Pathogens*, in *Glycoscience: Biology and Medicine*, T. Endo, et al., Editors. 2021, Springer Japan: Tokyo. p. 1-10.
170. Mora-Montes, H.M., et al., *Recognition and blocking of innate immunity cells by Candida albicans chitin*. *Infect Immun*, 2011. **79**(5): p. 1961-70.
171. Bi, L., et al., *CARD9 mediates dectin-2-induced I κ B kinase ubiquitination leading to activation of NF- κ B in response to stimulation by the hyphal form of Candida albicans*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(34): p. 25969-77.
172. Shiokawa, M., S. Yamasaki, and S. Saijo, *C-type lectin receptors in anti-fungal immunity*. *Curr Opin Microbiol*, 2017. **40**: p. 123-130.
173. Ashbee, H.R. and E.G.V. Evans, *Immunology of Diseases Associated with Malassezia Species*. *Clinical Microbiology Reviews*, 2002. **15**(1): p. 21-57.
174. Chinthamani, S., et al., *Macrophage inducible C-type lectin (Mincle) recognizes glycosylated surface (S)-layer of the periodontal pathogen Tannerella forsythia*. *PLOS ONE*, 2017. **12**(3): p. e0173394.
175. Rabes, A., et al., *The C-type lectin receptor Mincle binds to Streptococcus pneumoniae but plays a limited role in the anti-pneumococcal innate immune response*. *PLoS One*, 2015. **10**(2): p. e0117022.
176. Lee, W.B., et al., *Mincle activation enhances neutrophil migration and resistance to polymicrobial septic peritonitis*. *Sci Rep*, 2017. **7**: p. 41106.
177. Li, K. and D.M. Underhill, *C-Type Lectin Receptors in Phagocytosis*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2020.
178. Kimura, Y., et al., *The innate immune receptor Dectin-2 mediates the phagocytosis of cancer cells by Kupffer cells for the suppression of liver metastasis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016. **113**(49): p. 14097-14102.
179. Geijtenbeek, T.B., et al., *Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function*. *J Exp Med*, 2003. **197**(1): p. 7-17.

180. Cambi, A., et al., *The C-type lectin DC-SIGN (CD209) is an antigen-uptake receptor for Candida albicans on dendritic cells.* European Journal of Immunology, 2003. **33**(2): p. 532-538.
181. Garcia-Vallejo, J.J. and Y. van Kooyk, *The physiological role of DC-SIGN: a tale of mice and men.* Trends Immunol, 2013. **34**(10): p. 482-6.
182. Taylor, P.R., et al., *The Role of SIGNR1 and the β -Glucan Receptor (Dectin-1) in the Nonopsonic Recognition of Yeast by Specific Macrophages.* The Journal of Immunology, 2004. **172**(2): p. 1157.
183. Huysamen, C., et al., *CLEC9A is a novel activation C-type lectin-like receptor expressed on BDCA3+ dendritic cells and a subset of monocytes.* J Biol Chem, 2008. **283**(24): p. 16693-701.
184. Moriwaki, H., et al., *Ligand specificity of LOX-1, a novel endothelial receptor for oxidized low density lipoprotein.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998. **18**(10): p. 1541-7.
185. Sudbery, P.E., *Growth of Candida albicans hyphae.* Nat Rev Microbiol, 2011. **9**(10): p. 737-48.
186. Lv, L.L., et al., *The pattern recognition receptor, Mincle, is essential for maintaining the M1 macrophage phenotype in acute renal inflammation.* Kidney International, 2017. **91**(3): p. 587-602.
187. Martin, L., et al., *Regulated intramembrane proteolysis of Bri2 (Itm2b) by ADAM10 and SPPL2a/SPPL2b.* J Biol Chem, 2008. **283**(3): p. 1644-52.
188. Brady, O.A., X. Zhou, and F. Hu, *Regulated intramembrane proteolysis of the frontotemporal lobar degeneration risk factor, TMEM106B, by signal peptide peptidase-like 2a (SPPL2a).* J Biol Chem, 2014. **289**(28): p. 19670-80.
189. Remacle, A.G., et al., *Substrate cleavage analysis of furin and related proprotein convertases. A comparative study.* J Biol Chem, 2008. **283**(30): p. 20897-906.
190. Brown, S.A., A. Ghosh, and J.A. Winkles, *Full-length, membrane-anchored TWEAK can function as a juxtacrine signaling molecule and activate the NF-kappaB pathway.* J Biol Chem, 2010. **285**(23): p. 17432-41.
191. <J. Biol. Chem.-1997-Chicheportiche-32401-10.pdf>.
192. Trebing, J., et al., *Analyzing the signaling capabilities of soluble and membrane TWEAK.* Methods Mol Biol, 2014. **1155**: p. 31-45.
193. Raiborg, C. and H. Stenmark, *The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins.* Nature, 2009. **458**(7237): p. 445-52.
194. Saksena, S. and S.D. Emr, *ESCRTs and human disease.* Biochem Soc Trans, 2009. **37**(Pt 1): p. 167-72.

195. Stuffers, S., A. Brech, and H. Stenmark, *ESCRT proteins in physiology and disease*. Exp Cell Res, 2009. **315**(9): p. 1619-26.
196. Katzmann, D.J., M. Babst, and S.D. Emr, *Ubiquitin-Dependent Sorting into the Multivesicular Body Pathway Requires the Function of a Conserved Endosomal Protein Sorting Complex, ESCRT-I*. Cell, 2001. **106**(2): p. 145-155.
197. Dukes, J.D., et al., *A dominant-negative ESCRT-III protein perturbs cytokinesis and trafficking to lysosomes*. Biochem J, 2008. **411**(2): p. 233-9.
198. Huotari, J. and A. Helenius, *Endosome maturation*. The EMBO journal, 2011. **30**(17): p. 3481-3500.
199. Wirnsberger, G., et al., *Inhibition of CBLB protects from lethal Candida albicans sepsis*. Nat Med, 2016.
200. Wajant, H., *The TWEAK-Fn14 system as a potential drug target*. Br J Pharmacol, 2013. **170**(4): p. 748-64.
201. Horiuchi, T., et al., *Transmembrane TNF- : structure, function and interaction with anti-TNF agents*. Rheumatology, 2010. **49**(7): p. 1215-1228.
202. De Ketelaere, A., et al., *Involvement of GSK-3beta in TWEAK-mediated NF-kappaB activation*. FEBS Lett, 2004. **566**(1-3): p. 60-4.
203. Baxter, F.O., et al., *IKKbeta/2 induces TWEAK and apoptosis in mammary epithelial cells*. Development, 2006. **133**(17): p. 3485-94.
204. Paine, P.L., L.C. Moore, and S.B. Horowitz, *Nuclear envelope permeability*. Nature, 1975. **254**(5496): p. 109-14.
205. Ameri, H., et al., *TWEAK/Fn14 pathway is a novel mediator of retinal neovascularization*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014. **55**(2): p. 801-13.
206. Blanco-Colio, L.M., et al., *Vascular proteomics and the discovery process of clinical biomarkers: The case of TWEAK*. Proteomics Clin Appl, 2011. **5**(5-6): p. 281-8.
207. Chen, D.Y. and G.F. Su, *Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis association with proliferative diabetic retinopathy and promotes proliferation and collagen synthesis in retinal ARPE-19 cells*. Genet Mol Res, 2016. **15**(1).
208. Dore-Duffy, P., *Pericytes and adaptive angioplasticity: the role of tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK)*. Methods Mol Biol, 2014. **1135**: p. 35-52.
209. Ho, D.H., et al., *Soluble tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis overexpression in HEK293 cells promotes tumor growth and angiogenesis in athymic nude mice*. Cancer Res, 2004. **64**(24): p. 8968-72.

210. Jakubowski, A., et al., *Dual role for TWEAK in angiogenic regulation*. *J Cell Sci*, 2002. **115**(Pt 2): p. 267-74.
211. Cherry, E.M., et al., *Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) promotes glioma cell invasion through induction of NF-kappaB-inducing kinase (NIK) and noncanonical NF-kappaB signaling*. *Mol Cancer*, 2015. **14**: p. 9.
212. Dhruv, H.D., et al., *Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) promotes glioblastoma cell chemotaxis via Lyn activation*. *Carcinogenesis*, 2014. **35**(1): p. 218-26.
213. Duran, C.L., et al., *NIK regulates MT1-MMP activity and promotes glioma cell invasion independently of the canonical NF-kappaB pathway*. *Oncogenesis*, 2016. **5**(6): p. e231.
214. Fortin, S.P., et al., *Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis stimulation of glioma cell survival is dependent on Akt2 function*. *Mol Cancer Res*, 2009. **7**(11): p. 1871-81.
215. Fortin, S.P., et al., *Cdc42 and the guanine nucleotide exchange factors Ect2 and trio mediate Fn14-induced migration and invasion of glioblastoma cells*. *Mol Cancer Res*, 2012. **10**(7): p. 958-68.
216. Perez, J.G., et al., *The TWEAK receptor Fn14 is a potential cell surface portal for targeted delivery of glioblastoma therapeutics*. *Oncogene*, 2016. **35**(17): p. 2145-55.
217. Blanco-Colio, L.M., et al., *TWEAK and Fn14. New players in the pathogenesis of atherosclerosis*. *Front Biosci*, 2007. **12**: p. 3648-55.
218. Brown, S.A., et al., *TWEAK binding to the Fn14 cysteine-rich domain depends on charged residues located in both the A1 and D2 modules*. *Biochem J*, 2006. **397**(2): p. 297-304.
219. Burkly, L.C., *Regulation of Tissue Responses: The TWEAK/Fn14 Pathway and Other TNF/TNFR Superfamily Members That Activate Non-Canonical NFkappaB Signaling*. *Front Immunol*, 2015. **6**: p. 92.
220. Burkly, L.C., J.S. Michaelson, and T.S. Zheng, *TWEAK/Fn14 pathway: an immunological switch for shaping tissue responses*. *Immunol Rev*, 2011. **244**(1): p. 99-114.
221. Campbell, S., et al., *The role of TWEAK/Fn14 in the pathogenesis of inflammation and systemic autoimmunity*. *Front Biosci*, 2004. **9**: p. 2273-84.
222. Armstrong, C.L., et al., *TWEAK activation of the non-canonical NF-kappaB signaling pathway differentially regulates melanoma and prostate cancer cell invasion*. *Oncotarget*, 2016. **7**(49): p. 81474-81492.

223. Sanz, A.B., et al., *Inflammatory cytokines and survival factors from serum modulate tweak-induced apoptosis in PC-3 prostate cancer cells*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e47440.
224. Zhou, H., et al., *The TWEAK receptor Fn14 is a therapeutic target in melanoma: immunotoxins targeting Fn14 receptor for malignant melanoma treatment*. J Invest Dermatol, 2013. **133**(4): p. 1052-62.
225. Tran, N.L., et al., *Increased fibroblast growth factor-inducible 14 expression levels promote glioma cell invasion via Rac1 and nuclear factor-kappaB and correlate with poor patient outcome*. Cancer Res, 2006. **66**(19): p. 9535-42.
226. Hu, G., W. Zeng, and Y. Xia, *TWEAK/Fn14 signaling in tumors*. Tumour Biol, 2017. **39**(6): p. 1010428317714624.
227. Lin, B.R., et al., *Prognostic significance of TWEAK expression in colorectal cancer and effect of its inhibition on invasion*. Ann Surg Oncol, 2012. **19 Suppl 3**: p. S385-94.
228. Yoriki, R., et al., *Therapeutic potential of the TWEAK/Fn14 pathway in intractable gastrointestinal cancer*. Exp Ther Med, 2011. **2**(1): p. 103-108.
229. Ritter, M., et al., *Schistosoma mansoni triggers Dectin-2, which activates the Nlrp3 inflammasome and alters adaptive immune responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(47): p. 20459-64.
230. Xie, Y., et al., *Human albumin attenuates excessive innate immunity via inhibition of microglial Mincle/Syk signaling in subarachnoid hemorrhage*. Brain Behav Immun, 2017. **60**: p. 346-360.
231. Gross, O., et al., *Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence*. Nature, 2009. **459**(7245): p. 433-6.
232. Patin, E.C., et al., *Trehalose dimycolate interferes with FcgammaR-mediated phagosome maturation through Mincle, SHP-1 and FcgammaRIIB signalling*. PLoS One, 2017. **12**(4): p. e0174973.
233. Carter, R.W., et al., *Induction of CD8+ T cell responses through targeting of antigen to Dectin-2*. Cell Immunol, 2006. **239**(2): p. 87-91.
234. Watson, S.P., et al., *The role of ITAM- and ITIM-coupled receptors in platelet activation by collagen*. Thromb Haemost, 2001. **86**(1): p. 276-88.
235. Kiyotake, R., et al., *Human Mincle Binds to Cholesterol Crystals and Triggers Innate Immune Responses*. J Biol Chem, 2015. **290**(42): p. 25322-32.

236. Lee, W.B., et al., *Mincle-mediated translational regulation is required for strong nitric oxide production and inflammation resolution*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 11322.
237. Lee, M.J., et al., *Phosphoinositide 3-Kinase delta Regulates Dectin-2 Signaling and the Generation of Th2 and Th17 Immunity*. J Immunol, 2016. **197**(1): p. 278-87.
238. Yoshikawa, F.S., et al., *Dectin-1 and Dectin-2 promote control of the fungal pathogen Trichophyton rubrum independently of IL-17 and adaptive immunity in experimental deep dermatophytosis*. Innate Immun, 2016. **22**(5): p. 316-24.
239. Akahori, Y., et al., *Dectin-2-dependent host defense in mice infected with serotype 3 Streptococcus pneumoniae*. BMC Immunol, 2016. **17**: p. 1.
240. Haabeth, O.A., et al., *Interleukin-1 is required for cancer eradication mediated by tumor-specific Th1 cells*. Oncoimmunology, 2016. **5**(1): p. e1039763.
241. Schroder, B., *The multifaceted roles of the invariant chain CD74-More than just a chaperone*. Biochim Biophys Acta, 2016. **1863**(6 Pt A): p. 1269-81.
242. Beisner, D.R., et al., *The intramembrane protease Sppl2a is required for B cell and DC development and survival via cleavage of the invariant chain*. J Exp Med, 2012.
243. Bergmann, H., et al., *B cell survival, surface BCR and BAFFR expression, CD74 metabolism, and CD8- dendritic cells require the intramembrane endopeptidase SPPL2A*. J Exp Med, 2012.
244. Valino-Rivas, L., et al., *CD74 in Kidney Disease*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 483.
245. Borghese, F. and F.I.L. Clanchy, *CD74: an emerging opportunity as a therapeutic target in cancer and autoimmune disease*. Expert Opinion on Therapeutic Targets, 2011. **15**(3): p. 237-251.
246. Calandra, T. and T. Roger, *Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity*. Nature Reviews Immunology, 2003. **3**(10): p. 791-800.
247. Gradtke, A.C., et al., *Deficiency of the Intramembrane Protease SPPL2a Alters Antimycobacterial Cytokine Responses of Dendritic Cells*. J Immunol, 2021. **206**(1): p. 164-180.

7. Anhang

7.4. Weitere Abbildungen

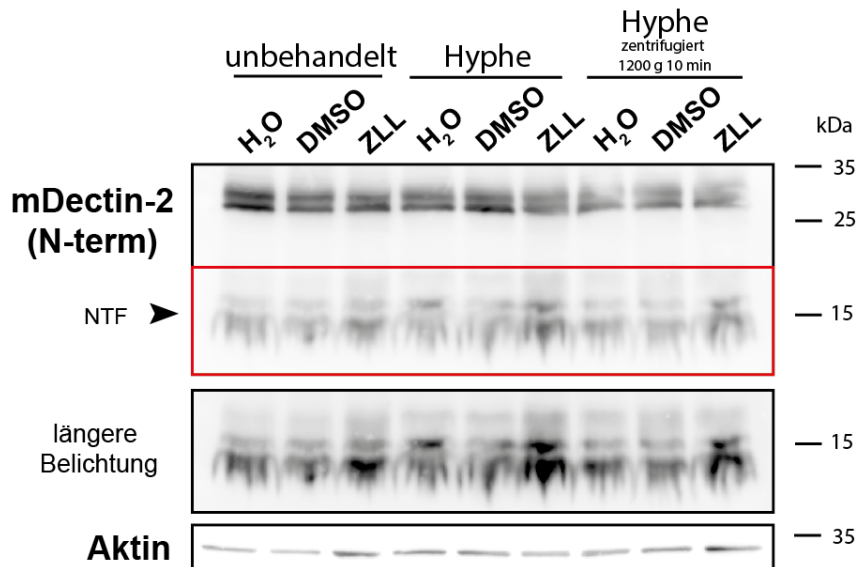


Abbildung 36: J774.E Makrophagen wurden stabil mit HA-mDectin-2-FLAG transduziert und für 6 h mit Wasser, DMSO oder 40 μ M ZLL behandelt. Nach 30 Minuten wurden die Zellen zudem mit *Candida albicans* Hyphen (1:10) behandelt.

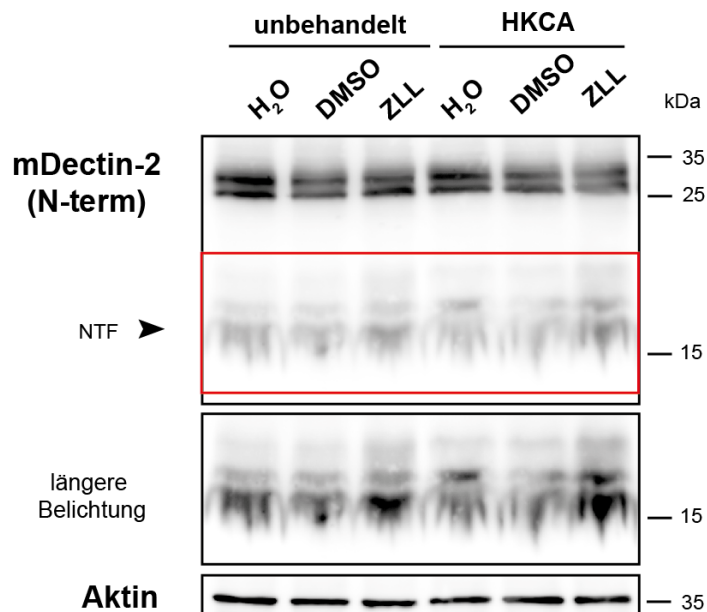


Abbildung 37: J774.E Makrophagen wurden stabil mit HA-mDectin 2-FLAG transduziert und mit Wasser, DMSO oder 40 μ M ZLL für 6 h behandelt. 30 min nach ZLL-Behandlung wurden die Zellen zudem mit dem potenziellen Liganden *heat-killed Candida albicans* (MOI 10) behandelt.

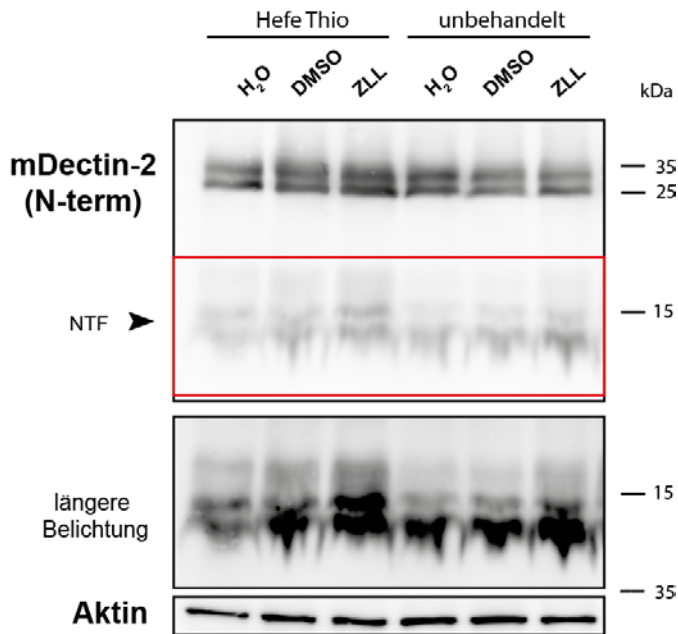


Abbildung 38: J774.E Makrophagen wurden stabil mit HA-mDectin 2-FLAG transduziert und mit Wasser, DMSO oder 40 μ M ZLL für 6 h behandelt. 30 min nach ZLL-Behandlung wurden die Zellen zudem mit *Candida albicans* Hefen, welche durch Thiosulfat inaktiviert wurden, behandelt (MOI 10).

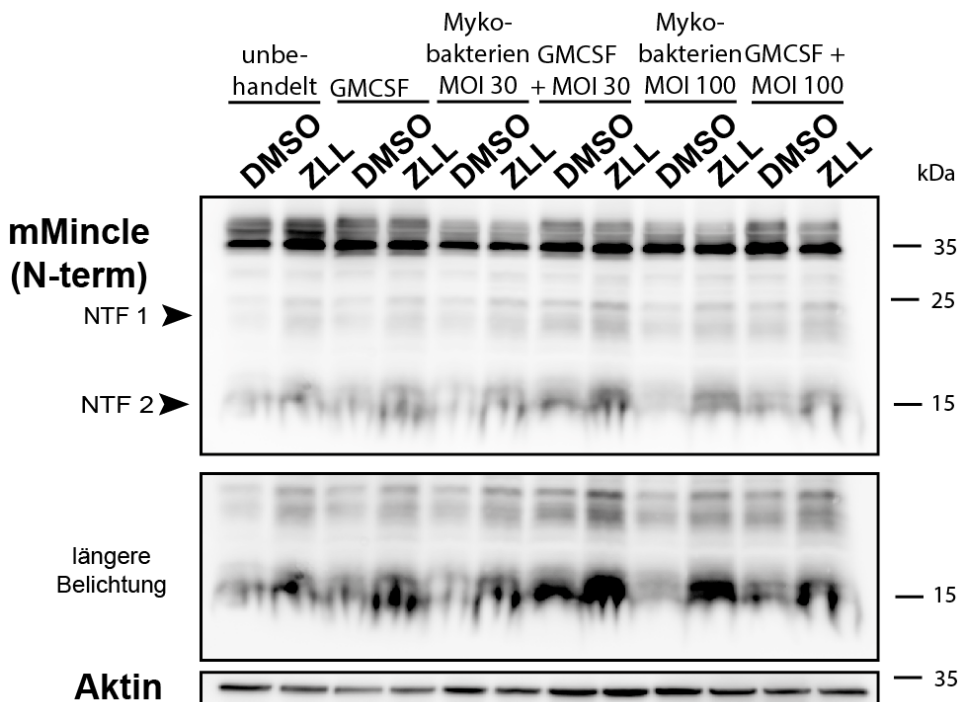


Abbildung 39: J774.E Makrophagen wurden stabil mit HA-Mincle-FLAG transduziert und mit DMSO oder 40 μ M ZLL für 6 h behandelt. 30 min nach ZLL-Behandlung wurden die Zellen zudem mit dem *Mycobacterium bovis* *Bacille Calmette-Guérin* entsprechend der angegebenen MOI behandelt.

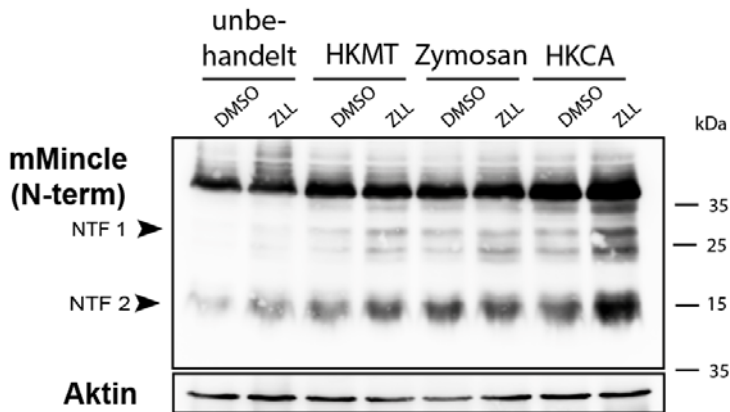


Abbildung 40: J774.E Makrophagen wurden stabil mit HA-Mincle-FLAG transduziert und mit DMSO oder 20 μ M ZLL für 6 h behandelt. 30 min nach ZLL-Behandlung wurden die Zellen zudem mit den angegebenen Liganden behandelt (100 μ g/ml HKMT, 100 μ g/ml Zym und HKCA MOI = 10).

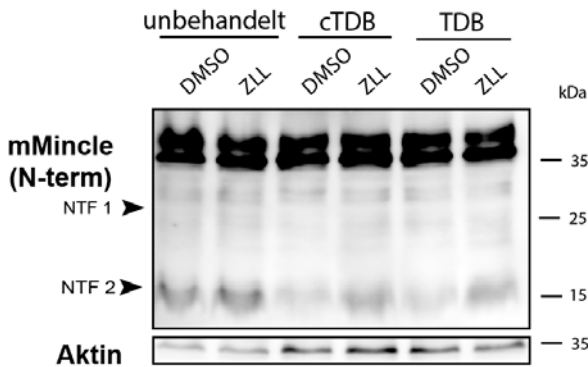


Abbildung 41: J774.E Makrophagen wurden stabil mit HA-Mincle-FLAG transduziert und mit DMSO oder 20 μ M ZLL für 6 h behandelt. 30 min nach ZLL-Behandlung wurden die Zellen zudem mit 50 μ g/ml des mutmaßlichen Liganden Trehalose-6,6-dibehenate (TDB) behandelt, wobei einmal zuvor TDB, ebenfalls 50 μ g/ml, an die Kulturgefäße unter Verwendung von Isopropanol fixiert wurden (cTDB).

7.5. Liste der Abbildungen

Abbildung 1:	Schema der regulierten Intramembranproteolyse (RIP).....	2
Abbildung 2:	Darstellung der verschiedenen Intramembranproteasen	3
Abbildung 3:	Die Degradierungsvarianten der verschiedenen	4
Abbildung 4:	Untergruppen der C-typ Lektin Rezeptoren (CTRL).....	9
Abbildung 5:	Durch die Bindung eines Liganden an Dectin-1 erfolgt die Internalisierung und Prozessierung des Rezeptors	11
Abbildung 6:	BMDC- und BMDM-Differenzierung aus dem Knochenmark von Mäusen	30
Abbildung 7:	HA-mTweak wird an die Zelloberfläche transportiert.....	50
Abbildung 8:	Murines Tweak wird	51
Abbildung 9:	Die NTFs des Glykoproteins Tweak wurden durch verschiedene Inhibitoren nicht beeinflusst.....	52
Abbildung 10:	Die NTFs von Tweak werden durch SPPL2a sowie SPPL2b proteolytisch prozessiert.....	54
Abbildung 11:	Die Prozessierung von Tweak wird durch den Inhibitor (Z-LL) ₂ -Ketone (ZLL) beeinflusst.....	55
Abbildung 12:	Die Prozessierung von Tweak wird durch die Protease Furin beeinflusst	56
Abbildung 13:	Design eines Modells zur Überexpression der Tweak ICD.....	58
Abbildung 14:	Induzierbare Freisetzung der putativen Tweak-ICD in T-Rex 293-Zellen	59
Abbildung 15:	Analyse der Prozessierung von Dectin-2 und Mincle in HEK-Zellen	63
Abbildung 16:	HA-mDectin-2 und HA-mMincle werden in HeLa-Zellen nicht an der	64
Abbildung 17:	Unter Kotransfektion mit MCL und FcR γ erfolgt keine proteolytische Prozessierung von Dectin-2 und Mincle in HEK-Zellen	66
Abbildung 18:	Die Kotransfektion mit MCL-myc und FcR γ -V5 bewirkt keine relevante Oberflächenlokalisierung von Dectin-2 und Mincle in HeLa-Zellen.....	68
Abbildung 19:	Fehlende Oberflächenlokalisierung von Dectin-2 und Mincle trotz Koexpression mit MCL und FcR γ	69

Abbildung 20: MCL und FcR γ werden verstärkt in myeloiden Zelllinien exprimiert	70
Abbildung 21: Stabile Transduktion muriner Makrophagen mithilfe von Viren	71
Abbildung 22: Dectin-2 und Mincle werden in J774.E Zellen an der Oberfläche exprimiert.....	72
Abbildung 23: In endolysosomalen Kompartimenten werden NTFs von mDectin-2 (A) als auch die NTFs von mMincle (B) generiert.....	73
Abbildung 24: Mittels FACS-Analysen konnte bei mDectin-2 (A) und mMincle (B) nach Ligandenexposition keine ausgerägte Internalisierung beobachtet werden	75
Abbildung 25: J774.E Makrophagen exprimieren SPPL2a und SPPL2b	76
Abbildung 26: Die Prozessierung von Dectin-2 und Mincle wird durch den Inhibitor ZLL beeinflusst.....	77
Abbildung 27: CTLR- und TLR-Liganden beeinflussen die Expression von SPPL2	80
Abbildung 28: Defizienz für SPPL2a/b hat keinen Einfluss auf die Generierung..	81
Abbildung 29: Einfluss von SPPL2-Proteasen auf die Sekretion von TNF α	83
Abbildung 30: SPPL2a und 2b defiziente BMDCs und BMDMs produzieren signifikant	84
Abbildung 31: SPPL2a/b-Doppeldefizienz beeinflusst die Sekretion verschiedener Zytokine der IL-12-Familie	85
Abbildung 32: SPPL2a/b doppelt-defiziente BMDCs zeigen eine deutlich verringerte	86
Abbildung 33: Prozessierung des Volllängenproteins Tweak in zwei N-terminale	94
Abbildung 34: Vergleich des lysosomalen Abbaus von Proteinen mit dem ESCRT-Weg.....	97
Abbildung 35: Beide N-terminalen Fragmente unterliegen einer Prozessierung durch die Intramembranproteasen SPPL2a und 2b	99
Abbildung 36: J774.E Makrophagen wurden stabil mit HA-mDectin-2-FLAG transduziert und für 6 h mit Wasser, DMSO oder 40 μ M ZLL behandelt. Nach 30 Minuten wurden die Zellen zudem mit <i>Candida albicans</i> Hyphen (1:10) behandelt.	128
Abbildung 37: J774.E Makrophagen wurden stabil mit HA-mDectin 2-FLAG transduziert und mit Wasser, DMSO oder 40 μ M ZLL für 6 h behandelt. 30 min nach	

ZLL-Behandlung wurden die Zellen zudem mit dem potenziellen Liganden <i>heat-killed Candida albicans</i> (MOI 10) behandelt.	128
Abbildung 38: J774.E Makrophagen wurden stabil mit HA-mDectin 2-FLAG transduziert und mit Wasser, DMSO oder 40 µM ZLL für 6 h behandelt. 30 min nach ZLL-Behandlung wurden die Zellen zudem mit <i>Candida albicans</i> Hefen, welche durch Thiosulfat inaktiviert wurden, behandelt (MOI 10).	129
Abbildung 39: J774.E Makrophagen wurden stabil mit HA-Mincle-FLAG transduziert und mit DMSO oder 40 µM ZLL für 6 h behandelt. 30 min nach ZLL-Behandlung wurden die Zellen zudem mit dem <i>Mycobacterium bovis Bacille Calmette–Guérin</i> entsprechend der angegebenen MOI behandelt.	129
Abbildung 40: J774.E Makrophagen wurden stabil mit HA-Mincle-FLAG transduziert und mit DMSO oder 20 µM ZLL für 6 h behandelt. 30 min nach ZLL-Behandlung wurden die Zellen zudem mit den angegebenen Liganden behandelt (100 µg/ml HKMT, 100 µg/ml Zym und HKCA MOI = 10).....	130
Abbildung 41: J774.E Makrophagen wurden stabil mit HA-Mincle-FLAG transduziert und mit DMSO oder 20 µM ZLL für 6 h behandelt. 30 min nach ZLL-Behandlung wurden die Zellen zudem mit 50µg/ml des mutmaßlichen Liganden Trehalose-6,6-dibehenate (TDB) behandelt, wobei einmal zuvor TDB, ebenfalls 50µg/ml, an die Kulturgefäße unter Verwendung von Isopropanol fixiert wurden (cTDB).....	130

7.6. Liste der Tabellen

Tabelle 1: Substrate der Proteasen SPPL2a und SPPL2b	6
Tabelle 2: Liste der verwendeten Antikörper	19
Tabelle 3: Liste der verwendeten Plasmide.....	19
Tabelle 4: Verwendete Substanzen zur cDNA-Herstellung.....	21
Tabelle 5: Protokoll der cDNA-Herstellung.....	22
Tabelle 6: Verwendete Substanzen für die PCR	22
Tabelle 7: Protokoll bei Verwendung der Phusion Polymerase	22
Tabelle 8: Zusammensetzung des TAE-Puffers	23
Tabelle 9: Zusammensetzung des LB-Mediums	24
Tabelle 10: Ansätze für die qRT-PCR	26
Tabelle 11: Verwendete Primer für die qRT-PCR.....	26
Tabelle 12: Verwendete und hergestellte Zelllinien	27

Tabelle 13: Zusammensetzung von PBS	29
Tabelle 14: Zusammensetzung des Mediums für BMDCs	31
Tabelle 15: Zusammensetzung des Mediums für BMDMs	32
Tabelle 16: Material für die Generierung von Peritoneal-Makrophagen	32
Tabelle 17: Mengenansätze für Kulturmedien in verschiedenen Gefäßen	33
Tabelle 18: Verwendete Liganden.....	35
Tabelle 19: Verwendete Proteaseinhibitoren.....	36
Tabelle 20: Verwendete Lösungen bei der Immunfluoreszenz.....	37
Tabelle 21: Zusammensetzung des FACS-Puffers	39
Tabelle 22: Material für die ROS-Messung	40
Tabelle 23: Zusammensetzung des Lyse-Puffers	41
Tabelle 24: Zusammensetzung des 5x SDS-PAGE Ladepuffers	41
Tabelle 25: Ansätze für die Oberflächenbiotinylierung	42
Tabelle 26: Zusammensetzung der verschiedenen Elemente der SDS-PAGE	43
Tabelle 27: Zusammensetzung der Acrylamidgele mit unterschiedlicher Konzentration	43
Tabelle 28: Zusammensetzung für die Tricingele mit unterschiedlicher Konzentration	44
Tabelle 29: Elektrodenpuffer für SDS-Gele	44
Tabelle 30: Anoden und Kathoden Puffer für Tricin Gele	44
Tabelle 31: Zusammensetzung des Transfer Puffers.....	45
Tabelle 32: Ansätze für die Lösungen zur Immundetektion.....	45
Tabelle 33: Zusammensetzung des Waschpuffers PBS/T	46
Tabelle 34: Verwendete Antikörper in den ELISA-Versuchen	47
Tabelle 35: Potenziell durch die Tweak-ICD regulierte Gene	60

9. Publikationen

Publikationen mit Inhalten aus dieser Doktorarbeit:

Mentrup T, **Stumpff-Niggemann AY**, Leinung N, Schlosser C, Schubert K, Wehner R, Tunger A, Schatz V, Neubert P, Gradtke AC, Wolf J, Rose-John S, Saftig P, Dalpke A, Jantsch J, Schmitz M, Fluhrer R, Jacobsen ID, Schröder B. Phagosomal signalling of the C-type lectin receptor Dectin-1 is terminated by intramembrane proteolysis. Nat Commun. 2022 Apr 6;13(1):1880.

Weitere Publikationen:

Stumpff-Niggemann AY, Feldkamp T. Metabolische Azidose [Metabolic acidosis]. Dtsch Med Wochenschr. 2020 Nov;145(22):e138.

Stumpff-Niggemann AY (2021): Nierentransplantation. In: Schwenger V. (Hrsg.) Klinikleitfaden Nephrologie, Urban & Fischer (Elsevier), München

10. Erklärung

Die Daten dieser Doktorarbeit wurden in den Jahren 2015 bis 2017 im Biochemischen Institut der Christian-Albrechts-Universität, Kiel unter der Anleitung von Prof. Dr. Paul Saftig und Prof. Dr. Bernd Schröder erhoben.

Hiermit erkläre ich, dass:

- die vorgelegte Arbeit bisher noch nicht, auch nicht teilweise, veröffentlicht wurde.
- ich die Daten, abgesehen von der Beratung durch meine Betreuer, selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe verfasst habe.
- ausschließlich die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden.
- sämtliche Zitate aus anderen Werken als solche kenntlich gemacht wurden.
- Teile dieser Arbeit in Fachzeitschriften publiziert wurde.
- die vorgelegte Arbeit bisher in keiner Form als Bestandteil einer Prüfungsleistung vorgelegt wurde.
- die eingereichte Dissertation unter Beachtung der Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis erstellt wurde.

Kiel, den

(Anna Yamina Stumpff-Niggemann)

11. Danksagung

Diese Doktorarbeit entstand im Biochemischen Institut der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität.

Hier fand ich großartige Unterstützung seitens meiner Betreuer, die mir stets mit Rat und Tat, oder aber aufbauenden Worten, zur Seite standen: Deswegen gilt mein Dank zuerst **Prof. Dr. Paul Saftig** und **Prof. Dr. Bernd Schröder**, der auch nach seinem Weggang immer ein verlässlicher Ansprechpartner war.

Zudem möchte ich mich bei meiner Arbeitsgruppe für die viele lustige Stunden, sowie der vielen Tipps und Tricks im Labor bedanken. **Dr. Torben Mentrup** ist für mich von einem Arbeitskollegen zu einem Freund geworden. Mit unermüdlichem Beistand begleitete er mich während dieser Arbeit mit aufmunternden Worten, hilfreichen Tipps sowie Unterstützung und es entwickelte sich eine Freundschaft, die sich auch über die Entfernung aufrecht hält.

Auch danke ich meinen Freunden, insbesondere **Lea Schühle**, die viele Stunden mit Zuhören verbrachten und auf deren Unterstützung ich immer zählen konnte.

Besonderen Dank gilt meiner Familie:

Lukas Finn Scharenberg, der mir immer zur Seite stand, mich auf diesem Weg mit sicheren Schritten Tag für Tag begleitete und mit unzählbar vielen Ratschlägen und Taten zum Gelingen dieser Arbeit beitrug.

Zudem möchte ich **Friederike Stumpff** danken, die endlose Male Korrektur las und neben einer wunderbaren Mutter eine große fachliche Unterstützung war.

Günter Niggemann, der ebenfalls tapfer Korrektur las, immer ein offenes Ohr hatte und jedes Mal Mut aussprach: „*Es heißt ja nicht umsonst herumdoktern!*“.

Zuletzt danke ich meinem Bruder **Nils Niggemann** für die langen Telefonate und das Teilen von Erfahrungen in der Wissenschaft.