

Aus dem Biochemischen Institut
(Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. S. Rose-John)
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Funktionelle Charakterisierung der Intramembranprotease
Signal Peptide Peptidase-like 2c

Inauguraldissertation

zur

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

vorgelegt von
Johannes Niemeyer
aus Göttingen

Kiel 2021

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Paul Josef Saftig

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Andreas Tholey

Tag der mündlichen Prüfung: 10.09.2021

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 20.05.2021

gez.: Prof. Dr. rer. nat. Paul Josef Saftig
(=*Vorsitzender der Prüfungskommission*)

I Inhaltsverzeichnis

II Abkürzungsverzeichnis

1 Einleitung

| | | |
|-----------|------------------------------------------------------|----|
| 1.1 | Über die Funktionen der Proteasen | 1 |
| 1.2 | Regulierte Intramembranproteolyse (RIP) | 2 |
| 1.3 | Intramembrane-cleaving Proteases (I-CLIPs) | 3 |
| 1.3.1 | Metalloproteasen | 3 |
| 1.3.2 | Serin-Proteasen | 3 |
| 1.3.3 | Aspartyl-Proteasen | 4 |
| 1.3.3.1 | Preseniline | 4 |
| 1.3.3.2 | SPP | 5 |
| 1.3.3.3 | SPPL3 | 6 |
| 1.3.3.4 | SPPL2-Proteasen | 7 |
| 1.3.3.4.1 | SPPL2a | 8 |
| 1.3.3.4.2 | SPPL2b | 11 |
| 1.3.3.4.3 | SPPL2c | 11 |
| 1.4 | Potenzielle SPPL2c-Substrate | 13 |
| 1.5 | Aufbau und Funktion der männlichen Geschlechtsorgane | 15 |
| 1.6 | Ziele dieser Arbeit | 18 |

2 Material und Methoden

| | | |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.1 | Materialien | 19 |
| 2.1.1 | Chemikalien | 19 |
| 2.1.2 | Gerätschaften, Labormaterialien, Kits und Computerprogramme | 21 |
| 2.1.3 | Zelllinien | 23 |
| 2.1.4 | Konstrukte | 24 |
| 2.1.5 | Mauslinien | 25 |
| 2.2 | Methoden | 26 |
| 2.2.1 | Zellbiologische Methoden | 26 |
| 2.2.1.1 | Kultivierung von Zelllinien | 26 |
| 2.2.1.2 | Transiente Transfektion von Zelllinien | 27 |
| 2.2.2 | Proteinbiochemische Methoden | 27 |
| 2.2.2.1 | Herstellung von Zelllysaten | 27 |
| 2.2.2.2 | Aufreinigung und Isolierung von Proteinen aus Geweben | 28 |
| 2.2.2.3 | Bestimmung der Proteinkonzentration | 28 |
| 2.2.2.4 | Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE | 29 |
| 2.2.2.5 | Western Blotting | 31 |
| 2.2.2.6 | Proteindetektion auf Nitrocellulosemembranen | 31 |
| 2.2.2.7 | Elution von gebundenen Antikörpern von Membranen | 34 |
| 2.2.3 | Enzymatische Deglykosylierung von Proteinlysaten | 35 |
| 2.2.4 | Dichtegradientenzentrifugation | 36 |
| 2.2.5 | Durchflusszytometrische Untersuchungen (<i>fluorescence-activated cell scanning</i> , FACS) | 37 |
| 2.2.5.1 | Herstellung einer Zellsuspension aus Hodengewebe | 37 |
| 2.2.5.2 | Färben und Analyse von FACS-Proben | 38 |
| 2.2.6 | Isolierung von Spermien | 38 |
| 2.2.7 | Mikroskopische Analyse der Spermienmorphologie | 39 |
| 2.2.8 | Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) | 39 |
| 2.3 | Immunhistochemische Methoden | 41 |
| 2.3.1 | Immunfluoreszenzfärbung einzelner Zellen | 41 |

| | | |
|----------|---------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.3.2 | Histologische Methoden | 42 |
| 2.3.2.1 | Perfusion von Mäusen mit Paraformaldehydpuffer | 42 |
| 2.3.2.2 | Stückfixierung von Hoden mit Bouin'scher-Lösung | 42 |
| 2.3.3 | Herstellung von Gewebeschnitten | 43 |
| 2.3.3.1 | Anfertigung von Cryoschnitten | 43 |
| 2.3.3.2 | Anfertigen von Paraffinschnitten | 43 |
| 2.3.4 | Histologische Verfahren an Gewebeschnitten | 44 |
| 2.3.4.1 | Immunhistochemie mittels DAB | 44 |
| 2.3.4.2 | Visualisierung der β -Galaktosidaseaktivität | 46 |
| 2.3.5 | Gegenfärben von histologischen Schnitten | 47 |
| 2.3.5.1 | Hämalaun-Eosin-Färbung | 47 |
| 2.3.5.2 | Kernechtrot-Färbung | 47 |
| 2.4 | Molekularbiologische Methoden | 48 |
| 2.4.1 | Isolierung von mRNA aus Geweben | 48 |
| 2.4.2 | Bestimmung der Nukleinsäurenkonzentration | 48 |
| 2.4.3 | Agarose-Gelelektrophorese | 48 |
| 2.4.4 | PCR | 49 |
| 2.4.4.1 | Klonierungs-PCR | 49 |
| 2.4.4.2 | Mutations-PCR | 50 |
| 2.4.4.3 | RT-PCR | 52 |
| 2.4.5 | Sequenzierungen | 53 |
| 2.4.6 | Klonierung | 53 |
| 2.4.6.1 | Restriktionsverdau | 53 |
| 2.4.6.2 | Ligation | 54 |
| 2.4.6.3 | Herstellung von elektrokompetenten <i>E.coli</i> -XL1-blue | 54 |
| 2.4.6.4 | Transformation elektrokompetenter Bakterien mittels Elektroporation | 55 |
| 2.4.6.5 | Vervielfältigung und Isolierung von Plasmiden | 55 |
| 3 | Ergebnisse | 57 |
| 3.1 | Biochemische Charakterisierung des mSPPL2c-Proteins | 57 |
| 3.1.1 | Validierung der Antikörper | 57 |
| 3.1.2 | Untersuchungen zur zellulären Lokalisation | 60 |
| 3.1.3 | Glykosylierung von mSPPL2c | 64 |
| 3.2 | Untersuchungen möglicher SPPL2c-Substrate | 66 |
| 3.3 | Untersuchungen zur Gewebeexpression von mSPPL2c | 68 |
| 3.4 | Biochemische Charakterisierung des endogenen SPPL2c-Proteins | 73 |
| 3.5 | Altersabhängigkeit der SPPL2c-Expression | 74 |
| 3.6 | Verteilung des SPPL2c-Proteins im Hoden | 75 |
| 3.7 | Phänotypisierung der mSPPL2c ^{-/-} -Mäuse | 77 |
| 3.7.1 | Zellpopulationsanalyse der <i>Tubuli seminiferi</i> | 79 |
| 3.7.2 | Fertilitätsanalyse | 80 |
| 3.7.3 | Untersuchungen an Spermien aus SPPL2c ^{-/-} -Mäusen | 81 |
| 3.8 | Vergleich der Gewebeexpression der anderen SPP/SPPL-Proteasen | 83 |
| 3.8.1 | SPPL2a und SPPL2b | 83 |
| 3.8.2 | SPP | 84 |
| 4 | Diskussion | 86 |
| 4.1 | Zellbiologische Charakteristika von SPPL2c | 86 |
| 4.2 | Identifikation möglicher SPPL2c-Substrate/Interaktionspartner | 87 |
| 4.3 | SPPL2c im männlichen Geschlechtstrakt | 89 |
| 4.4 | SPPL2c – Expression ausschließlich in elongierten Spermatiden? | 90 |
| 4.5 | Mögliche Funktionen von SPPL2c in Spermatiden | 91 |

| | | |
|-----------|---------------------------------------------------------|------------|
| 4.6 | Vergleich von SPPL2c mit anderen SPP/SPPL2-Proteasen | 95 |
| 4.7 | Regulierte Intramembranproteolyse in der Spermatogenese | 97 |
| 4.8 | Ausblick | 98 |
| 5 | Zusammenfassung | 100 |
| 6 | Literaturverzeichnis | 102 |
| 6.1 | Aus Zeitschriften | 102 |
| 6.2 | Aus Büchern und Sammelwerken | 117 |
| 7 | Anhang | 118 |
| 7.1 | Ergänzende Tabellen und Abbildungen | 118 |
| 7.2 | Abbildungsverzeichnis | 126 |
| 7.3 | Tabellenverzeichnis | 128 |
| 8 | Eidesstattliche Erklärung | 130 |
| 9 | Danksagung | 131 |
| 10 | Lebenslauf | 132 |

II Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------|----------------------------------------------------------------------------|
| ACE | <i>Angiotensin-converting enzyme</i> |
| ADAM10 | <i>A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10</i> |
| APH | <i>Anterior pharynx-defective 1</i> |
| APP | <i>Amyloid precursor protein</i> |
| APS | <i>Ammoniumperoxodisulfat</i> |
| APZ | <i>Antigenpräsentierende Zellen</i> |
| ATF6 | <i>Activating transcription factor 6</i> |
| ATP | <i>Adenosintriphosphat</i> |
| BBF2H7 | <i>Box B-binding factor 2 human homolog on chromosome 7</i> |
| BCA | <i>Bicinchoninsäure</i> |
| BCG | <i>Bacillus Calmette-Guérin</i> |
| Bcl-2 | <i>B-cell lymphoma 2</i> |
| BHS | <i>Blut-Hoden-Schranke</i> |
| BIK | <i>Bcl-2-interacting killer</i> |
| BioID | <i>Proximity-dependent biotin identification</i> |
| BiP | <i>Binding immunoglobulin protein</i> |
| bp | <i>Basenpaar</i> |
| BSA | <i>Bovines Serumalbumin</i> |
| bZIP | <i>Basic leucine zipper domain</i> |
| C | <i>Chromatiden pro Chromosomenpaar</i> |
| cAMP | <i>Cyclisches Adenosinmonophosphat</i> |
| CASA | <i>Computer assisted sperm analysis</i> |
| CD44 | <i>Cluster of differentiation 44</i> |
| CD74 | <i>Cluster of differentiation 77</i> |
| COPII | <i>Coat protein complex II</i> |
| CREBH | <i>cAMP-responsive element-binding protein H</i> |
| CTF | <i>C-terminal fragment</i> |
| CYB5A | <i>Cytochrome B5 type A</i> |
| DAB | <i>3,3'-Diaminobenzidin</i> |
| DABCO | <i>1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan</i> |
| DAPI | <i>4',6-Diamidin-2-phenylindol</i> |
| DAPT | <i>N-[N-(3,5-Difluorphenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycin-t-butyl-Ester</i> |
| DII4 | <i>Delta-like 4</i> |
| DMEM | <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> |
| DMSO | <i>Dimethylsulfoxid</i> |
| DMSZ | <i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH</i> |
| DNA | <i>Deoxyribonucleic acid</i> |
| DTT | <i>Dithiothreitol</i> |
| E3R2 | <i>Epitope 3 rabbit 2</i> |
| ECL | <i>Elektrochemilumineszenz</i> |
| EDTA | <i>Ethylendiamintetraessigsäure</i> |
| eEF2 | <i>Eukaryotic elongation factor 2</i> |
| Endo H | <i>Endoglykosidase H</i> |
| ER | <i>Endoplastisches Retikulum</i> |
| ERAD | <i>Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation</i> |
| ERGIC-53 | <i>ER-Golgi intermediate compartment 53 kDa protein</i> |
| FACS | <i>Fluorescence-activated cell scanning</i> |

| | |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| FAD | <i>Familial Alzheimer disease</i> |
| FasL | Fas Ligand |
| FCS | <i>Fetal calf serum</i> |
| FSH | Follikelstimulierendes Hormon |
| FVenv | <i>Foamy virus envelope glycoprotein</i> |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase |
| GlpG | <i>Glycerol 3-phosphate regulon</i> |
| GM130 | 130 kDa cis-Golgi matrix protein-1 |
| GnT-V | <i>Alpha-1,6-mannosylglycoprotein 6-beta-N-Acetylglucosaminyltransferase A</i> |
| GnT1IP | <i>Alpha-1,3-mannosyl-glycoprotein 4-beta-N-acetylglucosaminyltransferase-like protein</i> |
| GSK-3 | Glykogensynthase-Kinase-3 |
| GWAS | <i>Genome-wide association study</i> |
| HA | <i>Hemagglutinin</i> |
| hCG | Humanes Choriongonadotropin |
| HCV | Hepatitis-C-Virus |
| HE | Hämatoxylin-Eosin |
| HEK | <i>Human Embryonic Kidney</i> |
| HeLa | Henrietta Lacks |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| HLA | <i>Human leukocyte antigen</i> |
| HO-1 | Hämoxygenase 1 |
| HRP | <i>Horseradish peroxidase</i> |
| HSP | Hitzeschockprotein |
| I-CLIP | <i>Intramembrane cleaving protease</i> |
| ICD | <i>Intracellular domain</i> |
| IL-12 | Interleukin 12 |
| ITM2B | <i>Integral membrane protein 2B</i> |
| IVC | <i>Individually ventilated cages</i> |
| kDa | Kilodalton |
| LB | <i>Lysogeny broth</i> |
| LDL | <i>Low density lipoprotein</i> |
| LH | Luteinisierende Hormon |
| LIMP-2 | <i>Lysosomal integral membrane protein 2</i> |
| LMD | Laser-Mikrodissektion |
| LOX-1 | <i>Lectin-like oxidized LDL receptor 1</i> |
| MGAT1 | <i>Alpha-1,3-mannosyl-glycoprotein 2-beta-N-acetylglucosaminyl-transferase</i> |
| MGAT4D | <i>Mannosyl (alpha-1,3-)-glycoprotein beta-1,4-N-acetylglucosaminyl-transferase family, member D</i> |
| MHC | <i>Major histocompatibility complex</i> |
| mM | Millimolar |
| mRNA | <i>Messenger RNA</i> |
| NGS | <i>Normal goat serum</i> |
| NK | <i>Natural killer</i> |
| NP-40 | Nonoxinol 40 |
| NRG1 | Neuregulin 1 |
| ns | Nicht signifikant |
| NS3/4A | <i>Nonstructural protein 3/4A</i> |
| NTF | <i>N-terminal fragment</i> |

| | |
|-------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| OASIS | <i>Old astrocyte specifically-induced substance</i> |
| OD | <i>Optische Dichte</i> |
| p.a. | <i>pro analysi</i> |
| PBS | <i>Phosphate buffered saline</i> |
| PCR | <i>Polymerase-Kettenreaktion</i> |
| PDI | <i>Proteindisulfid-Isomerase</i> |
| PEN-2 | <i>Presenilin enhancer 2</i> |
| PFA | <i>Paraformaldehyd</i> |
| PNGase F | <i>Peptid-N-Glykosidase F</i> |
| PPP-1 | <i>Phosphoprotein Phosphatase-1</i> |
| PPP1R2 | <i>Proteinphosphatase Inhibitor 2</i> |
| PSEN | <i>Presenilin</i> |
| qRT-PCR | <i>Real-time quantitative PCR</i> |
| RAMP4 | <i>Ribosome-attached membrane protein 4</i> |
| RHBDD1 | <i>Rhomboid domain-containing protein 1</i> |
| RIP | <i>Regulated intramembrane proteolysis</i> |
| rpm | <i>Rotations per minute</i> |
| RT-PCR | <i>Reverse-Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion</i> |
| S1P | <i>Site-1-protease</i> |
| S2P | <i>Site-2-protease</i> |
| sAC | <i>Soluble adenylyl cyclase</i> |
| SDS | <i>Sodium dodecyl sulfate</i> |
| SDS-PAGE | <i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> |
| SEM | <i>Standard error of the mean</i> |
| SERCA | <i>Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase</i> |
| SNARE | <i>Soluble NSF attachment protein receptor</i> |
| SNP | <i>Single-nucleotide polymorphism</i> |
| SP | <i>Signal peptidase</i> |
| SPCA | <i>Secretory pathway Ca²⁺-ATPase</i> |
| SPP | <i>Signal peptide peptidase</i> |
| SPPL | <i>Signal peptide peptidase-like</i> |
| TA | <i>Tail-anchor</i> |
| TACE | <i>Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme</i> |
| TBS | <i>TRIS-buffered saline</i> |
| TBS/T | <i>TRIS-buffered saline with Tween20</i> |
| TEMED | <i>N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin</i> |
| Tessp-2 | <i>Testis-specific serine protease-2</i> |
| TfR-1 | <i>Transferrinrezeptor 1</i> |
| TISP40 | <i>Transcript induced in spermiogenesis protein 40</i> |
| TMD | <i>Transmembrandomäne</i> |
| TMEM106B | <i>Transmembrane protein 106B</i> |
| TNFα | <i>Tumor necrosis factor α</i> |
| TRC40 | <i>TMD recognition complex protein of 40 kDa</i> |
| TRIS | <i>Tris(hydroxymethyl)aminomethan</i> |
| UPR | <i>Unfolded protein response</i> |
| UTR | <i>Untranslated region</i> |
| VAP | <i>Velocity average path</i> |
| VCL | <i>Velocity curvilinear</i> |
| VSL | <i>Velocity straight line</i> |
| WHO | <i>World Health Organization</i> |

X-Gal
β-Gal

5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galaktopyranosid
β-Galaktosidase

1 Einleitung

1.1 Über die Funktionen der Proteasen

Mit dem Abschluss des *Human Genome Projects* lag erstmalig in der Medizingeschichte ein komplett sequenziertes, menschliches Genom vor (Lander, 2001). Die Anzahl der proteinkodierenden Gene im menschlichen Chromosomensatz wird in der Größenordnung von 19.000 – 22.000 geschätzt (Ezkurdia, 2014, Uhlen, 2015). Aufgrund posttranskriptioneller Modifikationen wie Splicing, alternativem Splicing und RNA-Editing erhöht sich die Zahl menschlicher Proteine weiter, die Schätzungen liegen zwischen 50.000 und 100.000 (Uhlen, 2015). Durch posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierung, Acetylierung, Phosphorylierung u.ä. wird die Anzahl der Proteinvarianten auf bis zu 1.000.000 erhöht (Schilling, 2014). Die Funktionen dieser posttranslationalen Modifikationen sind vielfältig; sie können u. a. als molekulare Schalter bei der Regulierung von Enzymaktivitäten fungieren (Humphrey, 2015).

Eine Besonderheit unter den bekannten posttranslationalen Proteinmodifikationen stellt die Prozessierung durch Proteasen dar, da hierbei zwei neue, teils funktionale Einheiten entstehen. Proteasen sind in sämtlichen Organismen aller biologischer Reiche vorhanden (Rawlings, 2018) und machen ca. 1 – 5 % Prozent des Genoms aller höheren Organismen aus (Puate, 2003). Bislang sind circa 570 humane und 650 murine Proteasen bekannt (Rawlings, 2016).

Proteasen sind Enzyme, welche die Peptidbindung zwischen zwei Aminosäuren hydrolytisch spalten. Nach der ersten Beschreibung eines „im Magensaft entdeckten Ferments“, welches der Autor der Studie „Pepsin“ nannte (Schwann, 1836), wurde lange Zeit eine ausschließliche Funktion von Proteasen beim Abbau von Proteinen vermutet. Erst im Laufe des 20. Jahrhunderts wurde gezeigt, dass Proteasen bei einer Vielzahl von (patho-)physiologischen Vorgängen beteiligt sind. Als Beispiele seien hier Apoptose (Kurokawa, 2009), Wundheilung (Douaiher, 2014), Blutgerinnung (Neurath, 1976), Ovulation (Wahlberg, 2008), Befruchtung (Russell, 2015), Angiogenese (Caolo, 2015), Neurogenese (Bonds, 2015), Mobilisierung von Stammzellen (Klein, 2015), Tumorentstehung (Olson, 2015) und Autoimmunerkrankungen (Wang, 2014) genannt.

Auch aus pharmakologisch-therapeutischer Sicht sind Proteasen ein wichtiger Ansatzpunkt in der modernen Medizin. Meilensteine waren die Einführung des Captoprils, einem Inhibitor der Metalloprotease *Angiotensin-converting enzyme* (ACE) zur Bluthochdruckbehandlung 1981 (Nemec, 2003), die Entwicklung des HIV-Protease-Inhibitors Saquinavir 1995 (Flexner, 2007) sowie die Einführung der *Nonstructural protein 3/4A* (NS3/4A)-Proteaseinhibitoren zur Behandlung von Patienten mit chronischer Hepatitis C (Gane, 2010).

Ursprünglich wurden Proteasen in *Endopeptidasen*, welche die Peptidbindung innerhalb des Proteinsgerüsts hydrolysieren und in *Exopeptidasen* (Aminopeptidasen und Carboxypeptidasen), die NH₂- oder COOH-terminale Aminosäuren abspalten, eingeteilt (López-Otín, 2008). Nachdem weitere Details hinsichtlich struktureller und katalytisch-mechanistischer Natur aufgedeckt wurden, erfolgt die Klassifikation der Proteasen heute anhand der bei der Katalyse beteiligten Aminosäuren. Demnach gibt es 7 Gruppen: Serin-, Cystein-, Threonin-, Aspartyl-, Glutamyl-, Asparagin- sowie Metalloproteasen (Oda, 2011). Die klassische Einteilung hingegen berücksichtigt nur Serin-, Cystein-, Aspartyl- und Metalloproteasen (Erez, 2009).

1.2 Regulierte Intramembranproteolyse (RIP)

Eine Besonderheit innerhalb der Familie der Proteasen stellen die Intramembranproteasen oder I-CLIPs (*Intramembrane-cleaving protease*) dar, da sie ihre Substrate innerhalb deren hydrophoben Transmembrandomänen spalten. Die I-CLIPs, bzw. deren katalytische Zentren, befinden sich im Gegensatz zu den meisten anderen Proteasen nicht in einer wässrigen Umgebung wie dem Extra- oder Intrazellulärraum (Wolfe, 2010).

Klassischerweise sind viele Intramembranproteasen Teil eines zweischrittigen Prozess, der *Regulated intramembrane proteolysis* (RIP) genannt wird (s. Abbildung 1).

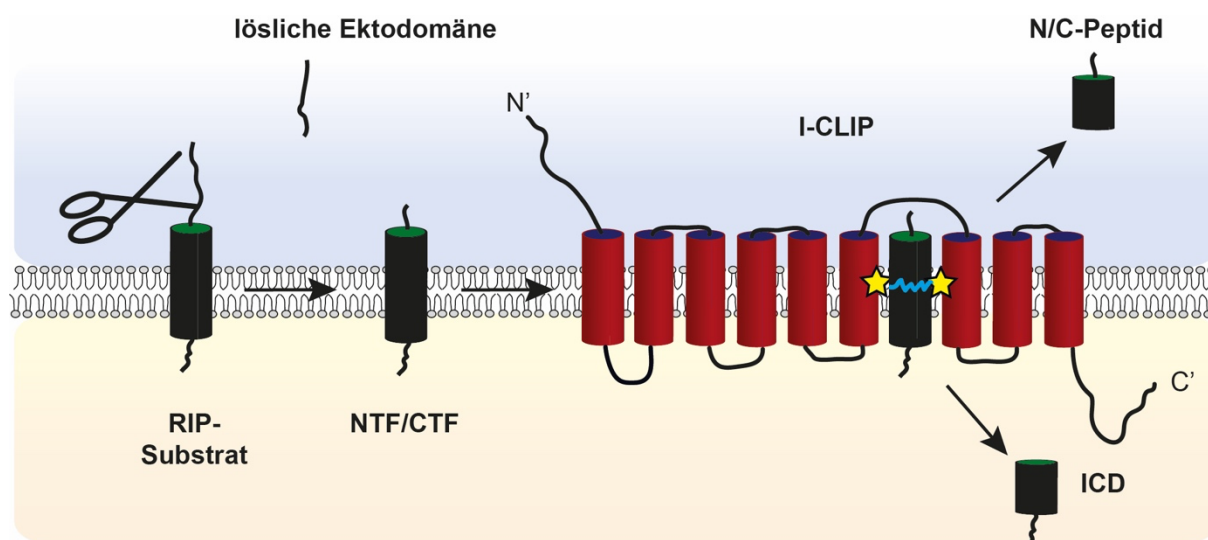


Abbildung 1: Regulierte Intramembranproteolyse. Während des ersten Reaktionsschrittes wird das Substrat-Transmembranprotein in seiner Ektodomäne durch eine *Sheddase* (als Schere dargestellt) proteolytisch gespalten (*shedding*), sodass eine lösliche Ektodomäne und ein membrangebundenes Fragment entstehen. In einem zweiten Schritt wird das verbliebene N-/C-terminale, membrangebundene Fragment (N/CTF) durch eine I-CLIP prozessiert, sodass ein N-/C-Peptid und eine intrazelluläre Domäne (ICD) freigesetzt werden. Diese können beispielsweise als Transkriptionsfaktor im Zellkern die Expression von Genen regulieren.

Nach der klassischen Definition der RIP wird das RIP-Substrat, typischerweise ein Transmembranprotein mit einer einzigen Transmembranhelix, zunächst durch eine Ektodomänen-entfernende Protease prozessiert (*Ectodomain-shedding*). Dabei entsteht ein

N-oder C-terminales Fragment (N/CTF), welches dann wiederum durch eine I-CLIP innerhalb der Transmembrandomäne proteolysiert wird. Als Reaktionsprodukte entstehen dabei ein N-/C-Peptid und eine intrazelluläre Domäne (ICD), welche in den Zellkern translozieren und dort z.B. als Transkriptionsfaktor die Genexpression verschiedener Gene regulieren kann (Brown, 2000).

Seit 1997 mit der *Site-2-protease* (S2P) (s.u.) die erste I-CLIP beschrieben wurde (Rawson, 1997), sind heute eine Vielzahl an verschiedenen I-CLIPs bekannt. Interessanterweise sind die katalytischen Mechanismen der I-CLIPs im Vergleich mit anderen Proteasen identisch (Erez, 2009), sodass auch hier eine Einteilung der Proteasen anhand des Reaktionsmechanismus möglich ist. Bislang wurden Aspartyl-, Serin-, Glutamyl- und Metalloproteasen beschrieben (Lichtenthaler, 2011, Manolaridis, 2013). I-CLIPs mit einem reaktivem Cysteinrest im aktiven Zentrum erscheinen theoretisch möglich, wurden bislang allerdings noch nicht identifiziert (Erez, 2009).

1.3 Intramembrane-cleaving Proteases (I-CLIPs)

1.3.1 Metalloproteasen

Die S2P ist eine Metalloprotease mit einem charakteristischem (HExxH) Histidin/Glutamat-Motiv zur Komplexierung des reaktiven Zinkkations (Rawson, 2013). Eine S2P-vermittelte Intramembranproteolyse wurde zum ersten Mal bei der Untersuchung der Regulierung des Cholesterinmetabolismus eukaryotischer Zellen beschrieben (Rawson, 1997). Neben einer Beteiligung im Cholesterinmetabolismus konnte gezeigt werden, dass eine S2P-abhängige Prozessierung von Transkriptionsfaktoren wie *Activating transcription factor 6* (ATF6) bei der zellulären Antwort auf ER-Stress beteiligt ist (Matsuhisa, 2020).

Nach dem *sensing* des ER-Stresses erfolgt die *Coat protein complex II* (COPII)-vermittelte Translokation von ATF6 zum Golgi-Apparat, wo es *RIP*-abhängig durch die Proteasen S1P (führt das Ektodomänen-*shedding* durch) und S2P (führt die Intramembranproteolyse der Transmembranregion des NTFs durch) prozessiert wird (Ye, 2000). Die entstehende ICD transloziert anschließend als Transkriptionsfaktor in den Zellkern und induziert die Expression verschiedener Proteine des *ER-associated-protein-degradation*-Komplexes (ERAD) und Chaperone (Haze, 1999).

1.3.2 Serin-Proteasen

Die Rhomboid-Proteasen aus der Gruppe der Serin-Proteasen nehmen eine besondere Rolle bei der Prozessierung des *Epidermal-growth-factor-like* Wachstumsfaktors *Spitz* im Rahmen der Embryogenese des Modellorganismus *Drosophila melanogaster* ein (Urban, 2001; Urban 2016). Die Gruppe der Rhomboid-like Proteasen RHBDL1-4 finden sich bei Säugetieren in verschiedenen Kompartimenten des zellulären Sekretionsweges. Von diesen Proteasen ist

RHBDL4 die am besten untersuchte. Sie ist die einzige aktive Rhomboid-Protease, die im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist. Beim Menschen findet sich eine Expression von RHBDL4 im Hoden, auf zellulärer Ebene wurde RHBDL4 in der Spermatogonien-Zelllinie GC-1 spg nachgewiesen (Wang, 2009). Mögliche Funktionen von RHBDL4 besteht in der Regulierung der Apoptose durch Spaltung des proapoptotischen Faktors *Bcl-2-interacting killer* (BIK), einem Mitglied der *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2)-Familie (Wang, 2008). Alternativ wurde eine Involvierung von RHBDL4 bei der ER-assoziierten Degradierung (s.o.) vorgeschlagen, da gezeigt werden konnte, dass das Protein unter ER-Stress in Modellzellsystemen vermehrt exprimiert wird (Fleig, 2012).

Der Rhomboid-Homolog *Glycerol 3-phosphate regulon* (GlpG) aus *E. coli* war die erste I-CLIP, deren Struktur kristallographisch aufgeklärt werden konnte und wichtige Hinweise über die Zugänglichkeit des aktiven Zentrums für Wassermoleküle lieferte (Y. Wang, 2006). Interessanterweise liegt im Zentrum der bakteriellen Rhomboid-Protease GlpG wahrscheinlich keine klassische katalytische *Triade*, sondern eine Diade vor (Freeman, 2006).

1.3.3 Aspartyl-Proteasen

Die Familie der Aspartyl-Intramembranproteasen wird aufgeteilt in die Gruppe der Preseniline (PSEN) und die Gruppe der SPP-(*Signal peptide peptidase*) und SPP-like-Proteasen (SPPL). Die Proteasen aus beiden Gruppen bestehen aus neun Transmembrandomänen (TMD) und weisen in ihren aktiven Zentren ein charakteristisches Y/FD-Motiv in TMD 6 und GxGD-Motiv in TMD 7 auf. Weiterhin findet sich ein hochkonserviertes, C-terminales PALL-Motiv in den Sequenzen der SPP/SPPL-Proteasen, welches sich als PALP-Motiv in den Aminosäuresequenzen der Preseniline wiederfindet (Ponting, 2002, J. Wang, 2006). Die Mutation einzelner Aminosäuren dieses Motivs reduziert die proteolytische Aktivität von SPP und den Presenilinen drastisch (J. Wang, 2006).

Die Proteasen der SPP/SPPL-Gruppe liegen im Vergleich zur Presenilingruppe membrantopologisch invertiert vor. Dies wird als Erklärung angesehen für die Selektivität der Preseniline für Proteine, die in einer Typ-I-Orientierung vorliegen, während sich bei den SPP/SPPL-Proteasen eine relative Selektivität für Typ-II-Proteine findet (Nyborg, 2004). Zusätzlich liegen die Preseniline als Heterotetramer mit 3 weiteren Proteinen vor, während dies für die SPP/SPPL-Proteasen bisher nicht beschrieben ist (Wolfe, 2010).

1.3.3.1 Preseniline

Die Preseniline (PSEN) sind aufgrund ihrer Beteiligung bei der Entstehung der Alzheimer-Krankheit die am besten untersuchten I-CLIPs (Beel, 2008). Preseniline bilden die katalytisch aktiven Untereinheiten eines größeren Protein-Komplexes/Heterotetramers, der γ -Sekretase. Diese besteht neben einem Presenilin-Molekül aus den Untereinheiten Nicastrin, *Presenilin*

enhancer 2 (PEN 2) und *Anterior pharynx-defective 1* (APH), die für die proteolytische Aktivität des Presenilins notwendig sind (Lichtenthaler, 2011).

Einen frühen Hinweis auf die Involvierung des Presenilins bei der Alzheimer-Erkrankung lieferte die Analyse des Genmaterials von Patienten mit einer erblichen Form dieser Krankheit, bei der Mutationen in beiden PSEN-Genen gefunden wurden (Rogaev, 1995, Sherrington, 1995). Als eine mögliche Ursache der Krankheitsentstehung werden die extrazellulären, „senilen Plaques“ in Hirnautopsie-Präparaten von Alzheimer-Patienten angesehen (Selkoe, 1996). Der Hauptbestandteil dieser Plaques ist das β -Amyloid (Masters, 2012). Dieses entsteht aus einem Vorläuferprotein, dem *Amyloid precursor protein* (APP), welches über zwei distinkte proteolytische Prozesse unter Beteiligung der γ -Sekretase und somit der Presenilins, gebildet wird (Lichtenthaler, 2011, Lichtenthaler, 2019).

Auf der Basis von *in vitro*-Studien sind heute ca. 90 weitere Substrate der γ -Sekretase bekannt (Duggan, 2016). Als *in vivo*-Substrat sei neben dem APP die RIP-abhängige Prozessierung des *Notch*-Rezeptors genannt, dessen Signalweg bei Säugern eine hochkonservierte Signaltransduktionskaskade während der Entwicklung vieler Organe darstellt (Bray, 2016).

1.3.3.2 SPP

Die Gruppe der Presenilinhomologen GxGD-I-CLIPs besteht aus den fünf Proteasen SPP, SPPL2a, SPPL2b, SPPL2c und SPPL3. Diese Gruppe von Proteinen wurde 2002 als Homologe der zuvor beschriebenen Presenilins identifiziert (Ponting, 2002, Weihofen, 2002). Kennzeichnend für diese Gruppe von Proteasen ist eine relative Selektivität für Typ-II-Transmembran-Proteine. Namensgebend ist die Prozessierung von Signalpeptidfragmenten durch die ER-residente SPP.

Signalpeptide sind kurze N-terminale Aminosäuresequenzen, die für einen cotranslationalen Proteintransport neu synthetisierter Proteine zu verschiedenen subzellulären Kompartimenten wie dem Endoplasmatischen Retikulum sorgen. Dieses Signalpeptid wird im Laufe der Maturierung des Proteins durch die *Signal peptidase* (SP) abgespalten (Milstein, 1972, Auclair, 2012). Das entstehende Signalpeptid-Fragment verbleibt innerhalb der Membran des rauen Endoplasmatischen Retikulums, wo es anschließend von SPP gespalten werden kann (Martoglio, 1998, Kilic, 2010). Dies wurde für einige Proteine, wie Prolactin oder Calreticulin im Rahmen von Überexpressionsstudien in Modellzellsystemen gezeigt (Lemberg, 2002, Kühnle, 2019).

Neben dieser degradierenden Funktion von SPP gibt es Hinweise, dass die durch SPP generierten Fragmente auch weitere Funktionen besitzen. So ist SPP u. a. an der Generierung von Peptiden beteiligt, die während der Interaktion von *Natural-killer*-Zellen (NK-Zellen) mit somatischen Zellen mittels des HLA-E-Rezeptors präsentiert werden. Hierbei werden aus den

Signalpeptiden von klassischen MHC-Klasse-I-Präproteinen Peptide proteolysiert, die anschließend als Epitope von den somatischen Zellen präsentiert werden (Lemberg, 2001). Zusätzlich ist SPP bei der Prozessierung von viralen Proteinen wie dem HCV-core-Protein im Rahmen von Infektionen mit dem Hepatitis-C-Virus (McLauchlan, 2002, Aizawa, 2016) sowie bei der ER-assoziierten Degradierung von Proteinen (Harbut, 2012, Chen, 2014) beteiligt. Die essentielle Notwendigkeit von SPP im Säugerorganismus zeigt der Umstand, dass SPP-defiziente Mäuseembryonen nicht überlebensfähig sind und bereits am 13. Tag *in utero* versterben (Aizawa, 2016).

Mittels *Proteomics*-basierten Untersuchungen von SPP^{-/-}-Zellen wurde von Boname *et al.* eine Reihe weiterer Substrate von SPP identifiziert (Boname, 2014). SPP ist demnach an der Degradierung der Hämoxygenase 1 (HO-1) beteiligt. Dieses Enzym ist unter pathophysiologischen Bedingungen u. a. an der Tumor-Neovaskularisierung (Loboda, 2015) beteiligt. Bei einigen Tumoren wie dem Prostatakarzinom findet sich eine starke Expression von HO-1 (Labanca, 2015). Weitere Substrate sind *Cytochrome B5A* (CYB5A) und *Ribosome-associated membrane protein 4* (RAMP4) und RAMP4-2. Diese Substrate sind über einen speziellen *Tail-anchor* (TA) mit der Plasmamembran des ERs verbunden und sind keine klassischen, integralen Typ-II-Transmembranproteine (Boname, 2014).

Tail-anchored Proteine zeichnen sich definitionsgemäß durch das Vorhandensein einer einzelnen Transmembrandomäne am C-terminalen Ende aus, die für eine Verankerung des restlichen, N-terminalen Polypeptids in die Lipiddoppelschicht verschiedener Zellorganellen sorgt (Rabu, 2009). Da sie im Unterschied zu den meisten anderen integralen Membranproteinen kein N-terminales Signalpeptid besitzen, erfolgt die Insertion von TA-Proteinen in die Biomembranen nur zu einem geringen Teil über den klassischen, cotranslationalen SRP-Signalweg, sondern zumeist posttranslational (Chio, 2017). Die Translokation wird u.a. durch *TMD recognition complex protein of 40 kDa* (TRC40) vermittelt (Hegde, 2011). Prominente Beispiele von TA-Proteinen sind neben den oben genannten die am vesikulären Transport beteiligten *Soluble NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) attachment protein receptor* (SNARE)-Proteine wie Synaptobrevin und Syntaxin.

1.3.3.3 SPPL3

SPPL3 zeigt als einziges nicht-glykosyliertes und kleinstes Mitglied der SPP/SPPL-Familie am wenigsten strukturelle Ähnlichkeiten mit den Presenilinen und den restlichen SPP/SPPL-Proteasen (Ponting, 2002). 2012 wurde mit *Foamy virus envelope* (FVenv) das erste *in vitro* Substrat dieser sich im Golgi-Apparat befindenden Protease beschrieben (Voss, 2012). Interessanterweise scheint für die SPPL3-abhängige Prozessierung von FVenv kein vorangehende Proteolyse notwendig zu sein. Weiter konnte von Voss *et al.* gezeigt werden, dass SPPL3 an der Prozessierung und der anschließenden Sekretion verschiedener

Glykosyltransferasen wie der N-Acetylglucosaminyltransferase V (GnT-V, MGAT5) beteiligt ist. Da das katalytische Zentrum dieser Glykosyltransferasen innerhalb der von SPPL3 freigesetzten und dann in Folge sezernierten Ektodomäne liegt, führt die ektope Expression von SPPL3 zu einer Hypoglykosylierung verschiedener zellulärer Proteine (Voss, 2014). Zusätzlich wurde gezeigt, dass SPPL3 in verschiedenen Zellen des Immunsystems exprimiert wird. Der Knockout von SPPL3 resultiert in einer verringerten Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber Tumorzellen (Hamblet, 2016).

SPPL3-defiziente Mäuse fallen phänotypisch durch eine Wachstumsretardierung und hämatologische Abnormitäten wie einem verringerten IgG₁-Spiegel auf. Zudem sind SPPL3^{-/-}-Männchen unfruchtbar. Warum dies der Fall ist, ist nicht bekannt (Tang, 2010, Mentrup 2017a).

1.3.3.4 SPPL2-Proteasen

Die größte Gruppe der Aspartyl-I-CLIPs besteht aus den drei Proteasen SPPL2a, SPPL2b und SPPL2c. Tabelle 1 zeigt eine Zusammenfassung verschiedener Charakteristika dieser Intramembranproteasen. Wie aus der Tabelle hervorgeht, liegt bei allen drei Proteasen eine Sequenzhomologie kritischer Aminosäuren in den katalytischen Zentren vor. Zudem findet sich eine partielle Überschneidung des Gewebeexpressionsmusters von SPPL2a und SPPL2b in *M. musculus*. Auch das Spektrum an bekannten Substraten von SPPL2a und SPPL2b scheint sich zu einem gewissen Teil zu überlappen. Interessanterweise ist das zelluläre Kompartiment, in denen die Proteasen exprimiert werden, bei allen drei Proteasen nicht identisch (Friedmann, 2006, Voss 2013, Mentrup 2017a). Dieses deutet auf eine nicht redundante Funktion der jeweiligen Proteasen hin.

Tabelle 1: Vergleich der SPPL2-Proteasen.

| Protease | Katalytisches Zentrum | Subzelluläres Kompartiment | Gewebe (<i>M.musculus</i>) | Substrate | Gen (H. sapiens) |
|----------|-----------------------|----------------------------|------------------------------|----------------------|------------------|
| SPPL2a | YD.....GFGD | Lysosomen/späte Endosomen | B-Lymphozyten | CD74 | 15q21.2 |
| | | | Thymus | LOX-1 | |
| | | | Milz | TNF α | |
| | | | Knochenmark | ITM2B | |
| | | | Hirn | FasL | |
| | | | Niere | TMEM106B | |
| | | | Lunge | NRG1 type 3 | |
| | | | Leber | <i>FVenv (viral)</i> | |
| | | | Darm | CLN5 | |
| | | | | | |
| SPPL2b | YD.....GFGD | Plasmamembran | Gehirn | LOX-1 | 19p13.3 |
| | | | Knochenmark | CD74 | |
| | | | Thymus | TNF α | |
| | | | Milz | ITM2B | |
| | | | Herz | TfR-1 | |
| | | | | NRG1 type 3 | |
| | | | | <i>FVenv (viral)</i> | |
| SPPL2c | FD.....GFGD | ER (?) | Ø | Ø | 17q21.31 |

Fett markierte Substrate sind *in vivo* validierte Substrate, kursiv geschriebene Substrate sind Typ-III-Transmembranproteine. Die dargestellte Gewebeexpression bezieht sich aus Daten von murinen Organismen (modifiziert nach Mentrup, 2017).

Im Folgenden soll ein Überblick über die jeweiligen Proteasen gegeben werden.

1.3.3.4.1 SPPL2a

Diese am besten untersuchte SPPL2-Protease wird aufgrund eines C-terminalen, kanonischen Tyrosinmotivs in den Membranen der Lysosomen bzw. späten Endosomen exprimiert (Behnke, 2011). Analog zu den beiden anderen SPPL2-Proteasen finden sich bei dem SPPL2a-Protein ein N-terminales Signalpeptid (Voss, 2013) und multiple, N-terminale N-Glykosylierungen (Friedmann, 2004). Wie aus der Tabelle 1 hervorgeht, ist die Expression von SPPL2a im murinen Organismus weit verbreitet, mit einem deutlichen Schwerpunkt auf den Zellen des Immunsystems (Schneppenheim, 2014a).

Anhand zellbasierter Überexpressionsstudien konnten eine Reihe von Substraten von SPPL2a identifiziert werden (siehe Tabelle 1), von denen bisher zwei *in vivo* validiert wurden, *Cluster of differentiation 74* (CD74) und *Lectin-like oxidized LDL receptor 1* (LOX-1). CD74,

auch Invariante Kette oder *Ii* genannt, ist ein Typ-II-Membranprotein, welches als Invariante Kette des MHC-Klasse-II-Moleküls eine zentrale Rolle bei der Antigenpräsentation von antigenpräsentierenden Zellen (APZ) wie B-Zellen, dendritischen Zellen oder Makrophagen einnimmt (Schröder, 2016). Im Zuge der Generierung des MHC-II-Komplexes im Endoplasmatischen Retikulum assoziiert CD74 mit den MHC-II- α - und β -Ketten und bindet mittels eines speziellen Segmentes, dem *Class II-associated Ii chain peptid* (CLIP) die Bindungstasche des MHC-II-Komplexes. So wird verhindert, dass bereits im ER zelleigene Peptide vom MHC-II-Komplex gebunden werden. Anschließend sorgt CD74 dafür, dass der MHC-Klasse-II-CD74-Komplex das ER wieder verlässt, um in einem spezialisierten Zellkompartiment mit endozytierten, körperfremden, Peptiden/Antigenen beladen zu werden. Die anschließende Degradierung von CD74 beginnt bereits in dem oben erwähnten, spezialisierten endosomalen Kompartiment durch verschiedene Cystein-Proteasen wie Mitgliedern der Cathepsin-Familie (Beers, 2005) und führt zur Entstehung eines CD74-NTFs. 2013 konnte von drei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander gezeigt werden, dass SPPL2a für den anschließenden, entscheidenden Abbau des CD74-NTFs zuständig ist. Eine Akkumulation des CD74-NTFs wird in SPPL2a-defizienten Mäusen beobachtet und sorgt in diesen Organismen für eine drastische Reduktion an funktionsfähigen B-Zellen und dendritischen Zellen (Schneppenheim, 2013, Bergmann, 2013, Beisner, 2013).

Patienten, die aufgrund einer Mikrodeletion im Chromosom 15 kein SPPL2a in ihren B-Zellen und dendritischen Zellen exprimieren, zeigen ebenfalls eine Akkumulation vom CD74-NTF (Schneppenheim, 2014b). Verschiedene *Loss-of-function*-Mutationen im SPPL2A-Gen reduzieren zudem die Zahl der IL-12 und IL-23 produzierenden dendritischen Zellen. Zusätzlich kommt es bei Patienten mit einem mutierten SPPL2A-Gen zu einer geringeren Produktion von Interferon- γ durch T-Gedächtniszellen, die zuvor durch die BCG-Vakzine Kontakt mit dem *Mycobacterium tuberculosis* hatten (Kong, 2018).

Eine pharmakologische Inhibierung von SPPL2a zur Behandlung von B-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankungen wie der Multiplen Sklerose oder der rheumatoiden Arthritis erscheint als Therapieprinzip möglich. Im Jahr 2018 wurde der erste oral verfügbare, selektive SPPL2a-Inhibitor *SPL-707* vorgestellt (Velicky, 2018).

Als weiteres *in vivo* Substrat von SPPL2a wurde LOX-1 identifiziert. LOX-1 fördert als proinflammatorischer Faktor durch Endothelaktivierung und Aufnahme von oxidiertem *Low Density Lipoprotein* (LDL) die Entstehung der Atherosklerose (Katoaka, 1999, White, 2011). Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von LOX-1 u. a. durch die Proteolyse eines NTFs von SPPL2a (und SPPL2b) kontrolliert wird. So entwickeln *Sppl2a^{-/-}/Sppl2b^{-/-}*-Mäuse, die aufgrund einer typisch westlichen, hochkalorischen Diät erhöhte Cholesterinspiegel- und Blutfette aufwiesen, größere atherosklerotische Plaques als die Kontrolltiere (Mentrup, 2019).

Neben den *in vivo* Substraten CD74 und LOX-1 gibt es noch weitere Substrate von SPPL2a, die mittels Überexpressionsstudien in Modellzellsystemen identifiziert wurden (Mentrup, 2017). Allerdings ist hier die (patho-)physiologische Relevanz der Proteolyse der Transmembranfragmente durch SPPL2a im Gesamtzusammenhang in Säugerorganismen größtenteils ungeklärt:

Das NTF von *Tumor necrosis factor* α (TNF- α) wurde als erstes Substrat von SPPL2a (und SPPL2b) 2006 von Friedmann *et al.* identifiziert: Als klassisches RIP-Substrat wird TNF- α zunächst durch die *Sheddase tumor necrosis factor- α converting enzyme* (TACE) prozessiert, bevor das TNF- α -NTF durch SPPL2a-abhängige Proteolyse in eine ICD und ein C-Peptid gespalten wird. Die ICD transloziert dann in den Zellkern, wo es in dendritischen Zellen die Synthese von IL-12 induziert (Friedmann, 2006).

Ein anderes Mitglied aus der Familie der TNF- α -Proteine, der *First apoptosis signal ligand* (FasL), wurde 2007 als Substrat von SPPL2a identifiziert (Kirkin, 2007). FasL bindet über seine extrazelluläre Domäne an den Fas-Rezeptor und löst so in T-Zellen Apoptose aus (Friedmann, 2006). Auch hier folgt die Prozessierung des Substrates in zwei Schritten. Ein N-terminales Fragment wird nach einem vorangehenden *ectodomain-shedding* durch die *Sheddase A disintegrin and metalloproteinase 10* (ADAM10) von SPPL2a proteolysiert. Anschließend erfolgt die Translokation der dabei entstehenden ICD in den Zellkern von T-Zellen.

Neben diesen Substraten von SPPL2a konnte von Brady *et al.* gezeigt werden, dass das nur gering charakterisierte Protein *Transmembrane protein 106B* (TMEM106B) in Überexpressionsstudien ebenfalls von SPPL2a prozessiert wird (Brady, 2014). Das *ectodomain-shedding* erfolgt nach den Autoren der Studie nicht durch bekannte *Sheddases* wie Mitgliedern der ADAM-Familie oder der β -Sekretase, sondern durch lysosomale Proteasen. Ähnlich verhält es sich bei dem Typ-II-Transmembranprotein *Integral membrane protein 2B* (ITM2B): Mutationen des ITM2B-Gens, die für den C-Terminus des Proteins kodieren, sind mit verschiedenen neurologischen Erkrankungen wie der Britischen (Vidal, 1999) und der Dänischen Familiären Demenz (Vidal, 2000) assoziiert. ITM2B wird nach dem ADAM10-vermitteltem *shedding* durch SPPL2a und SPPL2b aber nicht SPPL2c weiter prozessiert (Martin, 2008).

Die Identifikation von *Neuregulin 1 type III* (NRG1 type III) als SPPL2a-Substrat erweiterte das Konzept der Regulierten Intramembranproteolyse. NRG1 type III fungiert an der Plasmamembran von Axonen als Signalmolekül, wo es während der Embryonalentwicklung die Dicke der Myelinscheide reguliert (Taveggia, 2005, Willem, 2016). Aufgrund der Haarnadel-Struktur des Proteins entstehen nach dem initialen *shedding* durch die β -Sekretase zwei membrangebundene Fragmente, jeweils ein Typ-II-Transmembran-NTF und ein Typ-I-Transmembran-CTF. Das CTF wird von der γ -Sekretase weiter prozessiert, während das NTF von SPPL2a und SPPL2b in eine intrazelluläre Domäne und ein C-Peptid gespalten wird.

Somit ist NRG1 type III das erste RIP-Substrat, welches durch drei verschiedene I-CLIPs proteolysiert wird (Fleck, 2016).

1.3.3.4.2 SPPL2b

Das SPPL2b-Protein ist, anders als das SPPL2a-Protein, nicht in Lysosomen oder späten Endosomen lokalisiert, sondern aufgrund eines nicht vorhandenen *targeting*-Motivs an der Zellplasmamembran (Friedmann, 2006, Behnke, 2011). Wie SPPL2a ist SPPL2b N-terminal mehrfach N-glykosyliert (Friedmann, 2006) und die Substratspektren beider Proteasen überlappen sich zu einem großen Teil (s. Tabelle 1). Durch Überexpressionsstudien in HeLa-Zellen konnte gezeigt werden, dass SPPL2b ebenfalls in der Lage ist, das CD74-NTF zu proteolysieren. Anders als in SPPL2a-defizienten APZ findet sich in *Spp12b*^{-/-}-APZ jedoch keine Akkumulation des CD74-NTFs und daher auch keine Beeinträchtigung dieser Zellen in den *Spp12b*^{-/-}-Mäusen (Schneppenheim, 2014a, Mentrup, 2017).

Der Doppelknockout beider *Spp12a*- und *Spp12b*-Gene sorgte in Mäusen zudem nicht für einen anderen immunologischen Phänotyp als der Knockout des *Spp12a*-Genes alleine. Die *in vivo* Funktionen von SPPL2b sind daher noch unbekannt. Während SPPL2a in einer großen Anzahl an Organsystemen exprimiert wird, scheint sich die Expression von SPPL2b in *M. musculus* auf wenige Organe zu beschränken, besonders prominent ist hier die Expression in verschiedenen Teilen des ZNS (Schneppenheim, 2014a). Als einzig exklusives *in vitro* SPPL2b-Substrat konnte bislang nur der Transferrinrezeptor (TfR-1) identifiziert werden (Zahn, 2013).

1.3.3.4.3 SPPL2c

SPPL2c ist die bislang am wenigsten untersuchte Aspartyl-I-CLIP. Das murine SPPL2c-Gen befindet sich auf Chromosom 11 (s. Abbildung 2). Gemäß Datenbanken wie *ensembl.org* und dieses Gen für zwei mRNAs. Die Kodierungssequenz des ersten mRNA-Transkripts des mSPPL2c-Gens wird als ein zusammenhängendes Exon beschrieben. Das zweite mRNA-Transkript des mSPPL2c-Gens beinhaltet ein längeres Intron und ein zweites Exon.

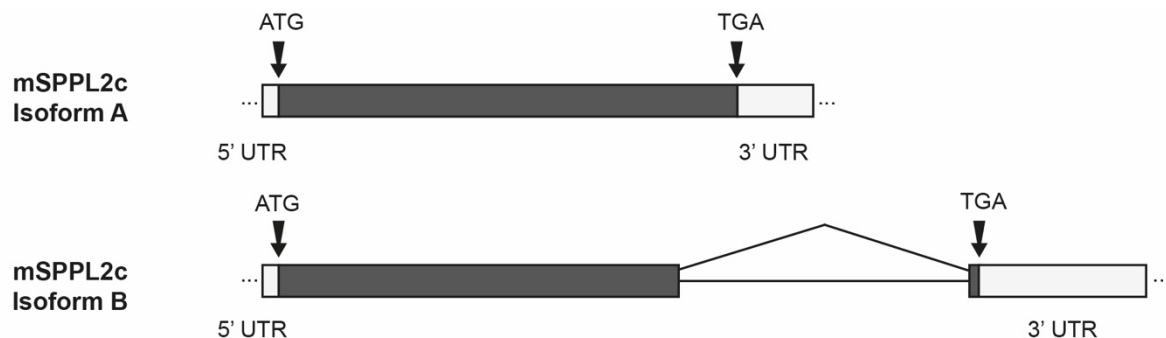


Abbildung 2: Schematische Darstellung des mSPPL2c-Gens auf dem langen Arm des Chromosom 11. Die Exone sind als schwarzer Block dargestellt, die weißen Blöcke stehen für die 5' bzw. 3' *Untranslated region* (UTR). Das Dreieck stellt das Intron dar. Die Basentriplets der Start- und Stoppcodons sind eingezeichnet. Der offene Leserahmen ist durch Pfeile begrenzt.

Auf der Proteinebene sind daher zwei Isoformen des Proteins beschrieben. Eine längere Isoform A, die als die kanonische Form des Proteins angesehen wird und sich aus 690 Aminosäuren zusammensetzt. Die Isoform B besteht nach der Kodierungssequenz aus 581 Aminosäuren und hat aufgrund des unterschiedlichen Exons einen anderen C-Terminus als die Isoform A. 2004 wurde von Friedmann *et al.* eine erste Charakterisierung der zu dem Zeitpunkt neu entdeckten SPP/SPPL-Proteasen vorgenommen (Friedmann, 2004). Darin konnte gezeigt werden, dass SPPL2c unter Überexpressionsbedingungen im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist. Dieses Ergebnis wurde später von einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt (Brady, 2014). Im SPPL2c-Gen finden sich zudem Sequenzmotive, die den Konsensussequenzen C-terminaler ER-Retentionsmotive entsprechen. Zudem wird die Existenz eines N-terminalen Signalpeptids angenommen (AS 1-21) (Brady, 2014). Analog zu SPPL2a und SPPL2b konnte zudem gezeigt werden, dass SPPL2c eine oder mehrere N-glykosylierte Aminosäuren aufweist. Durch DNA-*microarray*-Screeninguntersuchungen konnte die SPPL2c-mRNA in verschiedenen menschlichen Organen detektiert werden, am prominentesten im Gehirn, Herz, Haut, Nebennierenrinde und im Hoden (Friedmann, 2004). Aufgrund der ungewöhnlichen Genstruktur des SPPL2c-Gens, dessen Isoform A keine Introns aufweist und mit 9 *Single-nucleotide polymorphisms* (SNPs) ungewöhnlich polymorph ist, wird es für möglich gehalten, dass das SPPL2c-Gen ein Pseudogen darstellt (Golde, 2009). Erhärtet wird diese Vermutung durch den Umstand, dass bislang keine endogene Expression von SPPL2c auf Proteinebene detektiert werden konnte. Zudem prozessiert SPPL2c keine bekannten Substrate der restlichen SPP/SPPL-Proteasen (Friedmann, 2006, Voss, 2013, Mentrup, 2017), obwohl sich die Substratspektren der anderen beiden SPPL2-Proteasen zu einem großen Teil überlappen (siehe Tabelle 1).

Trotz der noch fraglichen Expression von SPPL2c *in vivo*, gibt es Hinweise, dass das SPPL2c-Gen möglicherweise mit zwei verschiedenen Krankheiten assoziiert ist. Das Koolen-De-Vries-Syndrom ist eine relativ häufig genetische Erkrankung (Prävalenz: 1:16000), die durch eine Mikrodeletion im Chromosom 17q21.31 entsteht (Koolen, 2008). Auf diesem Abschnitt des Chromosoms befinden sich 6 verschiedene Gene, die den Chromosomen der Patienten fehlen, unter anderem auch das SPPL2c-Gen. Häufige Symptome dieser Erkrankung sind: geringes Geburtsgewicht, Herzfehler, Kryptorchismus, urologische Fehlbildungen und epileptische Anfälle (Koolen, 2012, Nascimento, 2017). Eine mögliche Involvierung von SPPL2c bei dieser Erkrankung ist bis heute nicht geklärt.

Die zweite Erkrankung, die mit einem mutierten SPPL2C-Gen assoziiert ist, ist die idiopathische Lungenfibrose (Raghu, 2011). Die Ursache dieser schweren, häufig tödlich verlaufenden Krankheit ist unbekannt. In einer *Genome-wide association study* (GWAS) konnte ein SNP in dem SPPL2C-Gen mit einer erhöhten Suszeptibilität für diese Erkrankung

identifiziert werden (Noth, 2013). Allerdings ist es ebenfalls noch ungeklärt, ob SPPL2c eine Rolle bei dieser Erkrankung spielt.

1.4 Potenzielle SPPL2c-Substrate

Aufgrund der anzunehmenden Lokalisierung von SPPL2c im ER (Friedmann, 2004) sowie der relativen Spezifität der SPPL-Proteasen für prozessierte Typ-II-Transmembranproteine soll im Rahmen dieser Arbeit eine Gruppe von ER-ständigen Transkriptionsfaktoren aus der ATF6-Familie als mögliche Substrate für SPPL2c untersucht werden.

Diese Transkriptionsfaktoren sind an der zellulären Reaktion auf ER-Stress als Teil der *Unfolded protein response* (UPR) beteiligt. Pathophysiologische Konditionen wie oxidativer Stress, Hypoglykämie, hohe Syntheserate an Proteinen im Rahmen von zellulären Umbauprozessen etc. erschweren das korrekte Falten von neu synthetisierten Proteinen und führen zu einer Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen im Endoplasmatischen Retikulum (sog. ER-Stress). Als Antwort darauf (die *Unfolded protein response*) wird im ER eine Serie von Signaltransduktionswegen aktiviert, die u.a. eine Reduktion der Neusyntheserate von Proteinen bewirkt. Einer der drei Hauptpfade der UPR wird über ATF6 vermittelt. ATF6 wird durch Mechanismen der Regulierten Intramembranproteolyse durch S1P und S2P aktiviert (Ye, 2000). Seit 1997 wurden verschiedene Gene, die für Transkriptionsfaktoren kodieren und eine hohe Sequenzhomologie mit dem ATF6-Gen aufweisen, beschrieben, die als mögliche Substrate für eine S2P-ähnliche Prozessierung durch SPPL2c im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden sollen. Diese Proteine sind: BBF2H7, TISP40, CREBH, OASIS und Luman. *Box B-binding factor 2 human homolog on chromosome 7* (BBF2H7) wurde aufgrund seiner Involvierung bei der Genfusion des *Fused in Sarcoma* (FUS)- und des BBF2H7-Gens während der Entstehung des niedriggradigen Fibromyxoid erstmals beschrieben (Storlazzi, 2003). Besonders stark ist das Protein im ER von Chondrozyten exprimiert. Zudem ist es aber auch in der Lunge, Milz, Hoden und Neuronen nachzuweisen (Asada, 2011). BBF2H7-defiziente Mäuse sterben kurz nach der Geburt durch Ersticken, da ihr Rippengerüst durch eine Chondrodysplasie zu schwach für die Druckbelastungen der Atembewegungen ist. Für BBF2H7 ist ebenfalls eine S1P-abhängige Prozessierung beschrieben (Kondo, 2007), allerdings ist die I-CLIP, die das NTF prozessiert, nicht bekannt.

Transcript induced in spermiogenesis 40 (TISP40) ist ein Transkriptionsfaktor, der in u. a. in murinen Spermatiden detektiert wurde (Nagamori, 2005). Es konnte gezeigt werden, dass mit einem KDEL-Retentionsmotiv modifizierte S1P in der Lage ist, TISP40b proteolytisch zu spalten (Nagamori, 2005). Allerdings ist noch unklar, durch welche Protease(n) die konsekutive Proteolyse des Membranfragments zur Generierung der transkriptionell aktiven intrazellulären Domäne erfolgt.

Cyclic adenosine monophosphate responsive element-binding protein H (CREBH) wurde als ein leberspezifischer *Basic leucine zipper domain* (bZIP)-Typ-Transkriptionsfaktor beschrieben, dessen Aktivierung die Expression von Akute-Phase-Proteinen in der Leber hervorruft (Zhang, 2006). CREBH besitzt eine RXXL-Sequenz als S1P-Erkennungsmotiv und wird unter ER-Stressbedingungen, hervorgerufen durch eine Inkubation der Zellen mit Tunicamycin (dieses blockiert die Bildung von N-Glykosylierungen), S2P-abhängig prozessiert.

Old astrocyte specifically induced substance (OASIS) wurde 1999 als Gen identifiziert, welches in lange kultivierten Astrozyten besonders stark exprimiert wird (Honma, 1999). Kondo *et al.* konnten zeigen, dass die proteolytisch prozessierte Form von OASIS in der Lage ist, die Promotorregion des *Binding immunoglobulin protein* (BiP)-Gens zu binden und dessen Expression zu induzieren (Kondo, 2005). BiP ist ein HSP70-Protein, welches für die korrekte Faltung von neu synthetisierten Proteinen sorgt und besonders stark unter ER-Stressbedingungen exprimiert wird. Für OASIS ist ebenfalls ein S1P- und S2P-abhängige Prozessierung beschrieben (Murakami, 2006).

Luman als letztes identifiziertes Mitglied der Gruppe der ATF6-ähnlichen Transkriptionsfaktoren wurde bislang nur in Neuronen des Ganglion trigeminale, Monozyten und dendritischen Zellen als Protein detektiert (Asada, 2011). Wie im Falle von TISP40 konnte auch hier gezeigt werden, dass mit einem KDEL-Motiv modifizierte S1P in der Lage ist, den ersten Schritt der proteolytischen Aktivierung von Luman durchzuführen (Raggo, 2002). Die Induktion von ER-Stress mittels Tunicamycin (s.o.) und Thapsigargin (blockiert eine ER-ständige Calciumpumpe und verhindert dadurch die Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen) in HEK293-Zellen sorgt allerdings nicht für eine Hochregulierung der Luman-Expression. Die Expression von ATF6 wird wiederum durch diese Substanzen induziert (van Galen, 2014). Es ist daher noch unklar, durch welche zellulären Mechanismen Luman vermehrt exprimiert wird (DenBoer, 2005).

Wie bereits unter 1.3.3.3 dargestellt, ist SPPL3 ein Regulator der Proteolyse und Sekretion von verschiedenen Glykosyltransferasen. Daher erscheint eine Involvierung von SPPL2c in vergleichbaren Prozessen denkbar: Ein im Rahmen dieser Arbeit untersuchtes Substrat ist *Alpha-1,3-mannosyl-glycoprotein 4-beta-N-acetylglucosaminyltransferase-like protein* (GnT1IP-L). GnT1IP-L wurde von Huang *et al.* als ein hodenspezifischer Inhibitor der *Alpha-1,3-mannosyl-glycoprotein 2-beta-N-acetylglucosaminyltransferase* (MGAT1) beschrieben (Huang, 2010). MGAT1 wird als Glucosaminyltransferase im Golgi-Apparat exprimiert, wo es an der Initiierung der Synthese von Komplex- und Hybrid-N-Glykanen beteiligt ist (Yip, 1997, Biswas, 2018). MGAT1-defiziente Mäuse zeigen schwere histologische Defekte der *Tubuli seminiferi* und sind unfruchtbar (Batista, 2012). GnT1IP-L ist ein Typ-II-Transmembranprotein und ist u.a. im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert; die Inhibition von MGAT1 erfolgt

allerdings im Golgi-Apparat, wo es mittels einer luminalen Domäne die Aktivität von MGAT1 hemmt (Huang, 2015). Ob GnT1IP-L oder seine kürzere Isoform GnT1IP-S RIP-abhängig prozessiert werden, ist allerdings noch unklar.

1.5 Aufbau und Funktion der männlichen Geschlechtsorgane

Als männliche Geschlechtsorgane bezeichnet man die paarigen Hoden (*Testes*), die Nebenhoden (*Epididymides*), die akzessorischen Geschlechtsdrüsen sowie die äußeren Genitale. Neben der Generierung von männlichen Keimzellen stellt Produktion von Testosteron die Hauptaufgabe des Hodens als endokrines Organ dar. Dieses wird im interstitiellen Kompartiment durch die Leydigzellen produziert. Innerhalb der Hodenkanälchen (*Tubuli seminiferi*) werden die männlichen Keimzellen, die *Spermatozoen* oder Spermien produziert. Dieser Prozess wird als Spermatogenese bezeichnet. Die *Tubuli seminiferi* bestehen aus mehreren Schichten kontraktiler Myofibroblasten, die die *Lamina propria* bilden, der Basalmembran und dem Keimepithel. Die *Tubuli seminiferi* machen circa 60-80 % des Hodenvolumens aus (Ilacqua, 2018). Das Keimepithel liegt der Lamina propria auf und setzt sich aus den somatischen Sertoli-Zellen und den Keimzellen zusammen.

Die Sertoli-Zellen sind postmitotische Zellen, deren Zytoplasma sich von der Basallamina bis zum Tubululumen erstreckt. Ihre Funktionen innerhalb des Tubulusepithels sind vielfältig; mittels *tight junctions* unterteilen sie das Keimepithel in ein basales und adluminale Kompartiment und formen damit die Blut-Hoden-Schranke (BHS). Die Blut-Hoden-Schranke dient der immunologischen Abschirmung der Keimzellen, welche aufgrund der Neukombination des genetischen Materials während der ersten meiotischen Teilung Oberflächenantigene exprimieren, die eine Autoimmunreaktion hervorrufen würden. Weiterhin schirmt die BHS die empfindlichen Keimzellen vor exogenen, chemischen Schadstoffen ab. Zusätzlich sorgen die Sertoli-Zellen für die Versorgung der Keimzellen mit Nährstoffen aus den um die Hodenkanälchen gelegenen Kapillaren und phagozytieren die sog. Residualkörper, die im Rahmen der Bildung der Spermatozoen entstehen (s.u.).

Ablauf der Spermatogenese

Als Spermatogenese wird die Generierung der männlichen Gameten innerhalb der *Tubuli seminiferi* bezeichnet. Die Entwicklung der Keimzellen verläuft von basal nach adluminal und benötigt beim Menschen circa 10 Wochen, bei der Maus etwa 35 Tage (Oakberg, 1957). Pro Stunde werden im menschlichen Hoden schätzungsweise 1-2 Millionen Spermatozoen produziert. Üblicherweise erfolgt die Einteilung der Spermatogenese in drei Teilkapitel: Vermehrung, Reifung und Differenzierung (Lippert, 2006, Lüllmann-Rauch, 2009). Abbildung 3 zeigt dazu ein vereinfachendes Schema.

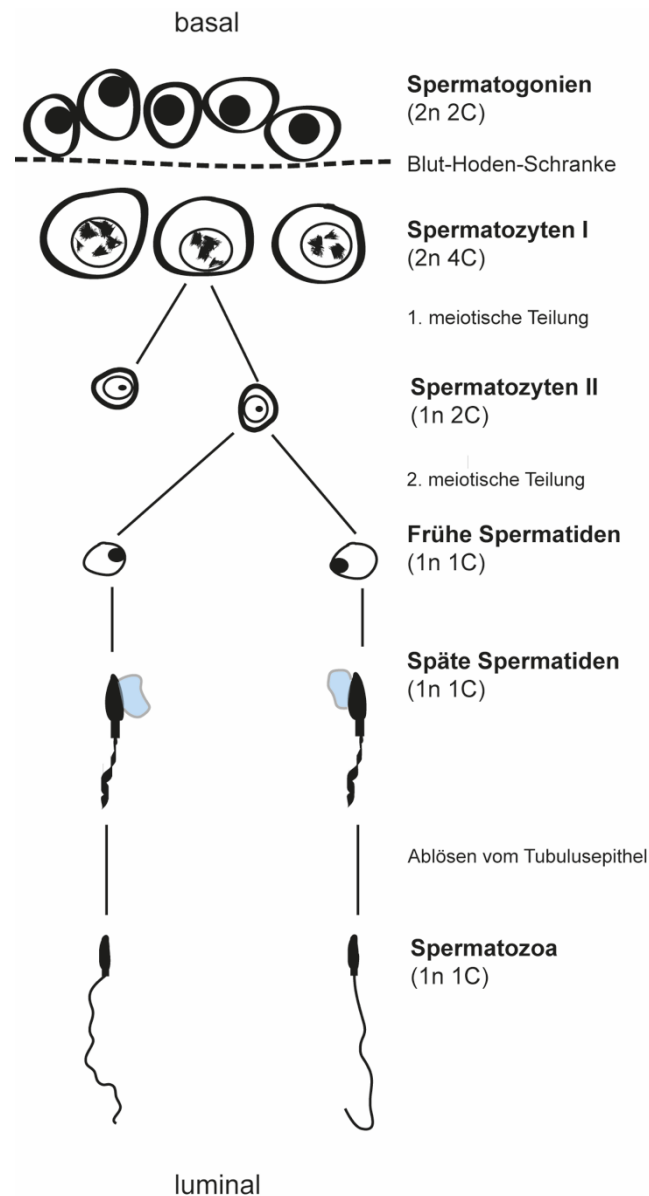


Abbildung 3: Überblick über die Spermatogenese: Zellgröße und Zellmorphologie sind schematisch dargestellt. Die verschiedenen Reifestadien und der Chromosomengehalt von den männlichen Keimzellen sind an der rechten Seite angegeben. N = Zahl der Chromosomensätze, C = Zahl der Chromatiden pro Chromosomenpaar bzw. bei $n = 1$ pro Chromosom, bläulich dargestellt sind die Residualkörper (modifiziert nach Lüllmann-Rauch, 2009).

Ausgehend von den Stammzellen-Spermatogonien bilden sich zwei Populationen von Spermatogonien: Typ-A-Spermatogonien und Typ-B-Spermatogonien. Die Typ-A-Spermatogonien gehen direkt aus den Stammzell-Spermatogonien hervor und teilen sich mehrfach mitotisch (*Vermehrung*), wobei nach der ersten Teilung eine Typ-A-Spermatogonie bei den Stammzell-Spermatogonien verbleibt und den Stammzellvorrat erneuert. Die restlichen Zellen werden als Typ-B-Spermatogonien bezeichnet, welche den mitotischen Teilungszyklus verlassen und die erste meiotische Teilung vorbereiten. Dazu duplizieren sie ihren DNA-Gehalt und gelangen mittels eines Schleusenmechanismus durch die Blut-Hoden-Schranke und dann werden als Spermatozyten I bezeichnet.

Nach dem Abschluss der ersten meiotischen Teilung entstehen aus einem Spermatozyten I zwei Spermatozyten II (sekundäre Spermatozyten), welche umgehend -ohne erneute DNA-Replikation- mit der zweiten meiotischen Teilung beginnen und daher im histologischen Schnitt selten zu sehen sind. Aus je einem sekundären Spermatozyten entstehen dann jeweils zwei (frühe) Spermatiden (*Reifung*).

Die weitere Entwicklung der frühen Spermatiden zur späten Spermatide ist durch drei Prozesse gekennzeichnet, bei denen die Zellen ihre Form dramatisch verändern (*Differenzierung*). Durch Zellkernkondensierung wird das Kernvolumen auf 10 % des Ursprungsvolumens reduziert. Zusätzlich wird aus dem Golgi-Apparat das *Akrosom* gebildet, ein modifiziertes Lysosom, welches sich kappenförmig über den vorderen Kernpol legt und verschiedene hydrolytische Enzyme enthält, die während der Befruchtung bei der Durchdringung der *Zona pellucida* der Eizelle benötigt werden. Es kommt zudem zur Ausbildung einer Kinozilie, die für die Vorwärtsbewegung der Spermatiden im männlichen und weiblichen Reproduktionstrakt benötigt wird. Zuletzt kommt es zur *Spermiation*, dem Lösen der Verbindungen zwischen Sertoli-Zelle und Spermatiden. Dabei werden sämtliche, nicht mehr benötigte Zellorganellen und überschüssiges Zytoplasma von den Spermatiden abgestoßen und als „Residualkörper“ von den Sertoli-Zellen phagozytiert und abgebaut (O'Donnell, 2011). Die nun als Spermatozoen bezeichneten Keimzellen werden abschließend in das Tubuluslumen abgegeben. Nach der erfolgten Spermatogenese verlassen die Spermien den Hoden über die Samenwege (*Ductuli efferentes*) und gelangen in den Nebenhodengang (*Ductus epidymidis*). Innerhalb des Nebenhodens erwerben die Spermatozoen ihre funktionelle Reife und werden gespeichert. Über den Samenleiter (*Ductus deferens*) gelangen die Spermien in die *Pars prostatica* der Urethra, wo sie mit dem Drüsensekret der Prostata und Bläschendrüsen vermengt werden und das *Sperma* bilden.

1.6 Ziele dieser Arbeit

SPPL2c ist die bislang am geringsten untersuchte der bekannten Aspartyl-Intramembranproteasen. Im Rahmen dieser Arbeit soll daher eine eingehende funktionelle Charakterisierung des Proteins SPPL2c durchgeführt werden.

Dafür sollen anhand von Überexpressionsstudien in Zellmodellsystemen Einblicke über grundlegende zellbiologische Charakteristika der Protease gewonnen werden. Zusätzlich soll mittels klassischen biochemischen und immunhistochemischen Methoden - unter Zuhilfenahme eines Reportersystems - eine Untersuchung des bislang ungeklärten Gewebeexpressionsmusters vorgenommen werden. Aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen sollen erste Rückschlüsse über mögliche Funktionen der Protease gezogen werden. Um zu überprüfen, ob SPPL2c eine aktive Protease ist, sollen mehrere Typ-II-Transmembranproteine auf eine mögliche Prozessierung durch SPPL2c in zellbasierten Überexpressionsstudien untersucht werden.

In dem zweiten Teil dieser Arbeit soll eine Phänotypisierung von SPPL2c-defizienten Mäusen vorgenommen werden. Mittels histologischer, durchflusszytometrischer sowie speziellen Einzelzelluntersuchungen sollten Gewebe und Zellen der mSPPL2c^{-/-}-Mäuse untersucht werden und Unterschiede zu Wildtyp-Mäusen detektiert und quantifiziert werden. In einem letzten Schritt soll der Vergleich der Expression der verschiedenen SPP/SPPL-Proteasen im Hinblick auf die Spermatogenese vorgenommen werden, um zu klären, ob diese in den gleichen Organen und Zellen *in vivo* exprimiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Sämtliche Standardchemikalien wurden von den Firmen Roth, Sigma-Aldrich oder Merck geliefert, falls nicht anders vermerkt. Die Reagenzien wiesen den Reinheitsgrad *pro analysi* (p.a) auf.

Tabelle 2: Überblick über die verwendeten Chemikalien.

| Chemikalien | Hersteller |
|---------------------------------------------------|-------------------|
| 10x Pfu Puffer | Thermo Scientific |
| 2mM dNTP Mix | Thermo Scientific |
| 6x DNA loading dye | Thermo Scientific |
| Accutase | eBioscience |
| Acrylamidstammlösung mit 0,8% Bisacrylamid 37,5:1 | Roth |
| Agar-Agar | Roth |
| Agarose, LE | Biozym |
| Ampicillin | Roth |
| BamHI | Thermo Scientific |
| Benzoessäure-Methylester | Roth |
| Bouin'sche Lösung | Sigma - Aldrich |
| BSA, Fraktion V | Roth |
| C-Chip Neubauer Improved DHC-N01 | Biochrome |
| Complete Protease Inhibitor Cocktail | Roche Diagnostics |
| DABCO | Sigma - Aldrich |
| DAPI | Sigma - Aldrich |
| DMEM | Thermo Scientific |
| DMSO | Roth |
| DRAQ5™ | eBioscience |
| Dream Taq | Thermo Scientific |
| Dream-Taq-Puffer | Thermo Scientific |
| DTT | Roth |
| Endoglycosidase H | Roche Diagnostics |
| Ethidiumbromidlösung 1% | Roth |
| FCS | Thermo Scientific |

| Chemikalien | Hersteller |
|--------------------------------------|-------------------|
| GeneRuler 1kb / 100bp DNA Ladder | Thermo Scientific |
| Hämalaun | Merck |
| HindIII | Thermo Scientific |
| Kernecht-Aluminiumsulfatlösung | Roth |
| Ketamin | Pharmanovo |
| Milchpulver, blotting grade, fettarm | Roth |
| NotI | Thermo Scientific |
| NP-40 | Calbiochem |
| PageRuler Plus | Thermo Scientific |
| Paraformaldehyd | Sigma |
| Pefabloc® SC-Protease-Inhibitor | Roth |
| Penicillin-Streptomycin | Sigma - Aldrich |
| Pfu Polymerase | Thermo Scientific |
| Phusion HF-Puffer | Thermo Scientific |
| Phusion Polymerase | Thermo Scientific |
| PNGase F | Roche Diagnostics |
| Puffer G, O, R | Thermo Scientific |
| Rotiplast | Roth |
| Saponin | Roth |
| SDS - Pellets | Roth |
| SyBR®-Safe DNA Gel Stain | Thermo Scientific |
| T4 DNA Ligase | Thermo Scientific |
| T4-DNA-Ligase-Puffer | Thermo Scientific |
| TEMED | Roth |
| Triton X-100 | Sigma - Aldrich |
| Tunicamycin | Sigma - Aldrich |
| Turbofect Transfektionsreagenz | Thermo Scientific |
| Tween® 20 | Roth |
| Wasserstoffperoxid | Roth |
| XbaI | Thermo Scientific |
| X-Gal Substrat | Trade Service |
| XhoI | Thermo Scientific |
| Xylazin | Bayer |

2.1.2 Gerätschaften, Labormaterialien, Kits und Computerprogramme

Die Tabellen 3 bis 6 zeigen die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Gerätschaften, Labormaterialien, Kits und Computerprogramme.

Tabelle 3: Überblick über die verwendeten Gerätschaften.

| Gerät | Bezeichnung | Hersteller |
|---------------------------------------|----------------------|-------------------|
| 37°C-Inkubationsschrank | B6760 | Heraeus |
| 37°C-Inkubationsschrank (Zellkultur) | Hera Cell 150 | Electron |
| 4°C-Kühlzentrifuge | Microstar 17 R | VWR |
| Autoklav | DX-150 | Systec |
| Chemolumineszenzkamera | Image Quant LAS 4000 | GE Healthcare |
| Cryostat | CM3050 S | Leica |
| Dispersiergerät | Ultra-Turrax® | IKA |
| Durchflusszytometer | FACSCanto | BD Bioscience |
| Durchlaufskühlungsgerät (Ultraschall) | Multistar | Heinemann |
| Durchlichtmikroskop | BX 50 | Olympus |
| Elektrische Pipettierhilfe | accujet-pro® | Brand |
| Elektrophoresekammer (DNA) | Sub-cell-GT | BioRad |
| Elektrophoresekammer (SDS) | Mini Protean II | BioRad |
| Elektroporationsgerät | Pulse Controller | BioRad |
| Feinwaage | KERN 770 | Eydam |
| Fluoreszenzmikroskop | DMi 8 | Leica |
| Große Untertischkühlzentrifuge | Heraeus Multifuge | Thermo Scientific |
| Große Zentrifuge (Midi) | J2-HS, Rotor: JA17 | Beckman |
| Heizblock | Thermomixer 5436 | Eppendorf |
| Homogenisator | 40 / E | XENOX |
| Kleine Tischzentrifuge | Centrifuge 5415 D | Eppendorf |
| Konfokales Fluoreszenzmikroskop | FluoView1000 | Olympus |
| Lichtmikroskop | Eclipse TS 100 | Nikon |
| Multifunktionsplattenlesegerät | Synergy HAT | Bio-Tek |
| PCR-Cycler | Geneamp PCR System | PerkinElmer |
| Potter-Homogenisator | Homogenisator | VWR |
| pH-Meter | Digital-pH-Meter 646 | Eydam |
| Reinstwasseranlage | Milli-Q Plus | Millipore |
| Sterilbank | UFR 1806 | Bio-Flow |
| Spannungsgerät | PowerPac Basic | BioRad |
| Transferkammer (SDS-Gele) | Trans-Blot SD-Cell | BioRad |

| Gerät | Bezeichnung | Hersteller |
|------------------|-----------------------|-----------------|
| Ultraschallgerät | Sonifier 450 | Branson |
| Ultrazentrifuge | TLX Ultracentrifuge | Optima™ |
| UV-Tisch | Reprostar | INTAS |
| Vortexer | VortexGenie | Bender + Hobein |
| Waage | MC Laboratory LC 4200 | Sartorius |

Tabelle 4: Überblick über die verwendeten Labormaterialien.

| Material | Hersteller |
|------------------------------------------------------------|-------------------|
| Coverslips | VWR |
| Cryomatrix | Thermo Scientific |
| Deckgläser | VWR |
| Elektroporationsküvette | PeqLab |
| Glasflaschen (100 ml, 500 ml, 1000 ml) | Schott |
| Menzel-Gläser Superfrost® Plus (beschichtete Objektträger) | Thermo Scientific |
| Mikro-Schraubröhre 2ml | Sarstedt |
| Nitrocellulosemembran (<i>Western Blot</i>) | GE / Amersham |
| Objektträger, unbeschichtet | Marienfeld |
| Parafilm | VWR |
| Pipette 10 µl | Eppendorf |
| Pipette 100 µl, 1000 µl | Gilson |
| Pipettenspitzen | Sarstedt |
| Reagiergefäß 1,5 ml | Sarstedt |
| Röhre (15 ml, 50 ml) | Sarstedt |
| Serologische Pipetten (5ml, 10 ml, 25 ml) | Sarstedt |
| Glasplatten für Elektrophorese | BioRad |
| Whatman-Papier | GE Healthcare |
| Zellkulturschale 10 cm / 6 cm Durchmesser | Sarstedt |
| Zellkultur-well-Platten (6er, 12er, 96er) | Sarstedt |
| Zellschaber | TPP |
| Zellsieb | Corning |

Tabelle 5: Überblick über die verwendeten Computersoftware.

| Verwendete Computersoftware | Hersteller |
|--------------------------------------|---------------|
| Adobe Illustrator CS6 Version 16.0.3 | Adobe Systems |
| Adobe Photoshop CS6 13.0.1 | Adobe Systems |
| FV10-ASW 4.2 | Olympus |
| Flow-Jo, Version 10.2 | FlowJo |

Tabelle 6: Überblick über die verwendeten Kits.

| Name | Hersteller |
|----------------------------------------|-------------------|
| BCA Protein Assay Kit | Thermo Scientific |
| High Pure PCR Product Purification Kit | Roche |
| Gene JET Plasmid Miniprep Kit | Thermo Scientific |
| Pure Yield Plasmid Midiprep System | Promega |
| DAB Peroxide Substrate Kit SK-4100 | Vector Lab. |
| NucleoSpin® RNA Plus | Macherey-Nagel |

2.1.3 Zelllinien

Folgende Zelllinien wurden für die Erstellung dieser Arbeit eingesetzt (Tabelle 7).

Tabelle 7: Liste der verwendeten Zelllinien.

| Zelllinie | Spezies | Zelltyp | Medium | Herkunft |
|-----------|---------------------|---------------|---------------|----------|
| HeLa | <i>Homo sapiens</i> | Epithelzellen | DMEM komplett | DSMZ |
| HEK 293 | <i>Homo sapiens</i> | Epithelzellen | DMEM komplett | DSMZ |

Abkürzungen: HeLa = Humane Adenokarzinomzellen, HEK = *Human embryonic kidney cells*, DSMZ = Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, DMEM = Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Zusammensetzung s. Tabelle 9.

2.1.4 Konstrukte

Für die Herstellung von Konstrukten wurde auf den Vektor pcDNA 3.1/Hygro⁺(Invitrogen) zurückgegriffen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die in Tabelle 8 aufgelisteten Konstrukte eingesetzt. Die Sequenzen der zur Klonierung eingesetzten *Primer* finden sich im Anhang unter Tabelle 44. Details zur Klonierung finden sich unter 2.4.6.

Tabelle 8: Liste der verwendeten Konstrukte.

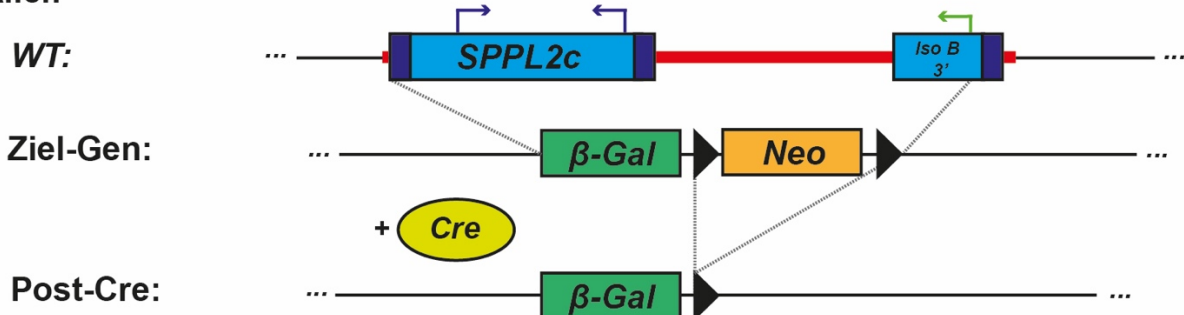
| Gen | tag | Variante | Herkunft |
|---------------|-----|----------|--------------------|
| mSPPL2c-Iso A | myc | WT | AG Schröder |
| mSPPL2c-Iso A | – | WT | AG Schröder |
| mSPPL2c-Iso A | myc | D457A | AG Schröder |
| mSPPL2c-Iso A | – | D457A | AG Schröder |
| mSPPL2c-Iso A | myc | N106A | Eigene Herstellung |
| mSPPL2c-Iso B | myc | WT | AG Schröder |
| mSPPL2c-Iso B | – | WT | AG Schröder |
| mSPPL2c-Iso B | myc | N106A | Eigene Herstellung |
| mSPPL2c-Iso B | myc | D457A | AG Schröder |
| mSPPL2c-Iso B | – | D457A | AG Schröder |
| mSPP | myc | WT | AG Schröder |
| mSPP | myc | D239A | AG Schröder |
| mBBF2H7 | HA | WT | Eigene Herstellung |
| mTISP40 | HA | WT | Eigene Herstellung |
| mCREBH | HA | WT | Eigene Herstellung |
| mOASIS | HA | WT | Eigene Herstellung |
| mLuman | HA | WT | Eigene Herstellung |
| mGnT1P-L | HA | WT | AG Schröder |
| mGnT1P-S | HA | WT | AG Schröder |

2.1.5 Mauslinien

Die verwendeten Mäuse wurden in individuell belüfteten Käfigen (*Individually ventilated cages, IVCs*) bei einer Temperatur zwischen 19-22 °C und einer Luftfeuchtigkeit von ca. 50% gehalten. Es wurde ein Tagesrhythmus von 12 Stunden Helligkeit und 12 Stunden Dunkelheit eingehalten. Als Nahrungsmittel wurde Trockenfutter der Firma Ssniff Spezialitäten (Soest) eingesetzt. Der Umgang mit den Mäusen erfolgte gemäß den Richtlinien der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. Die Durchführung von Tierexperimenten wurde vom Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt, Natur und Digitalisierung Schleswig-Holstein genehmigt (Aktenzeichen: V242-4255/2018). Sämtliche Tierexperimente wurden an Geschwistertieren durchgeführt oder es wurden Kontrolltiere aus der gleichen Zucht mit entsprechendem Alter oder Geschlecht verwendet.

Für die Generierung von SPPL2c-defizienten Mäuse ($mSPPL2c^{-/-}$) wurde auf ein Cre/loxP-System zurückgegriffen (s. Abbildung 4). In den $SPPL2c^{-/-}$ -Mäusen stand die Expression einer β -Galaktosidase unter der Kontrolle des endogenen SPPL2c-Promoters und konnte so als Reportergen verwendet werden. Nähere Details zur Generierung der $SPPL2c^{-/-}$ -Mäuse finden sich unter der Abbildung 4 sowie unter Niemeyer, 2019.

Allel:



RT-PCR-Primer



Abbildung 4: Generierung der $SPPL2c^{-/-}$ -Maus (nach Niemeyer, 2019):

Bei der Deletion des für SPPL2c kodierenden Genlocus wurde die Sequenz einer bakteriellen β -Galaktosidase (β -Gal aus *E.coli*) und eine Resistenzkassette für Neomycin (*Neo*) eingefügt. Die Neomycin-Resistenzkassette wurde vor der Analyse der $mSPPL2c$ -defizienten Mäuse durch Verpaarung mit Mäusen, die ein Cre-Deleter-Allel trugen, entfernt. Vermerkt sind zudem die Positionen der Primer, die für die RT-PCR eingesetzt wurden.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Kultivierung von Zelllinien

Die Arbeit mit lebenden Säugerzelllinien erfolgte unter der Sterilbank. Als Zellkulturmedium diente DMEM (Thermo Scientific), zu dem folgende Substanzen hinzugefügt wurden:

Tabelle 9: Zusammensetzung des modifizierten Zellkulturmediums.

| Medium | Chemikalien |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| DMEM komplett | DMEM 10% FCS 500 <i>units</i> Penicillin 0,05 % (w/v) Streptomycin |

Abkürzungen: DMEM = Dulbecco's Modified Eagle's Medium, FCS = Fetales Kälberserum.

Die Zellkulturschalen wurden im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Nachdem die Zellen den Boden der Zellkulturschalen zu einer Konfluenz von 90 % überwachsen hatten, wurden die Zellen wie folgt passagiert:

Zunächst erfolgte das Absaugen des verbrauchten Zellkulturmediums, anschließend wurden die Schalen mit sterilem PBS gespült. Um die Zellen vom Boden der Zellschale zu lösen, wurde 1 ml Accutase (eBioscience) zu der Zellkultur gegeben. Anschließend wurde die Zellschale für 15 Minuten im Brutschrank inkubiert. Schließlich wurde 9 ml des modifizierten DMEM hinzugefügt und die Zellen wurden durch vorsichtiges Suspendieren in Lösung gebracht. Abschließend erfolgte die Verteilung der Suspension in der gewünschten Verdünnung auf eine neue Zellkulturschale.

Tabelle 10: Zusammensetzung des PBS-Puffers.

| Puffer | Chemikalien |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| PBS | 137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄ mit NaOH auf pH=7,4 einstellen |

2.2.1.2 Transiente Transfektion von Zelllinien

Um ein bestimmtes Protein von den Zellen exprimieren zu lassen, wurde eine transiente Transfektion mit Hilfe des Transfektionsreagenz Turbofect (Thermo Scientific) durchgeführt. Dazu wurden bei 6-cm-Zellkulturschalen je 2,5 µg Plasmid-DNA und 5 µl Transfektionsreagenz in 200 µl DMEM, bei 10-cm-Zellkulturschalen je 5 µg Plasmidkonstrukt und 10 µl Transfektionsreagenz in 500 µl DMEM suspendiert, für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend gleichmäßig auf die zu ca. 50% konfluent bewachsene Zellschale gegeben. Nach 6 - 8 Stunden wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um das zytotoxische Transfektionsreagenz zu entfernen. Die anschließende Ernte der Zellen für proteinbiochemische Untersuchungen oder die Fixation der Zellen für immunhistochemische Untersuchungen erfolgte in der Regel 24 Stunden nach Beginn der Transfektion.

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Herstellung von Zelllysaten

Zur Isolierung der zellulären Proteine wurden die Zellschalen zunächst auf Eis gestellt und das Zellmedium durch Absaugen entfernt. Die Zellen wurden dann mit gekühltem PBS gewaschen und mittels eines Zellschabers vom Boden der Zellschale gelöst. Sie wurden anschließend in die PBS / Complete-Lösung aufgenommen und für 5 Minuten bei 1000 x g bei 4°C zentrifugiert (*erster Abschnitt*).

Tabelle 11: Zusammensetzung des PBS / Complete.

| Puffer | Chemikalien |
|-----------------------|---------------------------------------------------------|
| PBS / Complete | 1 x PBS 1 x Complete Protease Inhibitor 4 mM EDTA |

Die sedimentierten Zellen wurden anschließend in 50-100 µl Lysispuffer (je nach Zellmenge) resuspendiert, mittels Ultraschall (20 Mal je eine Sekunde bei Stufe 4) lysiert und eine Stunde auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben für 10 Minuten bei 16.200 x g bei 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Abschließend folgte die Bestimmung der Proteinkonzentration mit Hilfe des *BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific) (*zweiter Abschnitt*).

Tabelle 12: Zusammensetzung des Lysispuffers.

| Puffer | Chemikalien |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Lysispuffer | 50 mM Tris (HCl), pH=7,4 150 mM NaCl 1 % Triton X-100 0,1 % SDS 1x Complete Protease Inhibitor Cocktail 4 mM Pefabloc® 0,5 µg/ml Pepstatin A 4 mM EDTA |

2.2.2.2 Aufreinigung und Isolierung von Proteinen aus Geweben

Zunächst wurden die Mäuse mittels zervikaler Dislokation getötet und die zu untersuchenden Organe freipräpariert. Die Organe wurden gewogen und zerkleinert bzw. im Fall des Hodens von der *Tunica albuginea* befreit. Anschließend wurden pro Milligramm Organgewicht das neunfache Volumen an Lysispuffer, welcher zunächst keine schaumbildenden Substanzen wie SDS oder Triton X-100 enthielt, zu den Organlysaten gegeben. Die anschließende Homogenisierung erfolgte mit Hilfe des Homogenisators 40 / E (Xenox). Danach wurden die Detergenzien SDS und Triton zu einer Konzentration von 1% bzw. 0,1% zu den Lösungen gegeben. Es erfolgte eine einstündige Inkubation auf Eis. In dieser Zeit wurden die Proben zwei Mal mit Ultraschall behandelt (Stufe 4, 20 Mal für je eine Sekunde). Anschließend wurden die Proben für 15 Minuten bei 16.200 x g bei 4°C zentrifugiert und der mittlere Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Auch hier schloss sich eine Bestimmung der Proteinkonzentration mittels des BCA-Assays an.

2.2.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* von Thermo Scientific nach Angaben des Herstellers. Für die Kalibrationskurve wurde ein Albumin-Standard von Pierce eingesetzt, welcher in steigenden Konzentrationen von 0 bis 2 µg/ml vorgelegt wurde. Die Messung der Extinktion erfolgte bei einer Wellenlänge von 595 nm mit dem Multifunktionsplattenlesegerät *Synergy HT* von Bio-Tek.

2.2.2.4 Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE

Für eine molekülgrößenabhängige Auftrennung der in den Lysaten enthaltenen Proteine wurde eine *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) durchgeführt. Zuvor wurden die Proben mittels SDS-PAGE-Probenpuffer denaturiert und auf ein identisches Konzentrationsniveau gebracht. Dem SDS-PAGE-Probenpuffer wurde neben SDS, das für eine Denaturierung und Überdeckung der Eigenladung der Proteine sorgt und Dithiothreitol (DTT), welches für eine Reduzierung der Disulfidbrücken sorgt, auch Bromphenolblau zugefügt, welches ein ungefähres Abschätzen der Lauffront im Gel ermöglichte.

Tabelle 13: Zusammensetzung des SDS-PAGE-Probenpuffers.

| Puffer | Chemikalien |
|---------------------------------|-------------------------------------------------------|
| 5x SDS-PAGE-Probenpuffer | 5 % SDS 50 % Glycerol 625 mM TRIS 500 mM DTT |

Die SDS-Gele wurden aus den folgenden Ausgangskomponenten hergestellt:

Tabelle 14: Zusammensetzung der SDS-Gele.

| Komponente | Trenngel (7,5 %) | Trenngel (10%) | Sammelgel (4,5 %) |
|--------------------------------------------------------------|------------------|----------------|-------------------|
| Trenngelpuffer | 2,6 ml | 2,6 ml | - |
| Sammelgelpuffer | - | - | 1,35 ml |
| 30 % Acrylamid/Bisacrylamid (Rotiphorese Gel 30 [37,5:1]) | 2,5 ml | 3,3 ml | 1,75 ml |
| H ₂ O dd. | 4,8 ml | 4,0 ml | 3,1 ml |
| APS (10 %) | 60 µl | 60 µl | 60 µl |
| TEMED | 30 µl | 30 µl | 30 µl |

Tabelle 15: Zusammensetzung des Sammelgelpuffers.

| Puffer | Chemikalien |
|------------------------|---------------------------------------------------------------|
| Sammelgelpuffer | 0,5 M TRIS 0,4 % SDS mit NaOH auf pH=6,8 einstellen |

Tabelle 16: Zusammensetzung des Trenngelpuffers.

| Puffer | Chemikalien |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------|
| Trenngelpuffer | 1,5 M TRIS 0,4% SDS mit NaOH auf pH=8,8 einstellen |

Je nach Fragestellung wurden zwischen 20-50 µl Probelösung in die Geltasche geladen. Vor dem Auftragen erfolgte ein fünfminütiges Erhitzen der Proben auf 56 °C. Es wurde zunächst eine Spannung von 80 V angelegt, bis die Laufront der Elektrophorese das Trenngel erreicht hatte. Anschließend wurde die Spannung bis zum Ende der Gelelektrophorese auf 120 V erhöht.

Tabelle 17: Zusammensetzung des Elektrophoresepuffers.

| Puffer | Chemikalien |
|-----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Elektrophoresepuffer | 0,193 M Glycin 0,1 % (w/v) SDS 25 mM TRIS mit HCl auf pH=7,4 einstellen |

2.2.2.5 Western Blotting

Western Blotting beschreibt ein Verfahren zur Übertragung von gelelektrophoretisch getrennten Proteinen (SDS-PAGE) auf eine Nitrocellulosemembran. Das in dieser Arbeit verwendete *Semi-Dry-Blotting*-Verfahren erfolgte mit Hilfe der *Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell* von der Firma BioRad. Dafür wurden zunächst vier Lagen Filterpapier (*Gel blotting paper*, Whatman) und eine Membran (Whatman Protran Nitrocellulose Transfer Membran, GE / Amersham) auf ein einheitliches Format geschnitten und anschließend in Semidry-Transferpuffer getränkt (s. Tabelle 18). Der Aufbau des Blottes erfolgte wie folgt (von unten nach oben):

- Anode
- Zwei Lagen Filterpapier
- Nitrocellulosemembran
- SDS-PAGE-Gel
- Zwei Lagen Filterpapier
- Kathode

Der Transfer erfolgte bei einer Stromstärke von 65 mA pro Membran für 120 Minuten.

Tabelle 18: Zusammensetzung des Semidry-Transferpuffers.

| Puffer | Chemikalien |
|-------------------------------|----------------------------------------------------|
| Semidry-Transferpuffer | 0,193 M Glycin 20% Methanol (v/v) 25 mM TRIS |

2.2.2.6 Proteindetektion auf Nitrocellulosemembranen

Nach dem *Western Blotting* wurden die Membranen zunächst für eine Stunde bei Raumtemperatur im Blockierpuffer inkubiert. Dies reduzierte bei der nachfolgenden Inkubation der Membranen mit Primärantikörpern die unspezifische Bindungen. Wurden Proben aus Organlysaten verwendet, erfolgte das Blocken über Nacht mit 5 % bovinem Serumalbumin (BSA) in TBS/T.

Tabelle 19: Zusammensetzung der für die Proteindetektion verwendeten Puffer.

| Puffer | Chemikalien |
|-----------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| TBS | 137 mM NaCl 2,7 mM KCl 25 mM TRIS mit HCl auf pH=7,4 einstellen |
| TBS/T | 1 % (v/v) Tween® 20 in 1x TBS |
| Blockierpuffer | 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS/T |

Nach der Inkubation in dem Blockierpuffer wurden die Nitrocellulosemembranen für die Proteindetektion mit den Primärantikörpern für eine Stunde bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei 4°C inkubiert. Die jeweilige Verdünnung der Antikörper findet sich in der Tabelle 20. Die Verdünnung der Primärantikörper erfolgte in dem Blockierpuffer.

Tabelle 20: Liste der verwendeten Primärantikörper.

| Name | Spezies | Quelle | Verdünnung |
|-----------------------------|-----------|-----------------|-----------------------------------|
| mSPPL2c E3 R2* ¹ | Kaninchen | Pineda | IF: 1:100, WB: 1:1000, IHC: 1:100 |
| mSPPL2c CT R2* ² | Kaninchen | Pineda | IF: 1:100, WB: 1:1000, IHC: 1:100 |
| mSPPL2b CT R1 | Kaninchen | Pineda | IHC: 1:100 |
| mSPPL2b CT R2 | Kaninchen | Pineda | WB: 1:200 |
| hSPPL2a CT R2 | Kaninchen | Pineda | IHC: 1:100 |
| mSPPL2a E3R2 | Kaninchen | Pineda | WB: 1:200 |
| CD44 | Kaninchen | Pineda | WB: 1:1000 |
| Aktin (Klon JLA20) | Kaninchen | Sigma - Aldrich | WB: 1:2000 |
| myc (Klon 9B11) | Maus | Cell Signaling | IF: 1:100, WB: 1:1000 |
| HA (Klon 3F10) | Ratte | Roche | WB: 1:1000 |
| GAPDH | Kaninchen | Santa Cruz | WB: 1:4000 |
| eEF2 | Kaninchen | Abcam | WB: 1:5000 |
| LIMP-2 (Tier 2) | Kaninchen | Pineda | WB: 1:1000 |

| Name | Spezies | Quelle | Verdünnung |
|-------------------|-----------|-------------------------|------------|
| SPP | Kaninchen | AG Herman ^{*3} | IHC: 1:100 |
| β-Galaktosidase | Maus | Promega | WB: 1:1000 |
| CD44 (IM7) | Ratte | Biolegend | WB: 1:1000 |
| KDEL (Klon 10C3) | Maus | Enzo | IF: 1:100 |
| GM130 (Klon 35) | Maus | BD Bioscience | IF: 1:250 |
| ERGIC53 (Klon OT) | Maus | Enzo | IF: 1:500 |

Abkürzungen: IF = Immunofluoreszenz, WB = *Western Blot*, DAB = 3,3-diaminobenzidin, IHC = Immunhistochemie, AS = Aminosäure, ^{*1}: AS: 232 - 241, ^{*2}: AS: 672 – 690, ^{*3}: Referenz für den SPP-Antikörper: Urny, 2003.

Im Anschluss wurden die Membranen für viermal 15 Minuten in TBS/T bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Nach diesem Waschschrift erfolgte die Inkubation mit *Horseradish peroxidase* (HRP)-gekoppelten Sekundärantikörpern, die jeweils speziesspezifisch an die Primärantikörper banden (Verdünnungen siehe Tabelle 20 und Tabelle 21). Diese wurden ebenfalls in Blockierpuffer verdünnt. Nach einem erneuten Waschschrift (viermal 15 Minuten in TBS/T) erfolgte die Detektion der HRP-Aktivität mit *Amersham ECL Advance Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare) und dem *ImageQuant Las4000* (GE Healthcare).

Tabelle 21: Überblick über die verwendeten Sekundärantikörper.

| Name | Konjugation | Quelle | Verdünnung |
|--------------------|-----------------------------|-------------------|-------------|
| Anti-Maus IgG | Meerrettichperoxidase | Dianova | WB: 1:15000 |
| Anti-Kaninchen IgG | Meerrettichperoxidase | Dianova | WB: 1:15000 |
| Anti-Ratte IgG | Meerrettichperoxidase | Dianova | WB: 1:15000 |
| Anti-Maus IgG | Alexa-Fluor 594 | Life Technologies | IF: 1:300 |
| Anti-Kaninchen IgG | Alexa-Fluor 488 | Life Technologies | IF: 1:300 |
| Anti-Kaninchen IgG | Biotinyl. Meerrettichperox. | Vector Lab | IHC: 1:500 |

Abkürzungen: IF = Immunofluoreszenz, WB = *Western Blot*, IHC = Immunhistochemie.

Tabelle 22: Zusammensetzung der ECL-Lösungen.

| Puffer | Chemikalien |
|--------------|--------------------------------------------------|
| ECL Lösung A | 10 mM TRIS-HCl (pH=8,8) 0,0025% (w/v) Luminol |
| ECL Lösung B | 1,1% trans-p-Cumarsäure in DMSO |

Abkürzungen: ECL = Elektrochemolumineszenz, DMSO = Dimethylsulfoxid.

Tabelle 23: Zusammensetzung des *Amersham ECL Advance Western Blotting Detection Reagents*.

| Komponente | Volumen |
|-------------------------------|---------|
| ECL-Lösung A | 1 ml |
| ECL-Lösung B | 100 µl |
| Lumigen ECL Ultra Solution A | 100 µl |
| Lumigen ECL Ultra Solution B | 100 µl |
| H ₂ O ₂ | 3 µl |

2.2.2.7 Elution von gebundenen Antikörpern von Membranen

Für die Detektion mehrerer Antigene auf derselben Membran wurden die bereits gebundenen Antikörper mittels Glycin-Elutions-Puffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 24) entfernt. Die Inkubation mit dem Elutions-Puffer erfolgte für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden die Membranen kurz in TBS/T gewaschen, erneut für 30 Minuten in Blockierpuffer geblockt und vor der Wiederverwendung dreimal für 10 Minuten in TBS/T gewaschen.

Tabelle 24: Zusammensetzung des Glycin-Elutions-Puffers.

| Puffer | Chemikalien |
|------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| Glycin-Elutions-Puffer | 100 mM Glycin 50 mM KCl 20 mM Mg-Acetat mit HCl auf pH=2,2 einstellen |

2.2.3 Enzymatische Deglykosylierung von Proteinlysaten

Die Deglykosylierung der in einer Probe enthaltenen zellulären Proteine wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Zunächst wurde 50 µg des Proteinlysates mit 2,5 µl Denaturierungslösung versetzt. Anschließend wurde der Ansatz mit H₂O dd. auf 15 µl aufgefüllt und für fünf Minuten bei 56°C erhitzt. Die Tabelle 25 zeigt die für die Deglykosylierungen verwendeten Lösungen.

Tabelle 25: Übersicht über die zur Deglykosylierung verwendeten Puffer.

| Lösung | Chemikalien |
|------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| Denaturierungslösung | 6 % (w/v) SDS 400 mM DTT in 50 mM Natriumphosphat (pH=7,5) |
| 5x Endoglykosidase-H-Puffer | 250 mM Natriumacetat (pH=5,5) |
| 5x PNGase-F-Puffer | 250 mM Natriumacetat (pH=7,5) |
| 5x NP-40 | 4 % (w/v) NP-40 in H ₂ O dd. |

Abkürzungen: DTT = Dithiothreitol, NP-40 = Nonoxinol 40.

Da die verwendeten Enzyme verschiedene Puffer benötigen, variiert das Protokoll für die jeweilige Glykosidase:

Endoglykosidase H (Endo H): Zunächst wurden zu den Proben je 20 µl des fünffach konzentrierten Endo-H-Puffers und 4 µl Complete Protease Inhibitor Cocktail gegeben. Das Totalvolumen des Ansatzes wurde mit H₂O dd. auf 100 µl erhöht. Anschließend wurde der Ansatz in zwei Teile aufgeteilt (je 40 µl) und zu einem Ansatz 2 µl rekombinante Endoglykosidase H gegeben. Die Proben wurden für 3 h bei 37°C inkubiert, mit 10 µl SDS-Probenpuffer versetzt, für 5 Minuten bei 56°C erhitzt und auf ein SDS-Gel geladen.

N-Glykosidase F (PNGase F): Auch hier wurden zu den Proben je 20 µl des PNGase-F-Puffers und 4 µl Complete Protease Inhibitor Cocktail gegeben und das Totalvolumen mit H₂O dd. auf 100 µl erhöht. Es erfolgte die Aufteilung der Probe in zwei Ansätze à 40 µl. Zu einem Ansatz wurden dann anschließend 2 µl des Enzyms PNGase F gegeben. Zusätzlich wurden neben dem PNGase-F-Puffer den Ansätzen noch 20 µl fünffach konzentriertes NP-40 hinzugefügt. Die Proben wurden für 3 h bei 37°C inkubiert, mit 10 µl SDS-Probenpuffer versetzt, für 5 Minuten bei 56°C erhitzt und auf ein SDS-Gel geladen.

2.2.4 Dichtegradientenzentrifugation

Die Dichtegradientenzentrifugation ist ein physikalisches Trennverfahren von Zellbestandteilen anhand der Sedimentation in einem Dichtengradienten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein diskontinuierlicher Dichtegradient mit kolloidalen Siliziumdioxid-Partikeln (Percoll, GE Healthcare) eingesetzt. Die Dichtegradientenzentrifugation von murinen Hodenmaterial wurde wie folgt durchgeführt: Zunächst wurde das Organ freipräpariert und die *Tunica albuginea* entfernt. Anschließend wurde der Hoden mittels des Ultraturrax in 2ml HB-Puffer zerkleinert und die Zellen mit acht Stößen eines Potter-Homogenisators aufgeschlossen. Zur Sedimentierung der Zellkerne erfolgte die Zentrifugation für 10 Minuten bei 750 x g.

Tabelle 26: Zusammensetzung der zur Dichtegradientenzentrifugation eingesetzten Lösungen.

| Puffer | Chemikalien |
|--------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| HB-Puffer | 250 mM Sucrose 10 mM HEPES-NaOH (pH=7,4) 1 mM EDTA in 1x PBS |
| 90% Percolllösung | 36 ml Percoll 4 ml 10x PBS (pH=7,4) |

Der Überstand wurde zu einer finalen Konzentration von 30% (w/v) Percoll in einem Volumen von 8,6 ml eingestellt. Anschließend wurden der Probe 0,9 ml HB-Puffer zugefügt und vermischt. Der Zellsuspension wurden dann 0,5 ml 65 % Sucrose (w/v) in 10 mM HEPES-NaOH untergeschichtet. Die absteigende Percoll-Verdünnungsreihe wurde ausgehend von einer 90%-Percolllösung hergestellt. Im Einzelnen wurde die Verdünnungsreihe der Percolllösung wie folgt angesetzt:

45%: 10ml 90% Percolllösung + 10 ml 1x PBS
 30%: 5ml 90% Percolllösung + 10 ml 1x PBS
 22,5%: 5ml 45% Percolllösung + 5 ml 1x PBS
 15%: 5 ml 45% Percolllösung + 10 ml 1x PBS.

Für den Gradienten wurden in einem 15 ml Röhrchen je 1 ml der Percoll-Verdünnungsreihe vorsichtig aufgetragen, beginnend mit der 90 % Percolllösung. Anschließend wurde 1 ml der vorher präparierten Zellsuspension vorsichtig aufpipettiert. Nach diesem Schema wurden im Wechsel die Percollösungen absteigender Dichte und die Zellsuspension aufgetragen. Im Anschluss wurde das Röhrchen für 40 Minuten bei 40.500 x *g* zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden je 500 µl vorsichtig abpipettiert und in ein Mikroreaktionsgefäß überführt. Bei einem Restvolumen von 2 ml wurde je 1 ml abpipettiert und in 15 ml Röhrchen überführt, sodass sich 8 Fraktionen à 500 µl und 2 Fraktionen à 1 ml hergestellt wurden. Danach wurde die jeweils doppelte Menge 1x PBS zu den Probengefäßen gegeben und diese anschließend für 10 Minuten bei 600 x *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellpellets in 1 ml PBS / Complete resuspendiert und erneut für 10 Minuten bei 600 x *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und für 2 Minuten bei 16.200 x *g* zentrifugiert und die Pellets beider Proben vereinigt. Anschließend wurde nach dem Zelllysisprotokoll unter 2.2.2.1 verfahren. Sämtliche Schritte wurden auf Eis oder bei 4 °C durchgeführt.

2.2.5 Durchflusszytometrische Untersuchungen (*fluorescence-activated cell scanning*, FACS)

Bei einer durchflusszytometrischen Untersuchung fließen einzelne Zellen entlang eines Laserstrahls und emittieren nach der Anregung je nach Größe, Granularität oder Anfärbung der Zelle Streulicht, das es ermöglicht, Rückschlüsse auf die analysierte Zelle zu ziehen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Zellsuspensionen aus Hodengewebe gearbeitet, welche mit dem DNA-Farbstoff DRAQ5™ (eBioscience) gefärbt wurden. Zu den Eigenschaften von DRAQ5™ siehe 2.2.5.2.

2.2.5.1 Herstellung einer Zellsuspension aus Hodengewebe

Um die verschiedenen Zellpopulationen des Hodengewebes mittels Durchflusszytometer analysieren zu können, wurde zunächst eine Einzelzellsuspension des Hodens hergestellt. Nach der Isolierung des Organs wurde die Kapsel mit Hilfe eines Skalpells vorsichtig eröffnet. Für die nachfolgenden Schritte wurde das Organ in ein mit 1 ml FACS-Puffer befülltes Reaktionsgefäß überführt. Die in der Kapsel enthaltenen *Tubuli seminiferi* wurden zunächst mechanisch durch Pipettieren dissoziiert. Begonnen wurde das Dissoziieren mit einer tief abgeschnittenen Pipettenspitze (1 ml), später wurde eine unveränderte Pipettenspitze (1 ml) verwendet. Nachdem sich sämtliche größere Zellaggregate aufgelöst hatten, wurde die Suspension durch ein Zellsieb (Corning) mit 100 µm Porengröße filtriert. Das Filtrieren erfolgte in ein vorher mit FCS-beschichtetes 50 ml-Zentrifugenröhrchen. Das Zellsieb wurde mehrfach gespült, sodass sich ein Gesamtvolumen von 5 ml einstellte. Anschließend wurde die Suspension für 5 Minuten bei 400 x *g* und 4 °C sedimentiert und in 1 ml FACS-Puffer aufgenommen. Sämtliche Schritte wurden auf Eis durchgeführt.

Tabelle 27: Zusammensetzung des FACS-Puffers.

| Puffer | Chemikalien |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| FACS-Puffer | 1% FCS 1mM EDTA 25 mM HEPES, pH=7,0 in PBS mit NaOH auf pH=7,4 einstellen |

2.2.5.2 Färben und Analyse von FACS-Proben

Nachdem eine Einzelzellsuspension hergestellt wurde, erfolgte die Färbung dieser mit dem DNA-Farbstoff DRAQ5™. DRAQ5™ (1,5-bis{[2-(di-methylamino)ethyl]amino}-4, 8-dihydroxyanthracen-9, 10-dioe) ist ein zellpermeabler, fluoreszierender Farbstoff, der an doppelsträngige DNA bindet. Das Anregungsoptimum liegt bei $E_{x_{max}} = 646 \text{ nm}$, das Emissionsspektrum zwischen 665 nm bis <800 nm. Dementsprechend erfolgte die Detektion im PeCy7-Kanal des FACS-Gerätes. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Farbstoff 1:200 verdünnt eingesetzt: Dafür wurden 20 µl der Hodenzellsuspension mit 180 µl FACS-Puffer verdünnt und schließlich mit 10 µl 1:10 verdünnten DRAQ5™ versetzt. Die Inkubation erfolgt für 15 Minuten bei 22 °C bzw. 37 °C. Die anschließende durchflusszytometrische Untersuchung wurde mit dem FACSCanto (BD Biosciences) durchgeführt, die Auswertung erfolgte mit dem Programm Flow-Jo, Version 10.2 (FlowJo, LLC).

2.2.6 Isolierung von Spermien

Die Isolierung maturer Spermien wurde zwecks Quantifizierung, Bestimmung der Spermienmotilität und Proteinisolierung für *Western Blotting* eingesetzt. Dafür wurden der Nebenhoden und der Samenstrang vorsichtig von dem umliegenden Fettgewebe und Gefäßen isoliert. Dem Reifungsweg der Spermien folgend, wurde die *Cauda epididymidis* und der Samenstrang inzisiert und *in toto* in eine mit 3 ml *Swim-out*-Puffer befüllte Petrischale versetzt. Das Hinausschwimmen der Spermien erfolgte für 30 Minuten bei 37 °C im Zellinkubator. Für die Gewinnung der Proteine aus den isolierten Spermien wurde die Spermiesuspension für fünf Minuten bei 300 x g bei 4 °C sedimentiert und der Überstand anschließend vorsichtig abgenommen. Nach einer Wiederholung dieses Schrittes erfolgte die Pelletierung der Suspension bei 13.000 x g für 5 Minuten. Es erfolgte im Anschluss die Herstellung eines Zelllysates wie im *zweiten Abschnitt* unter 2.2.2.1. beschrieben.

Tabelle 28: Zusammensetzung des *Swim-Out*-Puffers.

| Puffer | Chemikalien |
|-------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Swim-Out</i>-Puffer | 135 mM NaCl 5 mM KCl 2 mM CaCl ₂ 1 mM MgCl ₂ 20 mM HEPES 5 mM Glucose mit NaOH auf pH=7,4 einstellen |

2.2.7 Mikroskopische Analyse der Spermienmorphologie

Für eine lichtmikroskopische Analyse der Spermienmorphologie wurden die Spermien aus den entsprechenden Nebenhodenschwänzen zunächst wie unter 2.2.6 beschrieben, gewonnen. Anschließend wurde die Spermiesuspension im Verhältnis 1:4 mit destilliertem Wasser verdünnt und die Petrischale vorsichtig geschwenkt. Je 10 µl der Suspension wurden auf einem Objektträger ausgestrichen und für 1 Stunde luftgetrocknet. Die Zellen wurden im Anschluss für 15 Minuten in reinem Methanol fixiert und erneut für eine Stunde luftgetrocknet. Die Analyse der Zellmorphologie erfolgte mittels Phasenkontrastmikroskopie. Hierfür wurde das Mikroskop DMI8 der Firma Leica verwendet. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mittels der vorgeschalteten Kamera Leica CFC7000 T.

2.2.8 Computer Assisted Sperm Analysis (CASA)

Die *Computer Assisted Sperm Analysis* (CASA) ist eine standardisierte Methode zur Qualitätsbeurteilung von Spermienzellen aus humanen Ejakulatproben. Sie gibt Aufschluss über die Beweglichkeit und Bewegungsmuster von Spermien. Durch diese Parameter lassen sich Rückschlüsse auf die Fertilität und die Qualität der Spermienzellen eines Mannes schließen. Die Klassifizierung der Spermien erfolgt nach Kriterien der World Health Organisation (WHO) anhand der gemessenen Motilität (siehe Tabelle 29). Die Durchführung der CASA-Messungen erfolgte in Zusammenarbeit mit der AG Wennemuth von der Universität Duisburg-Essen.

Tabelle 29: WHO-Referenzkriterien zur Spermienbeweglichkeit (modifiziert nach Cooper, 2009).

| Klasse | Bezeichnung | Geschwindigkeit in $\mu\text{m/s}$ |
|--------|-------------------------------------------|--------------------------------------------|
| A | Schnell lineare progressive Spermien | $\geq 25 \mu\text{m/s}$ |
| B | Langsam progressive Spermien | $< 20 \mu\text{m/s}, \geq 5 \mu\text{m/s}$ |
| C | Nicht progressive (ortsständige) Spermien | $< 5 \mu\text{m/s}$ |
| D | Immotile Spermien | \emptyset |

Zur Präparation wurden das Spermienpellet (s. 2.2.7) in 100 μl *Swim-Out*-Puffer aufgenommen und auf 37°C erwärmt. Anschließend wurden 20 μl dieser Suspension in die auf 37°C vorgeheizte CASA-Zählkammer pipettiert und pro Messung mindestens 200 Spermien aus verschiedenen Gesichtsfeldern bei 20-facher Vergrößerung gemessen. Mithilfe der Software MedeaLab wurden dabei einzelne Spermienzellen detektiert und deren Verlauf verfolgt und aufgezeichnet. Aufgrund ihrer Bewegungsmuster wurden die Spermien dann in die verschiedenen WHO-Klassen eingeteilt und die Motilitätsparameter berechnet. Zur Veranschaulichung der verschiedenen Parameter siehe Abbildung 5.

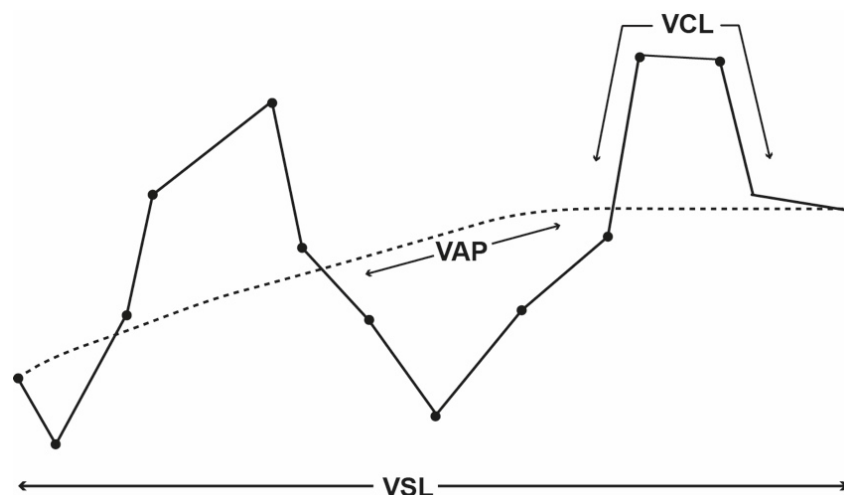


Abbildung 5: Überblick über die Geschwindigkeitsparameter der CASA-Messungen: Die Geraden mit Punkten zeigen einen beispielhaften Bewegungsverlauf eines einzelnen Spermiums.

VAP (Velocity average path): Dies bezeichnet die mittlere Pfadgeschwindigkeit des Spermiums. Aus dem Verlauf der Bewegung wird eine durchschnittliche Route berechnet und daraus eine mittlere Geschwindigkeit errechnet.

VCL (Velocity curvilinear): Dies ist die Geschwindigkeit der totalen Punkt-zu-Punkt-Strecke, die das Spermium pro Sekunde zurücklegt.

VSL (Velocity straight line): Die VSL bezeichnet die Geschwindigkeit einer gedachten, geraden Linie zwischen End- und Startpunkt der Bewegung geteilt durch eine Zeiteinheit (Sekunden). Sämtliche Geschwindigkeiten werden in $\mu\text{m/s}$ angegeben.

2.3 Immunhistochemische Methoden

Der Begriff „Immunhistochemie“ beschreibt biochemische Methoden, die es ermöglichen, mittels markierter Antikörper Proteine in Geweben oder einzelnen Zellen sichtbar zu machen.

2.3.1 Immunfluoreszenzfärbung einzelner Zellen

Um Proteine in einzelnen Zellen und deren subzellulären Kompartimenten mikroskopisch sichtbar zu machen, wurden die Zellen auf *Coverslips* (runde Deckgläschen) in *6-well-plates* ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion, daran anschließend wurden die Zellen bis zum folgenden Tag kultiviert, fixiert und angefärbt. Dafür wurden die Zellen drei Mal mit 1x PBS gewaschen und für 20 Minuten mit der PFA-Fixierlösung inkubiert. Dabei banden die freien Aminogruppen der Proteine an die Aldehydgruppen des PFAs. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS erfolgte eine fünfminütige Permeabilisierung der Zellmembranen mit der Permeabilisierungslösung I. Anschließend folgte eine zehnminütige Inkubation mit der Permeabilisierungslösung II. Nach einem erneuten Waschschrift mit der Permeabilisierungslösung I schloss sich die Inkubation der *Coverslips* mit dem Blockierpuffer für eine Stunde zur Absättigung unspezifischer Antikörperbindungen an.

Tabelle 30: Überblick über die zur Immunfluoreszenzfärbung verwendeten Lösungen.

| Lösung | Chemikalien |
|------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| PFA-Fixierlösung | 4 % Paraformaldehyd (w/v) bei 80°C in PBS lösen Mit NaOH auf pH=7,4 einstellen |
| Permeabilisierungslösung I | 0,2 % Saponin (w/v) in PBS |
| Permeabilisierungslösung II | 0,12 % Glycin (w/v) + 0,2 % Saponin (w/v) in PBS |
| Blockierpuffer | 10 % FCS + 0.2% Saponin in PBS |
| Einbettmedien | 17% (v/v) Mowiol 4-88 + 33% Glycerol + 20 mg/ml DABCO (SIGMA) + 1 mg/ml DAPI (SIGMA) in 1x PBS |

Anschließend wurden die *Coverslips* mit 50 µl des in Blockierpuffer verdünnten Primärantikörpers (Verdünnung siehe Tabelle 20) über Nacht bei 4°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag folgte ein fünfmaliges Waschen mit der Permeabilisierungslösung I. Danach wurden die Deckgläschen für eine Stunde auf 50 µl passend verdünnten Sekundärantikörper (ebenfalls in Blockierpuffer verdünnt) gelegt. Nach fünfmaligem Waschen mit dem Permeabilisierungspuffer I mit zwei zusätzlichen Waschschritten in H₂O dd. wurden die *Coverslips* schließlich auf Objektträgern mit den Einbettmedien fixiert. Den Einbettmedien wurde 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) zugefügt. DAPI interkaliert mit DNA-Molekülen und

ermöglicht so die Visualisierung des Zellkernes unter dem Fluoreszenzmikroskop. Sämtliche Inkubationen erfolgten auf Parafilm M in einer Feuchten Kammer. Die optische Auswertung erfolgte mithilfe des konfokalen Mikroskops *FluoView1000* von Olympus. Die anschließende Bearbeitung der Bilder erfolgte mit der Software FV10-ASW 4.2 von Olympus.

2.3.2 Histologische Methoden

Für eine Visualisierung der Aktivität der β -Galaktosidase wurde das Gewebe in 4 % PFA fixiert, für sämtliche sonstige Fragestellungen erfolgte die Fixation mittels Bouin'scher Lösung.

2.3.2.1 Perfusion von Mäusen mit Paraformaldehydpuffer

Um fixierte murine Gewebe für eine histologische Analyse zu gewinnen, wurden Mäuse mit 4% PFA transkardial perfundiert: Dafür wurden die Mäuse mit einer Mischung aus Ketamin 12 mg/ml und Xylazin 1,6 mg/ml in PBS (je 10 μ l pro Gramm Körpergewicht) durch i.p. Injektion narkotisiert. Es folgte die Eröffnung des Bauch- und Brustraums sowie das Einführen einer Kanüle (21 G) in den linken Ventrikel. Der rechte Vorhof wurde eröffnet und der Blutkreislauf mit Phosphatfixationspuffer mit einer Flußrate von 5 ml/min gespült.

Tabelle 31: Zusammensetzung des Phosphatfixationspuffers.

| Puffer | Chemikalien |
|--------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Phosphatfixationspuffer | 0,1 M KH_2PO_4 (Lösung 1) 0,1 M Na_2HPO_4 (Lösung 2) im Verhältnis 4:21 mischen mit NaOH auf pH=7,4 einstellen |

Sobald die Leber eine bräunlich-gelbe Farbe annahm, wurde der Organismus für ca. 10 Minuten mit 4 % PFA, welches zuvor in Phosphatfixationspuffer gelöst wurde, perfundiert. Anschließend wurde das zu untersuchende Gewebe entnommen und über Nacht in 4% PFA bei Raumtemperatur nachfixiert. Als Gefrierschutz für das spätere Schneiden mit dem Cryostaten wurde das Gewebe für mindestens 3 Tage in 30% Saccharose in Phosphatfixationspuffer bei 4°C gelagert.

2.3.2.2 Stückfixierung von Hoden mit Bouin'scher-Lösung

Nach dem Töten der Maus durch zervikale Dislokation und Eröffnung der Bauchhöhle wurde der Hoden aus dem umliegenden Fettgewebe isoliert. Anschließend wurde die *Tunica albuginea* mit einer Kanüle (24 G) in mehrfach perforiert, um das Eindringen des Fixativs zu

ermöglichen. Auch hier wurde das Gewebe über Nacht in der Fixationslösung belassen und anschließend als Gefrierschutz in 30% Saccharose in Phosphatfixationspuffer bei 4°C gelagert.

2.3.3 Herstellung von Gewebeschnitten

2.3.3.1 Anfertigung von Cryoschnitten

Das zu schneidende Gewebe wurde zunächst in das Einbettmedium Shandon Cryomatrix (Thermo Scientific) eingebettet und auf Trockeneis schockgefroren. Anschließend wurden mithilfe des Cryostaten CM3050 S von Leica 6-8 µm dicke Schnitte angefertigt. Die Kammertemperatur betrug -20°C, die Objekttemperatur -18°C. Als Objektträger wurden Menzelgläser Superfrost Ultra Plus® (Thermo Scientific) verwendet. Nach einer einstündigen Trockenphase wurden die Objektträger bis zur Färbung bei -20°C gelagert.

2.3.3.2 Anfertigen von Paraffinschnitten

Die Anfertigung der Paraffinschnitte erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Anatomischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. Nach der Fixierung des Organs mittels Bouin'scher Lösung wurde das Gewebe unter fließendem Leitungswasser vier Mal für je 5 Minuten gespült. Es folgte die Paraffineinbettung der Proben nach folgendem Schema:

2 x 5 Minuten in 50 % vergällten EtOH

2 x 7 Minuten in 70 % vergällten EtOH

2 x 10 Minuten in 90 % vergällten EtOH

2 x 10 Minuten in 96 % vergällten EtOH

2 x 10 Minuten in 100 % vergällten EtOH

2 x 15 Minuten in Benzoessäure-Methylester

ü. N. in Benzoessäure-Methylester.

Am darauffolgenden Tag wurde das Gewebe in auf 60°C erwärmtem Paraffin (Rotiplast, Firma Roth) für eine Stunde inkubiert. Nach einer zweimaligen Wiederholung dieses Schrittes wurden die Gewebestücke erneut mit erwärmtem Paraffin übergossen und anschließend in einen Wärmeschränk gelegt, sodass überschüssige Luft aus dem Gewebe verdrängt wurde und das Paraffin in das Gewebe hineindiffundieren konnte. Dies geschah für eine Stunde unter Anlegung eines Vakuums. Es erfolgte die Anfertigung von 5 µm dicken Gewebeschnitten mit Hilfe des Mikrotoms Leica SM2000R (Leica Microsystems).

Für die anschließende Entparaffinierung wurden die Organe zunächst zwei Mal für je 10 Minuten in der Roti-Histol-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert und in folgender absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert:

2 Minuten in 100 % EtOH

2 Minuten in 90 % EtOH

2 Minuten in 70 % EtOH

2 Minuten in 50 % EtOH.

2.3.4 Histologische Verfahren an Gewebeschnitten

2.3.4.1 Immunhistochemie mittels DAB

Die Detektion von Proteinen in Gewebeschnitten mittels 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Färbung beruht auf einem ähnlichen Prinzip wie die Detektion von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen (s. 2.2.2.6). Auch hier dient die Aktivität einer konjugierten Meerrettichperoxidase (HRP) dem Nachweis eines bestimmten Proteins, welches zuvor mit einem Primärantikörper markiert wurde. Allerdings ist die HRP in diesem Fall nicht direkt an den Sekundärantikörper gebunden, sondern an Biotin, welches hochaffin an Avidin bindet (s.u.). In Gewebeschnitten bildet das HRP-Substrat DAB einen rötlich-braunen Niederschlag und erlaubt so die Identifizierung des Expressionsmusters des gesuchten Proteins.

Im Einzelnen erfolgte die DAB-Färbung nach folgendem Protokoll in einer Feuchten Kammer auf Parafilm. Zunächst wurden die Objektträger zweimal mit PBS gewaschen, für 30 Minuten in 1,6 % H_2O_2 in TBS inkubiert und erneut zweimal mit PBS umspült. Anschließend wurden die Schnitte für eine Stunde mit dem Blockierlösung geblockt, um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers zu minimieren. Die darauffolgende Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C (1). Die eingesetzten Primär- und Sekundärantikörper wurden in der Verdünnungslösung verdünnt. Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte viermal für 10 Minuten mit der Waschlösung umspült und anschließend für eine Stunde mit biotinyliertem Sekundärantikörper inkubiert (2). Nach erneutem Waschen mit der Waschlösung (5 Mal für je 10 Minuten) wurde der Objektträger für eine Stunde in der 30 Minuten vorher angesetzten ABC-Lösung (Avidin-Biotin-Complex) (Vector Laboratories) inkubiert (3). Dieser Komplex besteht aus Biotin, an das eine Meerrettichperoxidase gekoppelt ist und Avidin. Das Avidinmolekül besitzt 4 Bindungsstellen für Biotin, kann also neben dem Biotin des ABC-Komplexes auch an den biotinyliertem Sekundärantikörper binden. Dadurch ergibt sich eine vielfache Steigerung der Sensitivität für die nachfolgende Reaktion mit dem HRP-Substrat DAB.

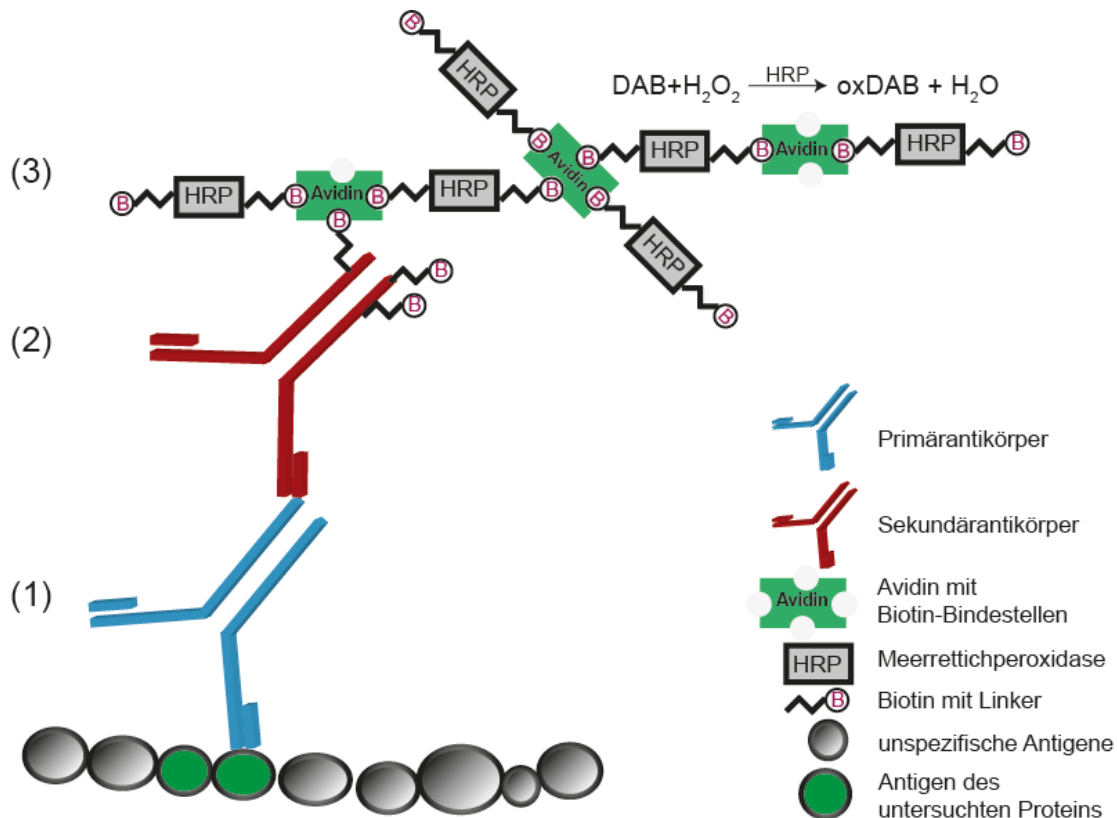


Abbildung 6: Schematischer Überblick über Antigendetektion mittels DAB. Das Zielantigen wird mittels des Primärantikörpers markiert (1). Der biotinylierte Sekundärantikörper bindet anschließend an den Primärantikörper (2). Nach Zugabe des AB-Komplexes (s. Text) erfolgt die Inkubation der Proben mit dem Chromogen DAB und Wasserstoffperoxid. Die Meerrettichperoxidase katalysiert die Oxidation von DAB, welches als brauner Niederschlag ausfällt (3).

Tabelle 32: Überblick über die verwendeten Puffer zur DAB-Färbung.

| Lösungen | Chemikalien |
|--------------------------|------------------------------------------------------------|
| TBS | 137 mM NaCl 25 mM TRIS-HCl, pH=7,4 2,7 mM KCl |
| Waschlösung | 0,25 % Triton X-100 in 1x PBS |
| Verdünnungslösung | 1,5 % NGS 0,2 % BSA 0,25 % Triton X-100 in 1x PBS |

| Lösungen | Chemikalien |
|-----------------------|----------------------------------------------------------|
| Blockierlösung | 4 % NGS 0,2 % BSA 0,25 % Triton X-100 in 1x PBS |

Abkürzungen: NGS = *Normal goat serum*, BSA = Bovines Serumalbumin.

Nach der einstündigen Inkubation mit der ABC-Lösung wurden die Objektträger erneut viermal 10 Minuten mit 1x PBS gewaschen. Zuletzt wurden die Schnitte mit der DAB-Färbelösung solange inkubiert, bis eine deutliche Braunfärbung mit dem bloßen Auge sichtbar war. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte mit 1x PBS. Die DAB-Färbelösung wurde aus dem *DAB Peroxidase (HRP) Substrate Kit* (Vector Laboratories) nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.3.4.2 Visualisierung der β -Galaktosidaseaktivität

Die Aktivität des Reporterenzym β -Galaktosidase auf PFA-fixierten Organschnitten wurde wie folgt detektiert: Zunächst wurden die Schnitte zweimal für fünf Minuten mit 1x PBS gewaschen. Am darauffolgenden Tag wurden die Objektträger für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit dem X-Gal-Permeabilisierungspuffer inkubiert und erneut einmalig mit PBS gewaschen. Die anschließende Inkubation mit dem X-Gal-Färbepuffer erfolgte je nach Fragestellung für 2-24 Stunden bei 37°C.

Tabelle 33: Überblick über die verwendeten X-Gal-Puffer.

| Puffer | Chemikalien |
|--------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| X-Gal-Färbelösung | 2 mM MgCl_2 5 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 5 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 0,02 % NP-40 0,01 % Na-Desoxycholat 1 mg/ml X-Gal, gelöst in 0,1 M Phosphatfixationspuffer (pH=7,4) |

| Puffer | Chemikalien |
|---------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| X-Gal-Permeabilisierungslösung | 2 mM MgCl ₂ 0,02 % NP-40 0,01 % Na-Desoxycholat gelöst in 0,1 M Phosphatfixationspuffer (pH=7,4) |

2.3.5 Gegenfärben von histologischen Schnitten

2.3.5.1 Hämalaun-Eosin-Färbung

Um eine histologische Analyse der Organe zu ermöglichen, wurden die Objektträger mittels Hämalaun-Eosin-Färbung (HE-Färbung) gefärbt. Hämalaun bindet an saure bzw. basophile Strukturen wie DNA oder Ribosomen und färbt diese intensiv blau. Eosin, ein synthetischer Farbstoff, bindet an basische Strukturen wie Zellplasmaproteine, Mitochondrien oder Kollagen und führt zu einer Rotfärbung. Die Hämalaunfärbung der Objektträger wurde mittels „Meyers Hämalaun“ (Thermo Scientific) wie folgt durchgeführt: Die Schnitte wurden für 20 Mal für circa eine Sekunde in die Hämalaunlösung gehalten und anschließend für zwei Minuten mit fließendem Leitungswasser gespült. Für die Eosinfärbung wurden die Objektträger für 10-30 Sekunden mit Eosinlösung (Eosin G, Roth) gegengefärbt und schließlich mit Mowiol und Deckglas eingebettet.

2.3.5.2 Kernechtrot-Färbung

Die Färbung von Organschnitten mit Kernechtrot–Aluminiumsulfatlösung (Roth) ermöglicht ebenfalls eine Darstellung des Zellkerns und wurde nach dem folgenden Schema durchgeführt: Die Schnitte wurden für 7 Minuten in der unverdünnten Kernechtrotlösung gefärbt und danach für drei Minuten mit fließendem Leitungswasser gespült. Nach dem vorsichtigen Abtrocknen des Objektträgers konnten die Schnitte mit Mowiol eingedeckelt werden.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Isolierung von mRNA aus Geweben

Die Isolierung der mRNA aus murinen Organen erfolgte mit Hilfe des *NucleoSpin® RNA II Kits* (Macherey-Nagel) und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.4.2 Bestimmung der Nukleinsäurenkonzentration

Nach Isolierung und Aufreinigung der Proben erfolgte die Messung der DNA/RNA-Konzentration mittels Spektrophotometrie. Die Berechnung der jeweiligen Nukleinsäurenkonzentration erfolgte anhand des Lambert-Beer'schen Gesetzes. Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei 260 nm, es wurde daher die OD₂₆₀ mit dem *Synergy HT* nach Angaben des Herstellers gemessen.

2.4.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA-Fragmente wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Sie beruht auf dem Wanderungsverhalten der negativ geladenen DNA-Moleküle zur Anode bei angelegter elektrischer Spannung. Je nach erwarteter Größe der DNA-Fragmente wurden Gele mit einem Anteil von 1-2 % (w/v) Agarose (SeqKem® LE Agarose) verwendet. Dazu wurde die Agarose in dem 1x TAE-Puffer in der Mikrowelle erhitzt, bis sie sich vollständig gelöst hatte. Falls das aufgetragene DNA-Fragment nach der Gelelektrophorese noch weiterverwendet wurde, wurde SyBR®-Safe DNA Gel Stain (Thermo) 1:30000 zu dem 1x TAE-Puffer hinzugefügt. Falls dies nicht der Fall war, wurde zur Visualisierung der DNA-Fragmente unter UV-Licht Ethidiumbromid (Roth) 1:30000 eingesetzt. Die Proben wurden vor dem Auftragen im Verhältnis 5:1 mit dem DNA-Ladepuffer (Fermentas) versetzt und bei einer elektrischen Spannung von 100-120 V in der Agarosegellaufkammer Sub-cell-GT (BioRad) aufgetrennt. Als Orientierungshilfe für die Molekulargewichte der aufgetrennten Fragmente wurde auf die *Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder* (Fermentas) oder *Gene Ruler™ 100bp Plus DNA Ladder* (Fermentas) zurückgegriffen. Die anschließende Aufreinigung der DNA-Fragmente erfolgte mit dem *High Pure PCR Product Purification Kit* von Roche nach Herstellerangaben.

Tabelle 34: Zusammensetzung des TAE-Puffers.

| Puffer | Chemikalien |
|----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1x TAE-Puffer | 40 mM TRIS 0,11 % (v/v) Essigsäure 1 mM EDTA mit NaOH auf pH=8,0 einstellen |

2.4.4 PCR

Mittels PCR (*Polymerase chain reaction*) können beliebige DNA-Abschnitte mit Hilfe von Oligonukleotiden (Primer) vervielfältigt werden und erlauben so die Herstellung größerer Mengen der benötigten DNA-Abschnitte. Durchgeführt wurden die PCR in dem PCR-*cycler* Geneamp PCR System 2400 von Perkin Elmer. Als DNA-Polymerase dienten bei den Klonierungs- und Mutations-PCRs die *Pfu*-Polymerase (Thermo Scientific), bei der RT-PCR wurde auf die *Taq*-Polymerase (Thermo Scientific) zurückgegriffen. Sämtliche verwendete Puffer und dUTPs stammten von der Firma Thermo Scientific.

2.4.4.1 Klonierungs-PCR

Im Einzelnen wurde der PCR-Ansatz wie folgt pipettiert:

Tabelle 35: Zusammensetzung des Klonierungs-PCR-Ansatzes.

| Komponente | Volumen |
|---------------------|----------|
| Fw-Primer (10 µM) | 1 µl |
| Rv-Primer (10 µM) | 1 µl |
| 10x Pfu Puffer | 5 µl |
| dNTP 2mM | 5 µl |
| DMSO | 2,5 µl |
| <i>template</i> DNA | 1 µl |
| Pfu-Polymerase | 0,5 µl |
| H ₂ O | ad 50 µl |

Tabelle 36 zeigt das Temperaturprofil für den Klonierungs-PCR-Ansatz. Die Sequenzen verwendeten *Primer* finden sich unter im Anhang unter Tabelle 44.

Tabelle 36: Temperaturprofil des Klonierungs-PCR-Ansatzes.

| Temperatur | Zeit | Zyklen | Zweck |
|------------|----------------|--------|------------------|
| 95°C | 5 min | - | Denaturierung |
| 95°C | 45 sec | 35 | <i>Annealing</i> |
| 55°C | 30 sec | | |
| 72°C | 3 min | | |
| 72°C | 10 min | - | Elongation |
| 10 °C | <i>ad inf.</i> | | Ende |

Nach Beendigung der PCR-Zyklen wurden die Proben wie oben beschrieben mit dem entsprechenden Volumina DNA-Ladepuffer versehen und auf ein Agarosegel zwecks Gelelektrophorese aufgetragen.

2.4.4.2 Mutations-PCR

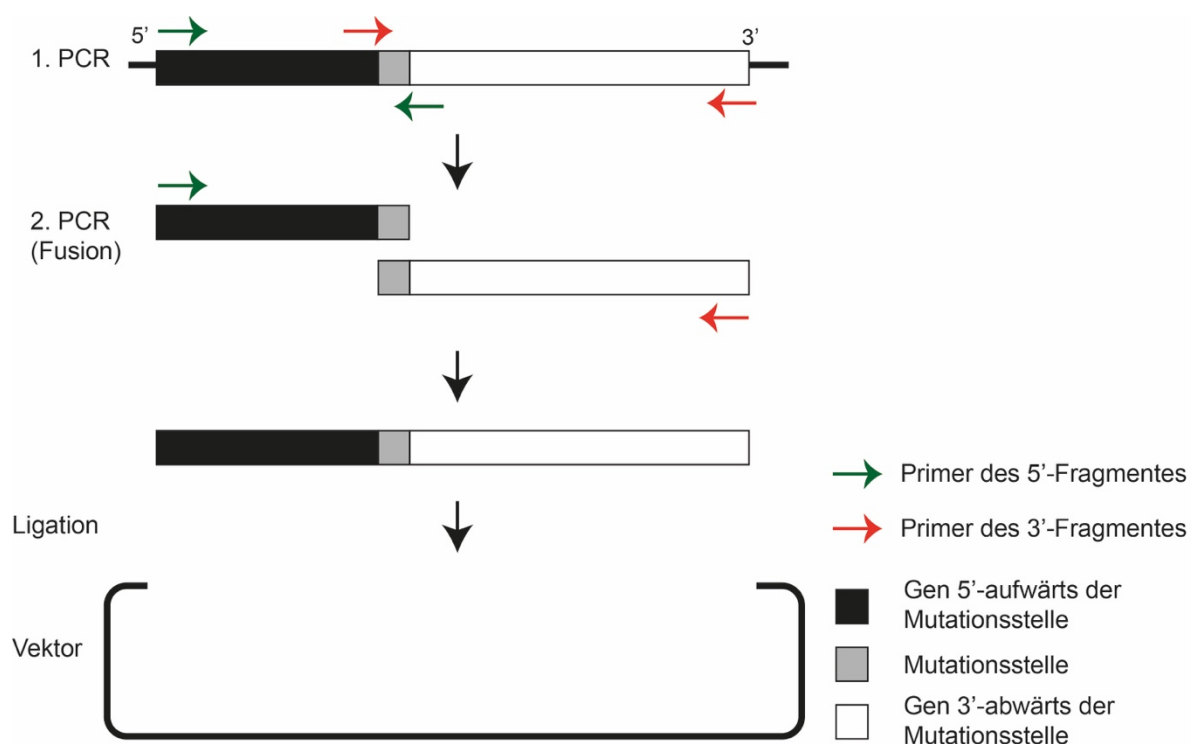


Abbildung 7: Schematische Darstellung der *site-directed mutagenesis* (modifiziert nach Walquist, 2018): Die Balken symbolisieren den Bereich des Gens, der um die geplante Mutationsstelle liegen. Für eine weitere Erläuterung siehe den untenstehenden Text.

Um die Funktion einzelner Aminosäuren innerhalb eines Proteins untersuchen zu können, können diese mittels *site-directed mutagenesis* durch eine induzierte Punktmutation ausgetauscht werden. Abbildung 7 zeigt schematisch das Vorgehen zur Generierung von Mutationskonstrukten. Der graue Kasten in der Mitte symbolisiert die auszutauschende Aminosäure, der schwarze und weiße Kasten jeweils verschiedene Genbereiche um die Mutationsstelle herum. Zunächst wurden zwei Primer (*forward* und *reverse*) synthetisiert, die neben der gewünschten Mutation auch mindestens 15 Basenpaare (bp) Überlappung mit der ursprünglichen Sequenz beinhalten (in der Abbildung als grüne und rote Pfeile um die Mutationsstelle dargestellt). Anschließend wurden zwei PCR-Ansätze generiert, wobei jeder Ansatz einen Primer mit der gewünschten Mutationsstelle enthielt und einen Primer, der an das andere Ende der DNA-Sequenz band. Nach dem ersten PCR-Durchlauf erhielt man so zwei DNA-Teilstücke der gesamten Sequenz mit den gewünschten Mutationen. Die entstehenden DNA-Produkte wurden in der anschließenden zweiten PCR-Durchlauf als *template* verwendet (sog. Fusions-PCR). Zusätzlich befanden sich in dem Fusions-PCR-Ansatz noch Primer, die an das 3'- und 5'-Ende der gesamten Sequenz binden. Im Anschluss folgte der Restriktionsverdau und die Ligation in den Vektor wie unter 2.4.6 dargestellt. Das hierbei entstehende Produkt wurde anschließend mittels Sequenzierung nach Sanger auf die gewünschte Mutation überprüft. Die Sequenzen der zur Klonierung verwendeten Primer finden sich im Anhang unter Tabelle 44.

Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes ist unter Tabelle 37 angegeben.

Tabelle 37: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes für die Mutagenese.

| Komponente | Volumen |
|--------------------|----------|
| Fw-Primer (10 µM) | 1 µl |
| Rv-Primer (10 µM) | 1 µl |
| 10x HF Puffer | 5 µl |
| dNTP 2mM | 5 µl |
| DMSO | 2,5 µl |
| <i>template</i> | 1 µl |
| Phusion-Polymerase | 0,5 µl |
| H ₂ O | ad 50 µl |

Folgendes Temperaturprofil wurde die Mutations-PCR gewählt:

Tabelle 38: Temperaturprofil des PCR-Ansatzes für die Mutagenese.

| Temperatur | Zeit | Zyklen | Zweck |
|------------|----------------|--------|------------------|
| 98 °C | 30 sec | - | Denaturierung |
| 98 °C | 10 sec | 35 | <i>Annealing</i> |
| 55 °C | 30 sec | | |
| 72 °C | 90 sec | | |
| 72 °C | 10 min | - | Elongation |
| 10 °C | <i>ad inf.</i> | | Ende |

2.4.4.3 RT-PCR

Mittels RT-PCR (*Reverse transcriptase polymerase chain reaction*) kann die Expression verschiedener Gene auf mRNA-Ebene analysiert werden. Der Begriff Reverse Transkription bezeichnet die Enzym-vermittelte Umschreibung von (m)RNA zu DNA. Ausgehend von isolierter (m)RNA (siehe 2.4.1) erfolgte die Reverse Transkription mit Hilfe des *RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit* (Fermentas). Dazu wurde 0,5-1 µg RNA mit 1 µl von den in dem Kit beigefügten *Random Hexamer primer* versetzt und das Volumen mit H₂O dd. auf 11 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde für fünf Minuten bei 65°C inkubiert, kurz zentrifugiert und anschließend auf Eis gestellt. Es folgte die Zugabe von je 1 µl *RiboLock™ Ribonuklease Inhibitor* und *RevertAid* (dies ist die rekombinante Form der Reversen Transkriptase). Weiter wurden 4 µl Reaktionspuffer und 2 µl 10 mM dNTPs zu dem Ansatz gegeben. Anschließend wurde der Ansatz mit folgendem Temperaturprofil inkubiert:

Tabelle 39: Temperaturprofil des RT-PCR-Ansatzes.

| Temperatur | Zeit |
|------------|--------|
| 25 °C | 5 min |
| 45 °C | 60 min |
| 70 °C | 5 min |
| 10 °C | 1 h |

Tabelle 40 zeigt die Sequenzen der für die RT-PCR eingesetzten Primer. Nach Ablauf der PCR wurden die Proben wie oben beschrieben mit dem entsprechenden Volumina DNA-Ladepuffer versehen und mittels Agarosegelelektrophorese analysiert.

Tabelle 40: Sequenzen der zur RT-PCR eingesetzten Primer.

| RT-PCR-Primer | Sequenz (5' nach 3') |
|------------------------|--------------------------|
| mSPPL2c-2c-ORF-774-Fw | GGATTTCACACCAGCCATGAC |
| mSPPL2c-3'-Iso-A-RT-Rv | AGCATCCCCGTGCAGTGTCTG |
| mSPPL2c-3'-Iso-B-RT-Rv | GTGGGAAGGAAGAGGCATCCTC |
| mSPPL2c-2c-ORF-1452-Fw | CTGTACAGTGGCCTATGCCGTG |
| β -Aktin-RT-Fw | GTTACAACCTGGGACGACATGG |
| β -Aktin-RT-Rv | GATGGCTACGTACATGGCTG |
| FSH-R-RT-Fw | CGCCCATTGAACTGAGATTTGTGC |
| FSH-R-RT-Rv | CGCTTAGATTTCAGTTCATCTAGC |
| LH-R-RT-Fw | CTGTCTGAAATACTGATCCAG |
| LH-R-RT-Rv | TTTAACTCCAGCGAGATTAGC |

2.4.5 Sequenzierungen

Die Sequenzierungen wurden von der Firma GATC in Konstanz nach dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger durchgeführt.

2.4.6 Klonierung

2.4.6.1 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau ist eine biochemische Methode zum enzymatischen Prozessieren von DNA-Molekülen für eine anschließende Insertion dieser Moleküle in einen Vektor. Die Prozessierung der DNA wird durch Endonukleasen durchgeführt, welche spezifische Nukleotidsequenzen von 4-8 bp erkennen und anschließend die Phosphodiesterbindung der DNA dort spalten. So entstehen *sticky ends* oder *blunt ends*. Parallel dazu wird der Vektor ebenfalls einer Spaltung mit Restriktionsendonukleasen unterzogen, sodass bei der anschließenden Ligation die *sticky ends* von Insert und Vektor sich überlappen und das Insert in den Vektor eingefügt werden kann. Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme und Puffer stammten von der Firma Thermo Scientific. Tabelle 41 zeigt beispielhaft die Zusammensetzung eines Restriktionsansatzes. Dieser erfolgte stets nach Herstellerangaben in einem Gesamtvolumen von 50 μ l bei 37 °C.

Tabelle 41: Pipettierschema des Restriktionsverdauansatzes.

| Komponente | Volumen |
|----------------------|----------|
| Enzym I | 1 µl |
| Enzym II | 1 µl |
| 10x Puffer | 3 µl |
| pcDNA 3.1/Hygro+ | 1 µl |
| Konstrukt | 1 µl |
| H ₂ O dd. | ad 50 µl |

2.4.6.2 Ligation

Die Ligation der *Insert*-DNA in den entsprechend restriktionsverdauten Vektor erfolgte bei Raumtemperatur für 90 Minuten. Anschließend erfolgte die Inaktivierung der Ligase für zehn Minuten bei 65 °C. Tabelle 42 zeigt die Zusammensetzung des Ligationsansatzes.

Tabelle 42: Pipettierschema des Ligationsansatzes.

| Komponente | Volumen |
|----------------------------|---------|
| Vektor (passend gespalten) | 6 µl |
| <i>Insert</i> | 2 µl |
| T4 DNA Ligase | 1 µl |
| T4 DNA Ligase Puffer | 1 µl |

2.4.6.3 Herstellung von elektrokompenten *E.coli-XL1-blue*

Tabelle 43: Zusammensetzung des LB-Mediums.

| Puffer | Chemikalien |
|-----------|-----------------------------------------------------------|
| LB-Medium | 1% (w/v) Trypton 0,17 M NaCl 0,5% (w/v) Hefeextrakt |

Für die Produktion von elektrokompenten *E.coli-XL1-blue* wurde eine sterilisierte Impföse in eine Bakterien-Vorrats-Lösung eingeführt und anschließend auf einer mit Tetrazyklin (20 µg/ml)-beschichteten LB-Platte fraktioniert ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde ein Klon ausgewählt und in 50 ml tetrazyklinhaltige LB-Mediums angeimpft und dieses über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Von dieser Vorkultur wurden jeweils 20 ml in einen Liter vorgewärmtes LB-Medium mit Tetrazyklin gegeben. Diese Bakterienkultur wurde so lange bei 37 °C unter Schütteln inkubiert, bis sie eine OD₆₀₀ von ca. 0,5-0,6 erreicht hatte. Anschließend wurde die Bakteriensuspension für 15 Minuten bei 2400 x g und 4 °C zentrifugiert. Je zwei Pellets wurden in 20 ml eiskaltem H₂O dd. resuspendiert. Danach wurden die Reaktionsgefäße auf 250 ml H₂O ml aufgefüllt, erneut bei 4 °C für 15 Minuten bei 2400 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Schritt wurde wiederholt und die Pellets im Anschluss in je 10 ml eiskalter, 10 % (v/v) Glycerin-Lösung resuspendiert. Anschließend wurden die Bakteriensuspension mit 40 ml Glycerin-Lösung suspendiert, erneut bei 2400 x g für zehn Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurden die Bakterienlösungen erneut bei 0 °C und 2400 x g für 20 Minuten zentrifugiert und anschließend in 2 ml 10% Glycerin-Lösung resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde auf Trockeneis in Aliquots à 50 µl schockgefroren und abschließend bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.4.6.4 Transformation elektrokompenter Bakterien mittels Elektroporation

Die Transformation, die nicht-virale Übertragung von DNA in entsprechend kompetente Organismen, wurden mittels Elektroporation in kompetente *E.coli-XL1-blue* durchgeführt: Je 50 µl der Bakteriensuspension wurde auf Eis aufgetaut und mit 1 µl des Ligationsansatzes (s.2.4.6.2) versetzt und anschließend in eine Elektroporationsküvette (PeqLab) überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 2,5 kV, 25 µF und 400 Ω im Gene Pulser (BioRad). Nach der Elektroporation wurde die Suspension in 1 ml, 37 °C warmes *Lysogeny broth* (LB)-Medium überführt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension für 5 Minuten bei 2200 x g sedimentiert, das Pellet in 200 µl LB-Medium resuspendiert und auf einer antibiotikahaltigen LB-Agar-Platte ausplattiert. Da der in dieser Arbeit verwendete Vektor pcDNA3.1/Hygro⁺ eine Ampicillin-Resistenz aufweist, wurde dieses Antibiotikum dem LB-Agar-Medium in einer Konzentration von 50 µg/ml zugegeben. Nach dem Ausplattieren wurden die LB-Agar-Platten über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.4.6.5 Vervielfältigung und Isolierung von Plasmiden

Von den über Nacht mit einzelnen Bakterienkolonien bewachsene LB-Agar-Platten wurden die Bakterienkolonien mit Hilfe eines vorher sterilisierten Zahnstochers aufgenommen und zum Animpfen einer 3 ml (sogenannte *Miniprep*) oder 250 ml (sogenannte *Midiprep*) antibiotikahaltigen (Ampicillin 50 µg/ml) LB-Kultur verwendet. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C unter Schütteln. Am darauffolgenden Tag wurde die Isolierung der Plasmid-DNA je nach verwendetem LB-Volumen mit dem *Gene JET Plasmid Miniprep Kit* (Thermo

Scientific) oder dem *Pure Yield Plasmid Midiprep System* (Promega) nach Herstellerangaben durchgeführt.

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde neben einer eingehenden biochemischen Charakterisierung des Proteins mSPPL2c *in cellulo*, die Expression und die Funktionen dieses Proteins *in vivo* untersucht. Ebenfalls wurde eine Phänotypisierung der SPPL2c-defizienten Mäuse durchgeführt und die Expression von SPPL2c mit den anderen Mitgliedern der SPP/SPPL-Familie verglichen.

3.1 Biochemische Charakterisierung des mSPPL2c-Proteins

3.1.1 Validierung der Antikörper

Grundlegend für die hier beschriebenen Ergebnisse ist die Spezifität der SPPL2c-Antikörper, die an verschiedene Epitope der murinen Form von SPPL2c binden. Die verwendeten mSPPL2c-Konstrukte kodierten für das mSPPL2c-Protein und für einen C-terminalen myc-tag. So konnte der Nachweis des Proteins über die SPPL2c-spezifischen Antikörper und über den myc-Antikörper erfolgen. Abbildung 8 zeigt schematisch die Epitope, gegen die die SPPL2c-spezifischen Antikörper gerichtet sind. Die mSPPL2c-detektierenden, polyklonalen Antikörper wurden mit synthetischen Peptiden in Kaninchen erzeugt, die Seren der immunisierten Tiere zudem affinitätsgereinigt.

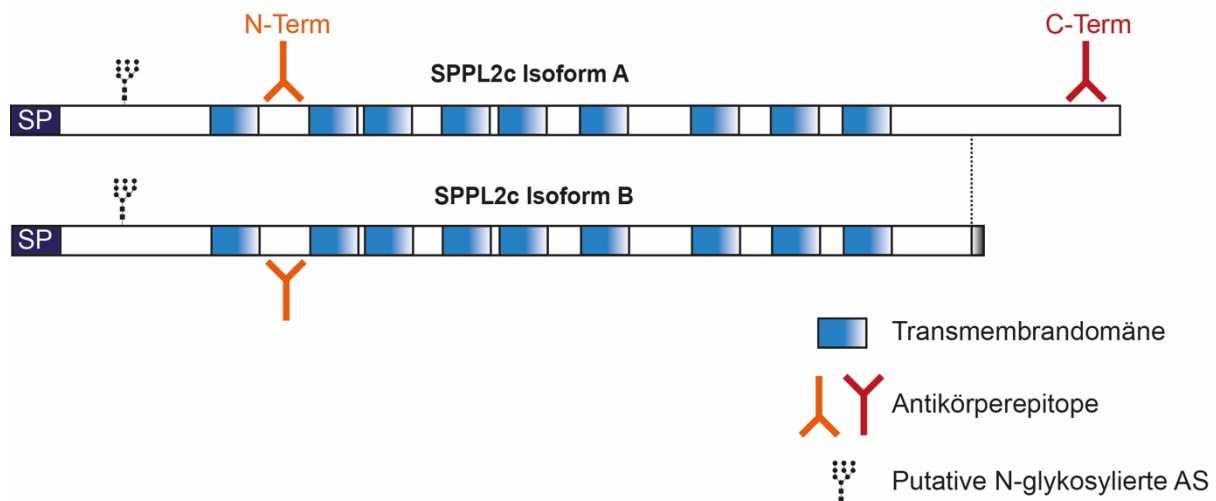


Abbildung 8: Epitope der mSPPL2c-detektierenden Antikörper. Gezeigt ist eine schematische Darstellung der Topologie der beiden murinen SPPL2c-Isoformen. Die Epitope (N-Term/C-Term), die für die Generierung der Antikörper verwendet wurden, sind eingezeichnet. Abkürzungen: SP = Signal Peptid, AS = Aminosäure (nach Niemeyer, 2019).

Um die Funktionalität der oben beschriebenen Antikörper zu validieren, wurden HEK293T-Zellen transient mit Konstrukten transfiziert, die für die Isoform A oder Isoform B des mSPPL2c-Proteins kodierten und anschließend per *Western Blotting* mit den Antikörpern untersucht (Abbildung 9). Dabei ließen sich verschiedene Signale auf Höhe der 100 kDa-Markerbande und mehrere um die 55 kDa-Markerbande detektieren. Bei den Zellen, die das

Konstrukt der mSPPL2c Isoform A überexprimierten, zeigte sich deutlich eine Bande leicht oberhalb der 70-kDa-Markerbande (Abbildung 9 A). Bei den nur dem Vektor transfizierten Zellen zeigte sich kein Signal auf dieser Höhe. Auch bei der Detektion des gebundenen myc-Antikörpers ließen sich Proteine mit einem vergleichbaren apparenten Molekulargewicht detektieren. Das errechnete Molekulargewicht der Isoform A von mSPPL2c beträgt 76,3 kDa. Es war daher anzunehmen, dass es sich bei dem nachgewiesenen Protein um die Isoform A von mSPPL2c handelte.

In den Zellen, die die Isoform B von mSPPL2c exprimierten, zeigte sich in den *Western Blots* mehrere Signale um die 55-kDa-Markerbande. Mithilfe des myc-Antikörpers ließen sich ebenfalls Proteine mit einem vergleichbarem apparenten Molekulargewicht von etwa 55 kDa nachweisen. Dieser Wert liegt circa 10 kDa unterhalb des erwarteten Molekulargewichts für die Isoform B von mSPPL2c. Es ist aber erkennbar, dass die Antikörper auf *Western Blots* spezifisch die Epitope des Proteins binden und für weitere Untersuchungen geeignet sind.

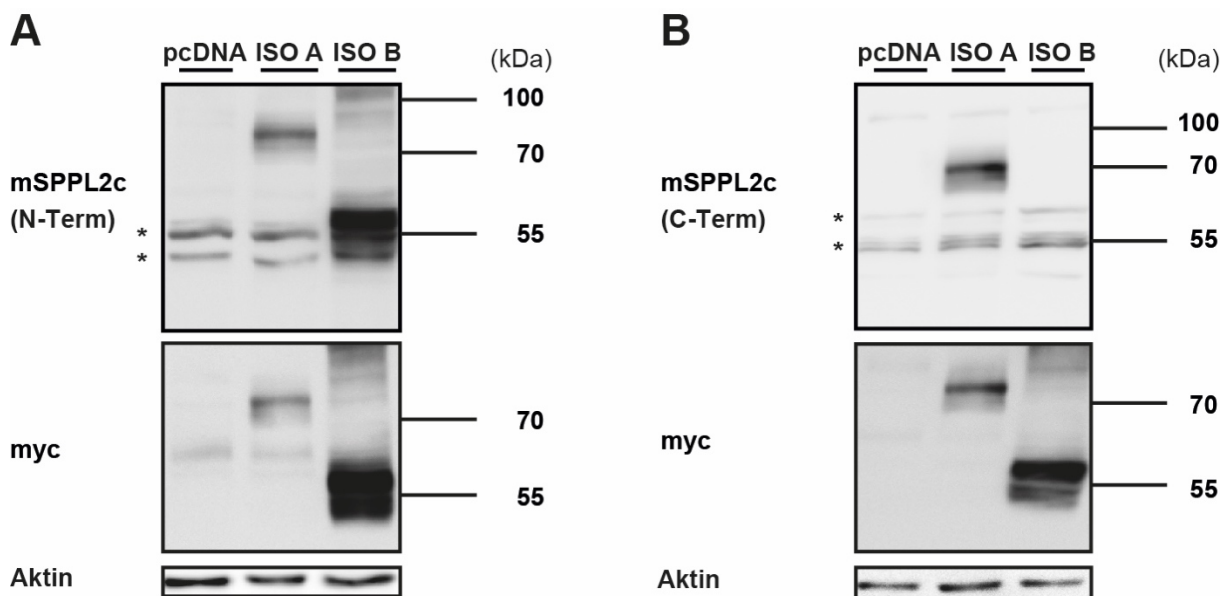


Abbildung 9: Überexpression der mSPPL2c-Isoformen. HEK293T-Zellen wurden transient mit dem Vektor pcDNA 3.1 oder Konstrukten, die für die beiden mSPPL2c-Isoformen kodieren, transfiziert. Im Anschluss wurden die Zellen lysiert und die Gesamtllysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt und per *Western Blotting* auf eine Nitrosecellulosemembran transferiert. Es folgte die Inkubation der Membranen mit dem N-terminalen Antikörper (A) oder dem C-terminalen Antikörper (B). Nach der Detektion wurden die gebundenen Antikörper mittels des Glycin-Elutions-Puffers entfernt. Anschließend wurden die Membranen mit dem myc-Antikörper reinkubiert und das Bindungssignal detektiert. Aktin wurde detektiert, um eine gleichmäßige Beladung der Proben anzuzeigen. Links der *Blots* stehen die jeweils verwendeten Antikörper. Abkürzungen: ISO A = mSPPL2c Isoform A, ISO B = mSPPL2c Isoform B, Sterne = unspezifische Antikörperbindungen.

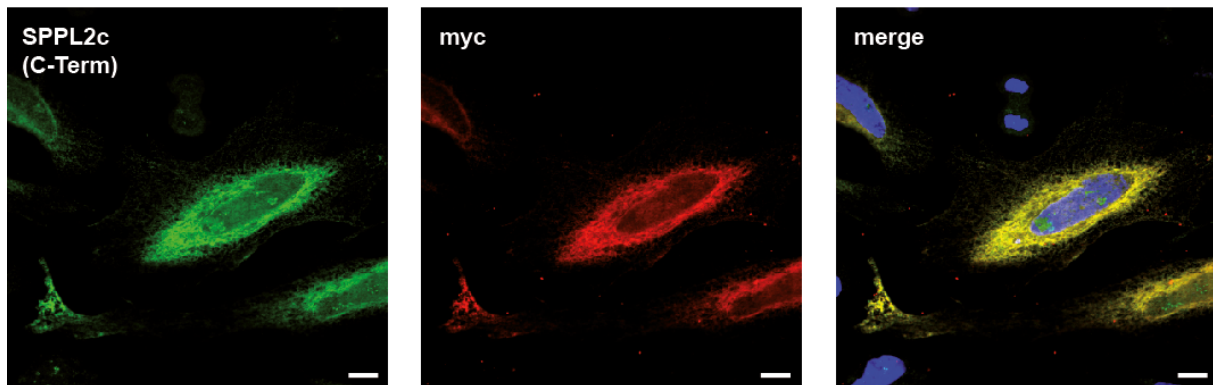
Die in Abbildung 8 dargestellte Eigenschaft des C-terminalen Antikörpers nur spezifisch die Isoform A, nicht jedoch die Isoform B von SPPL2c zu detektieren, wird in Abbildung 9 B deutlich: Der Antikörper rief kein spezifisches Signal in HEK293T-Zellen, die die Isoform B von SPPL2c exprimieren, hervor. Weiter ist in der Abbildung 9 zu erkennen, dass der N-

terminale Antikörper (im Folgenden als N-Term abgekürzt) *beide* Isoformen des SPPL2c-Proteins detektierte. Die Abbildung 9 zeigt zudem das Bindungsverhalten des myc-Antikörpers. Der myc-Antikörper band relativ spezifisch an das myc-Epitop, da die Bande, die dieser Antikörper hervorrief und die Bande, die von den gebundenen SPPL2c-Antikörpern resultiert, eine etwa identische Höhe aufwiesen. Zusätzlich erzeugte der myc-Antikörper schwache Signale zwischen der 55- und der 70-kDa-Markerbande, die allerdings auch in den nur dem Vektor transfizierten Zellen auftraten und somit wahrscheinlich unspezifischen Bindungen entsprachen.

Um mit Hilfe dieser Antikörper Hinweise auf die subzelluläre Lokalisation des mSPPL2c-Proteins zu erhalten, wurden HeLa-Zellen mit Expressionskonstrukten der beiden mSPPL2c-Isoformen transfiziert und mit den jeweiligen Antikörpern sowie den speziesspezifischen, fluoreszenten Sekundärantikörpern inkubiert. Abbildung 10 zeigt konfokalmikroskopische Aufnahmen von einzelnen Zellen. In der Abbildung dargestellt sind zudem Zellen, die kein oder nur kaum erkennbares Signal zeigten und daher am ehesten untransfizierten Zellen entsprechen, was für die Spezifität der Antikörper sprach. Das Signal, dass mittels der gebundenen SPPL2c-Antikörper erzeugt wurde, zeigte eine ER-ähnliche Netzstruktur der intrazellulären Verteilung des Proteins an. Erkennbar an der Farbänderung der übereinander gelegten Bilder zeigte sich zudem eine Kolo-kalisation der Signale des mSPPL2c-spezifischen Antikörper und des myc-Antikörpers. Beide Antikörper banden somit an Epitope in dem gleichen zellulären Kompartiment.

Zusammengenommen bestätigen die Abbildungen 9 und 10, dass sich beide mSPPL2c-Isoformen mit den hergestellten Konstrukten überexprimieren lassen und sowohl der myc-Antikörper als auch die kommerziell produzierten mSPPL2c-Antikörper spezifisch die Zielproteine in fixierten HeLa-Zellen oder im *Western Blot* detektieren.

mSPPL2c Isoform A



mSPPL2c Isoform B

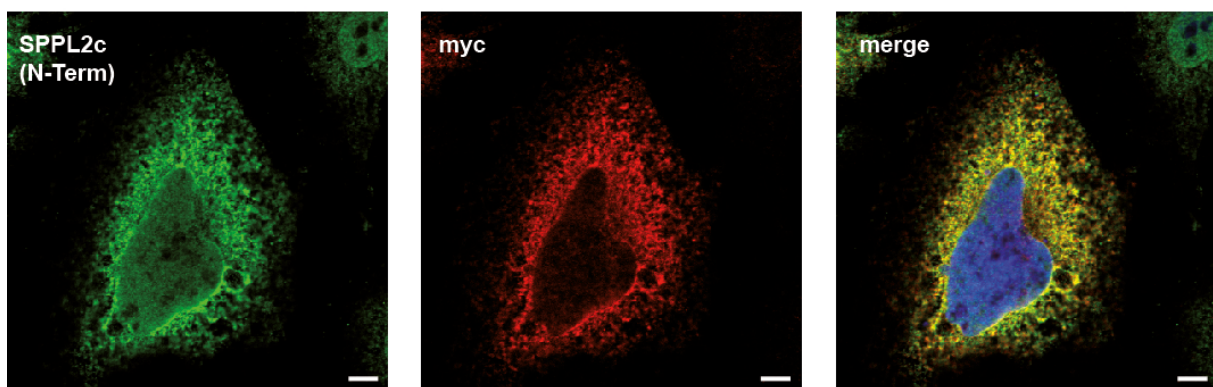


Abbildung 10: Indirekte Immunofluoreszenz von mSPPL2c überexprimierenden Zellen. HeLa-Zellen wurden transient mit Expressionskonstrukten für die beiden mSPPL2c-Isoformen transfiziert, fixiert und für eine Stunde mit den vermerkten Primärantikörpern inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit speziesspezifischen fluoreszierenden Sekundärantikörpern und die Aufnahme der Bilder mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops. Die Darstellung des Zellkerns erfolgt mit DAPI (blau). Größenmaßstab = 10 μ m, merge = übereinander gelegte Bilder.

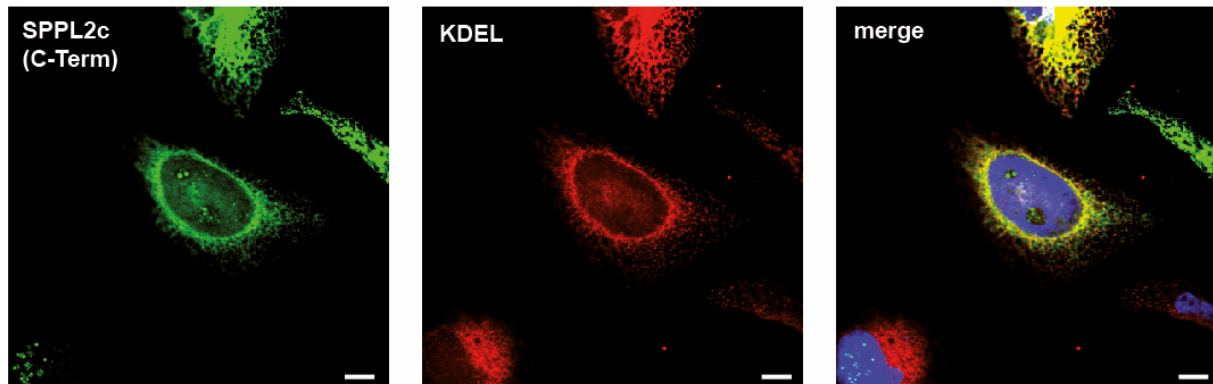
3.1.2 Untersuchungen zur zellulären Lokalisation

Um die subzelluläre Lokalisation des murinen SPPL2c-Proteins zu untersuchen, wurden die beiden mSPPL2c-Isoformen in HeLa-Zellen transient überexprimiert und mittels indirekter Immunofluoreszenz detektiert. Zusätzlich wurden die Zellen mit Antikörpern gegen verschiedene Markerproteine/Peptide von subzellulären Kompartimenten inkubiert und nach der Detektion hinsichtlich ihrer Lokalisation verglichen.

Die in dieser Arbeit auf eine Lokalisation von SPPL2c untersuchten Kompartimente waren das Endoplasmatische Retikulum, das *ER-Golgi-intermediate-compartment* (ERGIC) und der Golgi-Apparat. Zur Visualisierung des ER wurde das ER-Retentionsmotiv KDEL als Marker für ER-ständige Proteine detektiert. Als Markerprotein für das ERGIC diente das *ER-Golgi intermediate compartment 53 kDa protein* (ERGIC53), ein Mannose-bindendes Lektin, welches sich besonders ausgeprägt in diesem Zellorganell findet (Hauri, 2000). 130 kDa *cis*-

Golgi matrix protein (GM130) wurde aufgrund seiner prominenten Lokalisation im *cis*-Golgi-Apparat (Nakamura, 1995) als Marker für dieses Kompartiment eingesetzt.

mSPPL2c Isoform A



mSPPL2c Isoform B

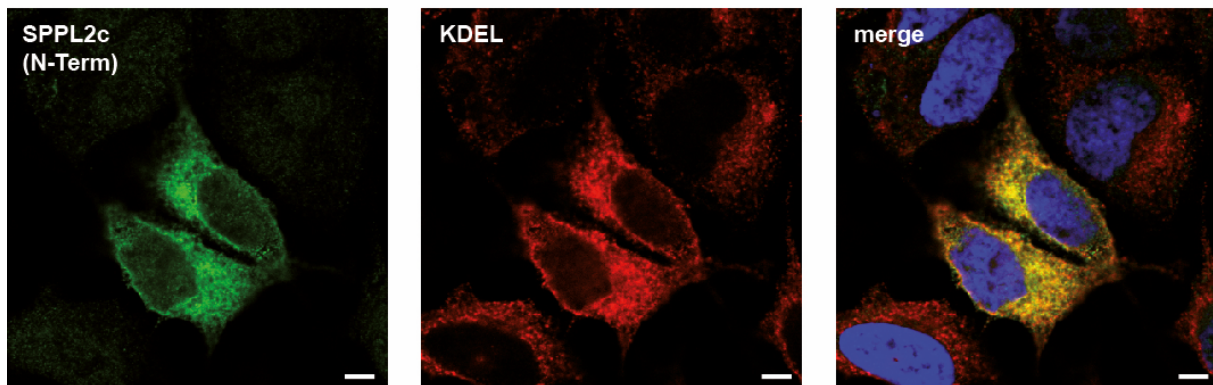
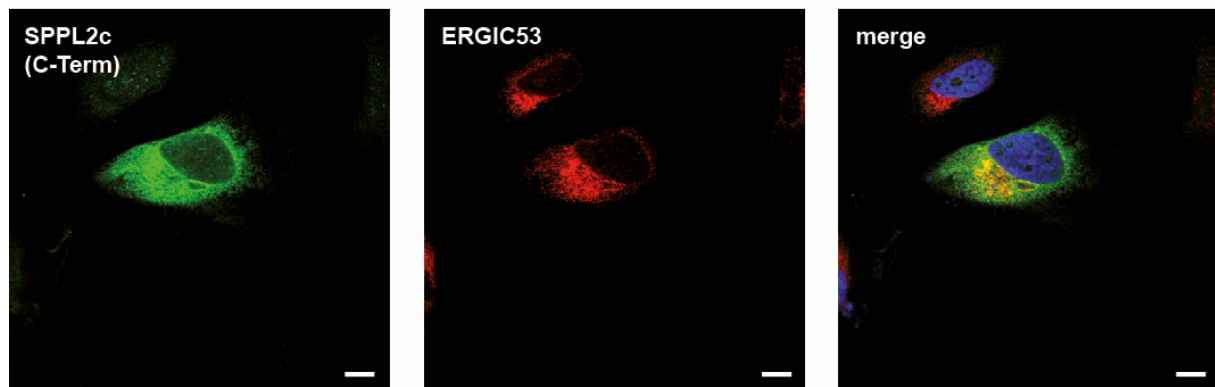


Abbildung 11: Kolokalisationsfärbung der mSPPL2c-Isoformen mit Antikörpern gegen das ER-Retentionsmotiv KDEL. Transient mit Konstrukten der beiden mSPPL2c-Isoformen transfizierte HeLa-Zellen wurden nach der Fixation mit Antikörpern gegen das ER-Markerpeptid KDEL und den mSPPL2c-Isoformen inkubiert. Mittels fluoreszierenden Sekundärantikörpern erfolgte nach Bindung an die Primärantikörper die Darstellung unter dem konfokalen Mikroskop. Es erfolgte die Darstellung des Zellkerns mit DAPI (blau). Größenmaßstab = 10 μ m, merge = übereinander gelegte Bilder.

Die Abbildung 11 zeigt, dass sowohl für die Isoform A als auch für die Isoform B eine nahezu komplette Kolokalisierung mit dem ER-Marker KDEL festgestellt werden konnte.

mSPPL2c Isoform A



mSPPL2c Isoform B

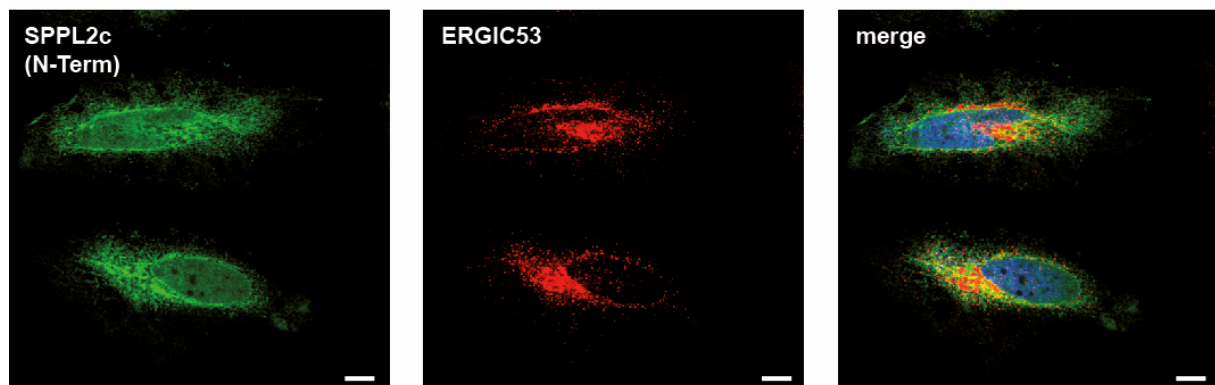
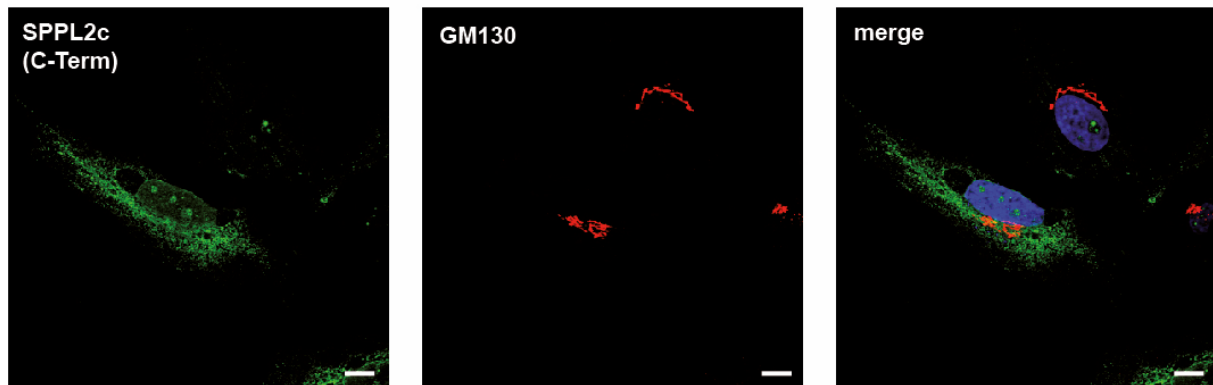


Abbildung 12: Immunfluoreszenzfärbung von HeLa-Zellen mit mSPPL2c-Isoformen und ERGIC53. HeLa-Zellen wurden mit Konstrukten der beiden mSPPL2c-Isoformen für 24 h transient transfiziert, anschließend fixiert und mit den in der Abbildung angegebenen Primärantikörpern inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit den jeweiligen Sekundärantikörpern inkubiert und per Fluoreszenzmikroskopie visualisiert. Es erfolgte die Darstellung des Zellkerns mit DAPI (blau). Größenmaßstab = 10 μ m, merge = übereinander gelegte Bilder.

Wie in Abbildung 12 dargestellt, ergab sich bei der Detektion der Antigen-Antikörperbindungen der mSPPL2c-Isoformen mit dem ERGIC-Marker ERGIC53 zwar eine gering ausgeprägte Kolokalisierung, diese war aber nicht so ausgeprägt wie für den ER-Marker KDEL.

mSPPL2c Isoform A



mSPPL2c Isoform B

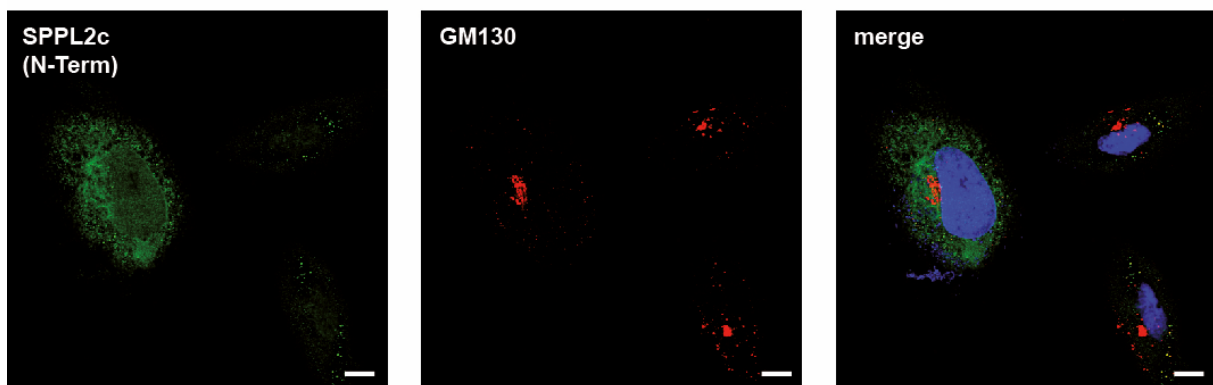


Abbildung 13: Vergleich der zellulären Lokalisation der murinen SPPL2c-Isoformen mit GM-130. Transient mit Konstrukten der beiden mSPPL2c-Isoformen transfizierte HeLa-Zellen wurden nach der Fixierung mit einem anti-GM-130-Antikörper bzw. anti-mSPPL2c-Antikörper inkubiert. Zur Darstellung der Antikörperbindung erfolgte die Inkubation in einem fluoreszierenden speziesspezifischen Sekundärantikörper. Für die mikroskopische Analyse schloss sich die Darstellung des Zellkerns mit DAPI an (blau). Größenmaßstab = 10 μ m, merge = übereinander gelegte Bilder.

Bei der Untersuchung einer möglichen Lokalisation von mSPPL2c im Golgi-Apparat ließ sich keine überlappende Verteilung des Marker-Proteins GM130 mit dem mSPPL2c-Protein feststellen (Abbildung 13). Eine Lokalisation von SPPL2c im Golgi-Apparat erschien daher unwahrscheinlich.

Zusammengenommen deuten diese Experimente darauf hin, dass mSPPL2c unter Überexpression ein ER-ständiges Protein ist. Aus den hier gezeigten Ergebnissen lässt sich zudem schließen, dass die beiden Isoformen unter Überexpression im gleichen subzellulären Kompartiment lokalisiert sind.

3.1.3 Glykosylierung von mSPPL2c

In einem Ausgangsexperiment wurde untersucht, ob das mSPPL2c-Protein N-Glykosylierungen aufweist (Abbildung 14). Dafür wurden die beiden Endoglykosidasen Endo H und PNGase F verwendet. Während die erstgenannte nur Mannose-reiche Zuckerreste abspaltet, die vorwiegend in ER-assoziierten Proteinen vorkommen, spaltet PNGase F auch komplexe Zuckergerüste, die auf eine Reifung und Modifizierung des Proteins im Golgi-Apparat hindeuten, ab. Abbildung 14 zeigt das Ergebnis der Inkubation von Lysaten mSPPL2c-exprimierender HEK293T-Zellen mit Endo H (Abbildung 14 A) und PNGase F (Abbildung 14 B).

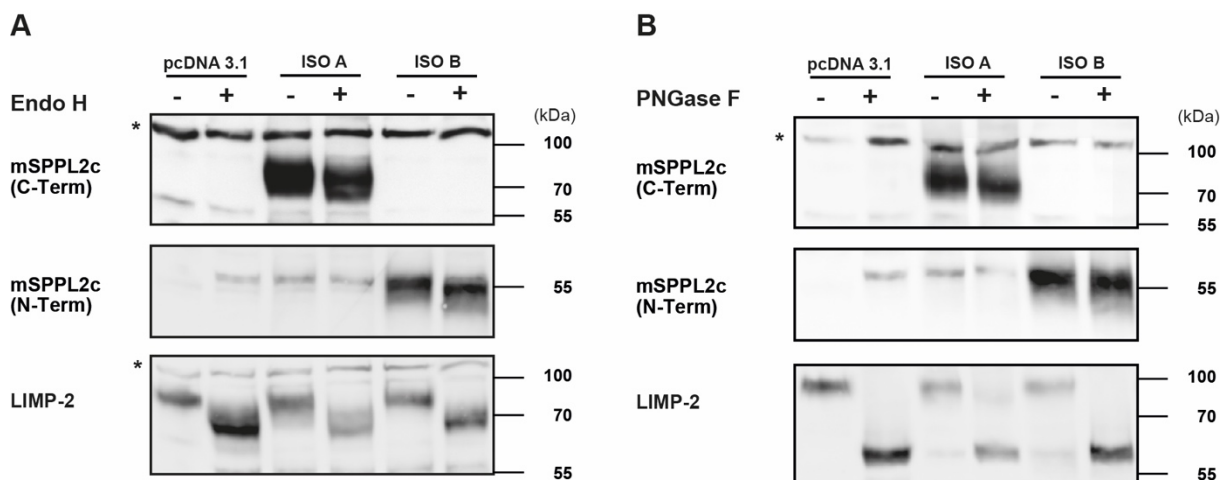


Abbildung 14: Deglykosylierung beider mSPPL2c-Isoformen mit Endo H und PNGase F. HEK293T-Zellen, die transient mSPPL2c Isoform A/B exprimierten, wurden lysiert. Aliquots der Lysate wurden für 3 Stunden mit den Glykosidasen Endo H (A) oder PNGase F (B) inkubiert, die Proteine mittels SDS-PAGE separiert und schließlich per *Western Blot* auf eine Membran transferiert. Es erfolgte eine Detektion von beiden Isoformen des Proteins mSPPL2c. Das lysosomale Membranprotein LIMP-2 wurde als Kontrolle detektiert, da es sowohl komplex- als auch nicht-komplex-gebundene N-Zucker aufweist. Abkürzungen: ISO A = mSPPL2c Isoform A, ISO B = mSPPL2c Isoform B, LIMP-2 = *Lysosome membrane protein 2*, Sterne = unspezifische Antikörperbindungen.

Wie aus der Abbildung 14 hervorgeht, resultierte aus der Inkubation mit beiden Glykosidasen eine Verringerung des apparenten Molekulargewichtes von mSPPL2c. Aufgrund der Sensitivität des Proteins gegenüber der Inkubation mit Endo H kann geschlossen werden, dass die konjugierten Zuckermoleküle entweder aus Hybrid- oder Oligomannose-Glykanen bestehen.

Mithilfe des NetNGlyc 1.0 Servers (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) konnten in der Proteinsequenz des murinen SPPL2c (Isoform A und B) drei Positionen von möglichen N-glykosylierten Aminosäuren identifiziert werden: N39, N106, N383 (siehe Abbildung 15).

| SeqName | Position | Potential | Jury agreement | N-Glyc result |
|-----------------------|-----------------|-----------|-------------------|------------------|
| sp_A2A6C4_SPP2C_MOUSE | <u>39</u> NWSK | 0.4500 | (6/9) | - |
| sp_A2A6C4_SPP2C_MOUSE | <u>106</u> NCSF | 0.6160 | (9/9) | ++ |
| sp_A2A6C4_SPP2C_MOUSE | <u>383</u> NCTL | 0.5866 | (7/9) | + |

Abbildung 15: Ergebnis der Analyse der Proteinsequenz von mSPPL2c Isoform A mittels NetNGlyc 1.0. Die Positionen der potenziell N-glykosylierten Asparaginreste sind unterstrichen. Für die Isoform B von mSPPL2c wurden identische Ergebnisse erhalten.

Um die Positionen der potentiell N-glykosylierten Asparaginreste innerhalb des Proteins zu klären (zytosolisch vs. intraluminal), wurden mittels des TMHMM-Servers (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) anhand der Proteinsequenz von mSPPL2c die Positionen der Transmembrandomänen berechnet (s. Anhang, Abbildung 39 und 40). Dabei zeigte sich, dass sich N39, N106 und N383 im intraluminal gelegenen Teil des Proteins befinden und damit für eine N-Glykosylierung in Frage kämen. Allerdings ergaben die Berechnungen des NetNGlyc 1.0 Servers nur eine geringe Wahrscheinlichkeit für eine N-Glykosylierung an N39 (s. Abbildung 15). Daher wurde diese Aminosäure zunächst nicht weiter auf eine mögliche Glykosylierung untersucht. N383 befände sich nach den Berechnungen des TMHMM-Servers an dem Übergang zwischen einer luminalen Schleife und der Helix einer Transmembrandomäne, was eine ungewöhnliche Stelle für eine N-Glykosylierung darstellen würde (Taylor, 2007). In Kombination mit der geringen errechneten Wahrscheinlichkeit für eine N-Glykosylierung an dieser Position wurde daher auf eine weitere Untersuchung einer möglichen Glykosylierung dieses Asparaginrestes verzichtet.

Gemäß der in Abbildung 15 gezeigten Analyse und der intraluminalen Position der Aminosäure erschien die Glykosylierung an N106 am wahrscheinlichsten. Mittels ortsgerichteter Mutagenese (*site-directed mutagenesis*) wurde dieser Asparaginrest durch einen Alaninrest ausgetauscht. Anschließend wurden HeLa-Zellen mit den modifizierten mSPPL2c-Konstrukten transfiziert, lysiert und erneut mit den beiden Glykosidasen inkubiert (siehe Abbildung 16).

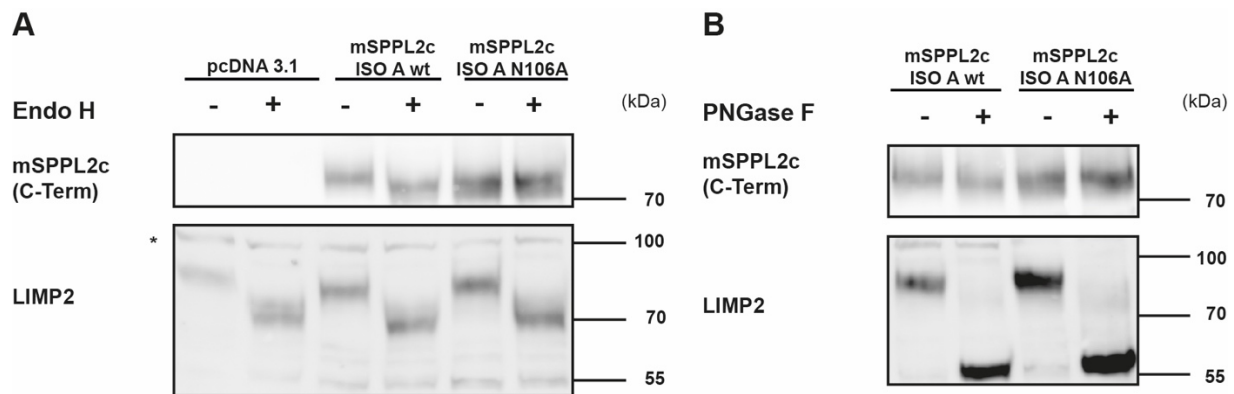


Abbildung 16: Deglykosylierung der mSPPL2c-N106A-Mutante. HEK293T-Zellen wurden für 24 h mit Wildtyp- und N106A-mSPPL2c-Konstrukten transfiziert, im Anschluss lysiert und mit den angegebenen Glykosidasen Endo H (A) und PNGase F (B) für 3 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Analyse per *Western Blotting*. Als Kontrollprotein für die erfolgreiche enzymatische Deglykosylierung wurde LIMP-2 verwendet, da es sowohl komplex- als auch nicht-komplex-gebundene N-Glykosylierungen aufweist. ISO A = mSPPL2c Isoform A, LIMP-2 = *Lysosome membrane protein 2*, Sterne = unspezifische Antikörperbindungen.

Abbildung 16 zeigt, dass die N106A-Mutante im Vergleich zum Wildtyp-Protein nach dem enzymatischen Abbau der N-Glykane kein reduziertes Molekulargewicht aufweist. Daher kann angenommen werden, dass N106 im mSPPL2c-Protein mit N-Glykanen modifiziert ist und dass mSPPL2c an keiner anderen Stelle N-glykosyliert ist. Identische Ergebnisse zeigten sich unter Verwendung eines mSPPL2c-N106A-Isoform-B-Konstruktes (siehe Anhang, Abbildung 41).

3.2 Untersuchungen möglicher SPPL2c-Substrate

In dem Einleitungsteil wurden verschiedene Typ-II-Transmembranproteine präsentiert, die als mögliche Substrate von SPPL2c im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden: Die Gene dieser Proteine weisen eine hohe Homologie mit dem ATF6-Gen auf. ATF6 wird RIP-abhängig durch S2P aktiviert. Eine ähnliche Prozessierung der Substratkandidaten durch SPPL2c ist daher denkbar. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proteine waren: BBF2H7, TISP40, CREBH, OASIS und Luman.

Die Substratkandidaten wurden durch Überexpressionsstudien in HEK293-Zellen untersucht. Dazu wurde das potentielle Substrat allein überexprimiert und zusätzlich mit der aktiven Protease SPPL2c koexprimiert. Als Kontrolle wurde eine Mutante, die aufgrund einer induzierten Mutation eines kritischen Asparaginrestes des aktiven Zentrums proteolytisch inaktiviert wurde, verwendet. Zudem wurde je ein Versuchsansatz mit den Substratkandidaten und aktiver bzw. proteolytisch inaktivem SPP-Konstrukt transfiziert, da für diese Protease ebenfalls eine ER-Lokalisation beschrieben ist und sie ebenfalls die untersuchten Substrate prozessieren könnte. Desweiteren wurde ein Kontrollansatz nur mit dem Vektor pcDNA3.1/H+ transfiziert. Sämtliche Substratkandidaten wurden an ihrem N-Terminus mit einem HA-Epitop fusioniert, welches die Detektion des Proteins mithilfe des HA-Antikörpers auf

Nitrocellulosemembranen ermöglichte. Im Falle von GnT1IP-L/S (s.u.) wurde eine Proteolyse durch die Protease SPP nicht untersucht.

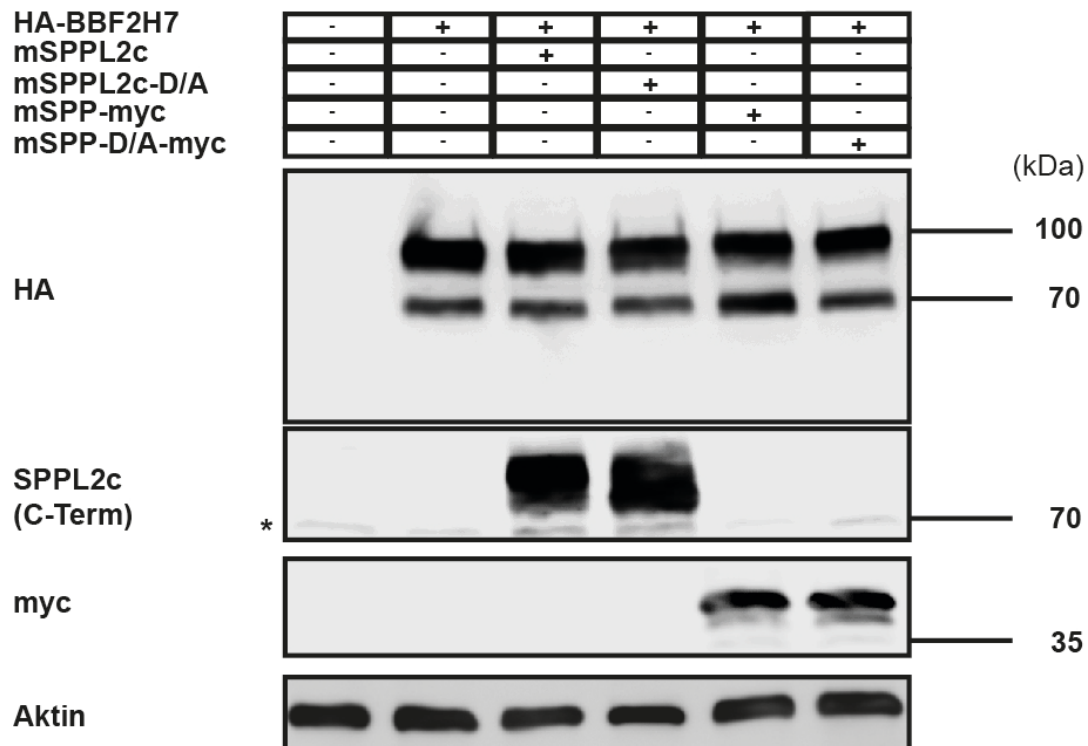


Abbildung 17: Proteolyse-Assay von BBF2H7 bei Koexpression mit mSPPL2c und mSPP. HEK293T-Zellen wurden transient mit HA-getaggttem BBF2H7-Konstrukt und mSPPL2c- und mSPP-Konstrukten transfiziert. Die Konstrukte der Proteasen kodierten dabei für eine proteolytisch aktive und inaktive Form der jeweiligen Proteine. Die Zellen wurden 24 h nach der Transfektion lysiert und die in der Probe enthaltenen Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem *Western Blotting* erfolgte die Detektion des BBF2H7-Proteins mittels des HA-Antikörpers. Zusätzlich wurden die koexprimierten Proteasen mit den angegebenen Antikörpern detektiert. Aktin wurde als Ladekontrolle eingesetzt und zeigt eine gleichmäßige Verteilung der Probenvolumina, Sterne = unspezifische Antikörperbindungen.

Die Abbildung 17 zeigt beispielhaft einen *Western Blot* mit HEK293T-Zellen, welche ein BBF2H7-Konstrukt und aktive bzw. inaktive SPP/SPPL2c-Konstrukte überexprimierten. Dabei zeigten sich in den Zellen, die nur das Substratkonstrukt überexprimierten, zwei distinkte Banden auf Höhe der 100 kDa- und 70 kDa-Markerbande. In den Proben, die zusätzlich mit dem aktiven oder inaktivem SPP/SPPL2c-Konstrukt transfiziert worden waren, blieben diese Banden unverändert. Zudem wurden keine niedermolekularen Spaltfragmente detektiert. Zusammengenommen konnten keine Hinweise für eine proteolytische Prozessierung von BBF2H7 durch SPPL2c oder SPP gewonnen werden.

Bei den anderen oben beschriebenen ATF6-homologen Transkriptionsfaktoren, für die BBF2H7 als exemplarisches Beispiel gelten kann, fand sich unter Überexpressionsbedingungen mit aktivem und inaktivem mSPPL2c-Konstrukt ebenfalls kein Anhalt für eine proteolytische Spaltung. Die *Western Blots* der dazugehörigen Experimente sind im Anhangsteil dieser Arbeit abgebildet (siehe Anhang, Abbildungen 42-45).

Als weitere mögliche Substrate wurden das unter 1.4 vorgestellte GnT1IP-L und dessen kürzere Isoform GnT1IP-S untersucht. Wie in Abbildung 18 erkennbar ist, ergaben sich bei alleiniger Transfektion von HEK-Zellen mit dem GnT1IP-L-Konstrukt und zusätzlicher Transfektion mit der aktiven bzw. inaktiven SPPL2c-Protease keine Unterschiede in den Bandenmustern der *Western Blots*. Eine Prozessierung von GnT1IP-L durch SPPL2c erscheint damit unwahrscheinlich. Auch der zu GnT1IP-S zugehörige *Blot* zeigte keine Hinweise auf eine proteolytische Aktivität und findet sich daher im Anhang unter Abbildung 46.

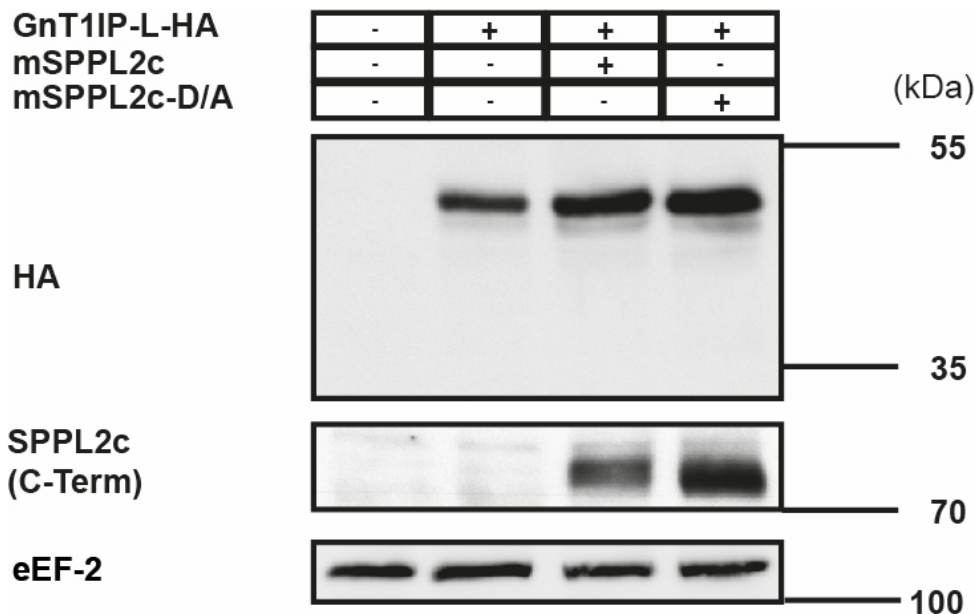


Abbildung 18: Proteolyse-Assay von GnT1IP-L bei Koexpression mit mSPPL2c. HEK293T-Zellen wurden über Nacht mit HA-getaggtm GnT1IP-L-Konstrukt und Konstrukten von proteolytisch aktiver und inaktiver mSPPL2c-Protease transfiziert. Nach der Zellyse wurden die Proben mittels SDS-PAGE getrennt und die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. GnT1IP-L wurde mittels des HA-Antikörpers detektiert, mSPPL2c über den C-terminalen Antikörper, während eEF-2 als Ladekontrolle nachgewiesen wurde.

3.3 Untersuchungen zur Gewebeexpression von mSPPL2c

Um eine mögliche Expression von mSPPL2c *in vivo* zu detektieren, wurden aus verschiedenen Organen murinen Ursprungs Lysate gewonnen und diese mittels *Western Blotting* auf eine Expression des Proteins untersucht. Dafür wurden Organlysate von je zwei Wildtyp- und zwei SPPL2c^{-/-}-Mäusen in ihren Expressionsmustern und Reaktivität gegen den mSPPL2c-Antikörper verglichen (Abbildung 19). Dabei ließen sich in den Proben beider Genotypen in allen Organen Antikörperbindungen auf Höhe der 55 kDa-Markerbande nachweisen. In den Proben, die aus Hodenlysaten gewonnen waren, zeigte sich zusätzlich ein Signal oberhalb der 70 kDa-Markerbande. In SPPL2c-defizienten Mäusen war dieses Signal nicht detektierbar. Aufgrund des errechneten Molekulargewichts von mSPPL2c von circa 76 kDa und des Signals

in den Wildtyp-Mäusen erschien es somit wahrscheinlich, dass SPPL2c unter Basalbedingungen im murinen Testis exprimiert wird.

Repräsentativ für sämtliche untersuchten Organe werden *Western Blots* von 5 unterschiedlichen Organen abgebildet. In den weiteren untersuchten Organsystemen ließ sich unter Basalbedingungen kein SPPL2c-Protein nachweisen, die Abbildungen der restlichen *Western Blots* sind daher im Anhangsteil unter Abbildung 47 dargestellt.

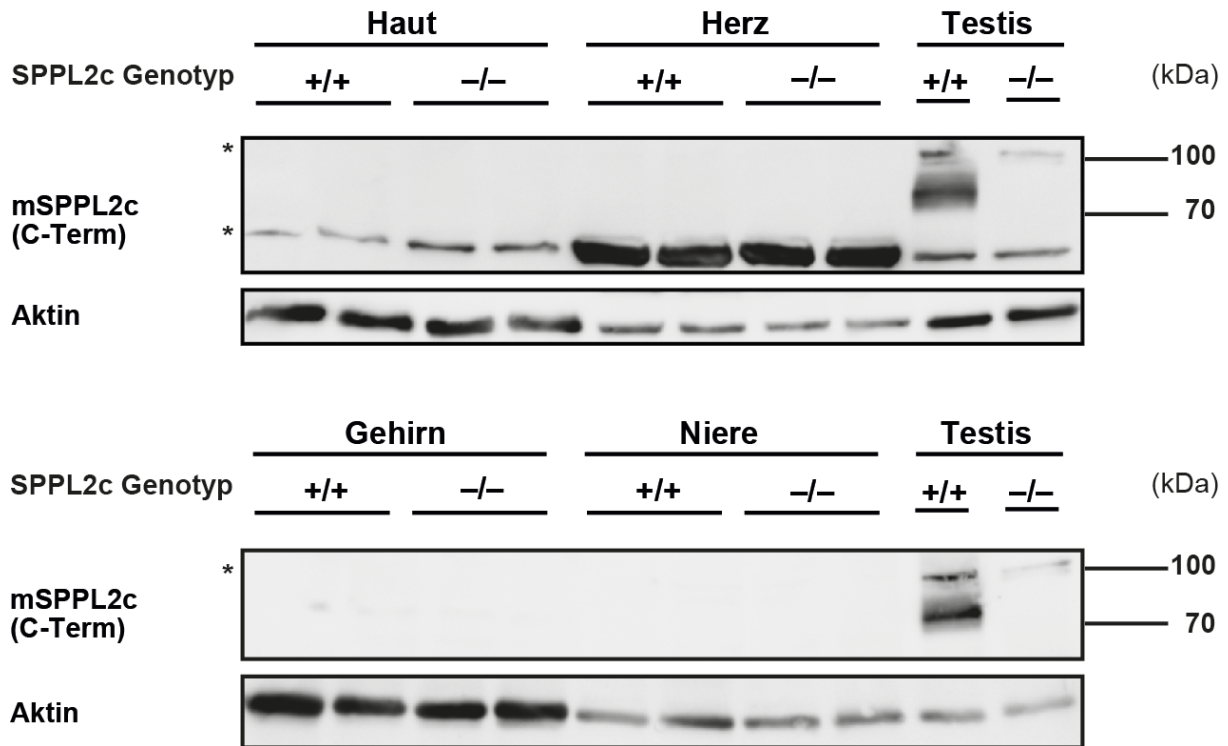


Abbildung 19: Expressionsanalyse von SPPL2c in Mausorganen. Aus den angegebenen Organen von Wildtyp- und mSPPL2c-defizienten Mäusen wurden Totallysate gewonnen. Nach der Lyse und dem Auftrennen der Proben mittels SDS-PAGE wurden die dazugehörigen *Western Blots* mit dem mSPPL2c-spezifischen Antikörper über Nacht inkubiert. Über speziesspezifische Sekundärantikörper wurde durch eine konjugierte Meerrettichperoxidase mittels Chemolumineszenz ein optisches Signal erzeugt. Es erfolgte zusätzlich eine Ladekontrolle mit einem Aktin-Antikörper, um die gleichmäßige Beladung der Proben anzuzeigen, Stern = unspezifische Antikörperbindungen.

Um eine weitere mögliche Expression des Proteins in anderen Organen bzw. Zelltypen des männlichen und weiblichen Reproduktionstraktes zu untersuchen, wurden aus dem Hoden, Nebenhoden, Spermien und dem Ovar Organlysate gewonnen und per *Western Blotting* analysiert. Auch hier zeigte sich eine ausschließliche Detektion von mSPPL2c im Hoden (siehe Abbildung 20).

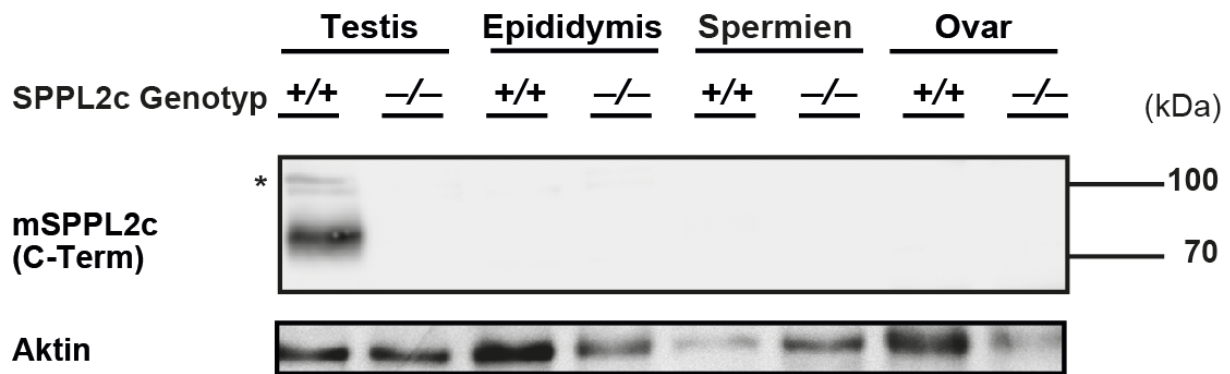


Abbildung 20: Western Blot zur Detektion von SPPL2c im männlichen und weiblichen Reproduktionsgewebe. Die angegebenen Organe wurden isoliert und lysiert. Im Fall des Nebenhodens wurde das *Caput epididymidis* verwendet, da sich in der *Cauda epididymidis* bereits reife Spermien befinden. Nach der Herstellung von Totallysaten wurden die enthaltenen Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Detektion des SPPL2c-Proteins erfolgte über den Antikörper, der an das C-terminales Epitop bindet. Aktin wurde als Ladekontrolle eingesetzt. Stern = unspezifische Antikörperbindungen.

Da in den bisherigen Untersuchungen nur die Isoform A von SPPL2c *in vivo* nachgewiesen werden konnte, wurde anschließend murines Hodengewebe untersucht, um die Isoform B des SPPL2c-Proteins zu detektieren. Daher wurden HeLa-Zellen mit Konstrukten für beide Isoformen transfiziert und per *Western Blotting* mit Proben von Organlysaten aus Hodengewebe verglichen (siehe Abbildung 21). Dabei ließen sich, neben der Isoform A, mit dem N-terminalen Antikörper im Wildtyp-Hoden Banden nachweisen, die Proteinen mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 55 kDa entsprachen. In den HeLa-Zellen, welches die Isoform B überexprimierten, ließen sich ebenfalls Banden mit einem ähnlichen apparenten molekularen Gewicht detektieren. Ein korrespondierendes Signal war in den SPPL2c-defizienten Mäusen nicht nachweisbar. Es war daher anzunehmen, dass sowohl Isoform A als auch die Isoform B des mSPPL2c-Proteins im Hoden exprimiert werden.

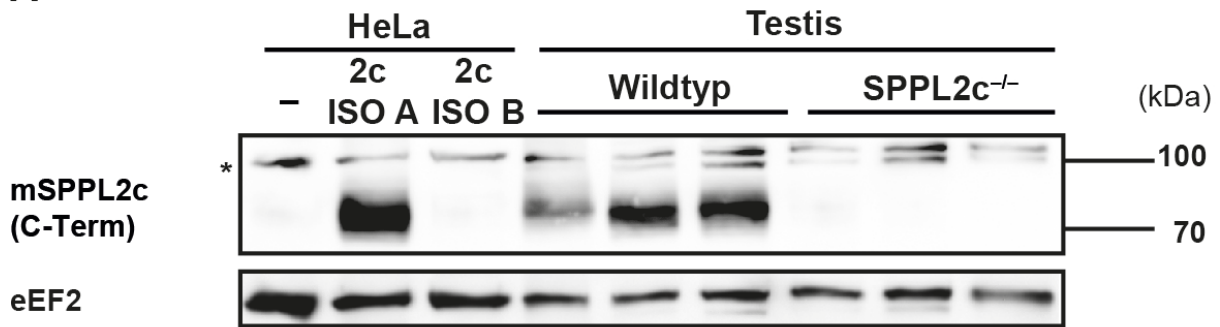
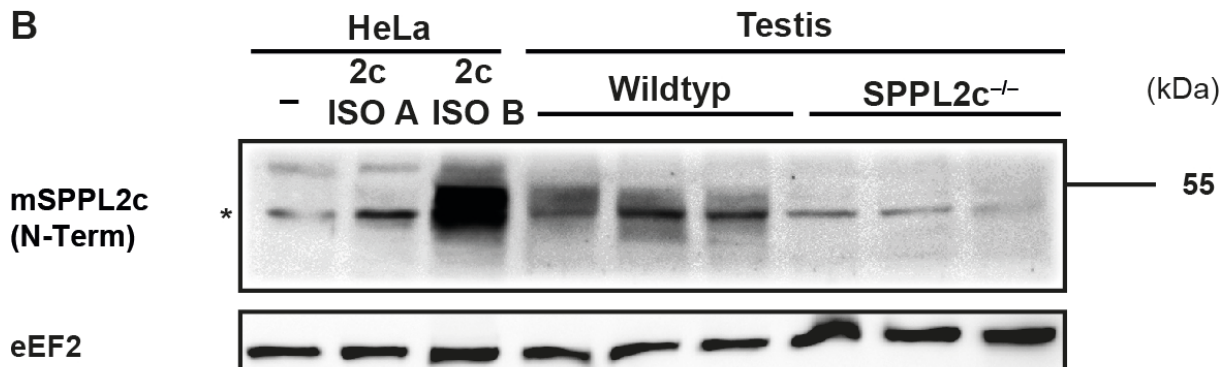
A**B**

Abbildung 21: Vergleich der mSPPL2c-Konstrukte mit dem *in vivo* exprimierten Protein. HeLa-Zellen wurden transient mit Konstrukten für die mSPPL2c Isoform A und B über Nacht transfiziert und per *Western Blotting* mit Totallysaten aus Hodengewebe verglichen. Es erfolgte die Detektion der Isoform A über den C-terminalen Antikörper (A). Für die Detektion der Isoform B wurde der N-terminale Antikörper verwendet (B). EEF-2 wurde detektiert, um eine gleichmäßige Beladung der Proben anzuzeigen. Abkürzungen: 2c = mSPPL2c, ISO A = Isoform A, ISO B = Isoform B, eEF-2 = *Eukaryotic elongation factor 2*. Stern = unspezifische Antikörperbindungen

Da die eingesetzten *Western-Blotting*-basierten Verfahren potenziell geringe basale Mengen an SPPL2c-Protein nicht erkennen könnten, wurden aufgrund der höheren Sensitivität der Methode und zur Bestätigung der oben dargestellten Ergebnisse mRNA aus Leber, Milz, Niere, Herz, Lunge, Gehirn und Hoden isoliert und per RT-PCR Gen-Amplifikate des mSPPL2c-Gens synthetisiert. Auch hierbei zeigte sich, dass sowohl die Isoform A als auch die Isoform B von SPPL2c nur im Hoden exprimiert wurden (siehe Abbildung 22). Die oben gezeigten Befunde aus den Organlysaten konnten damit validiert werden.

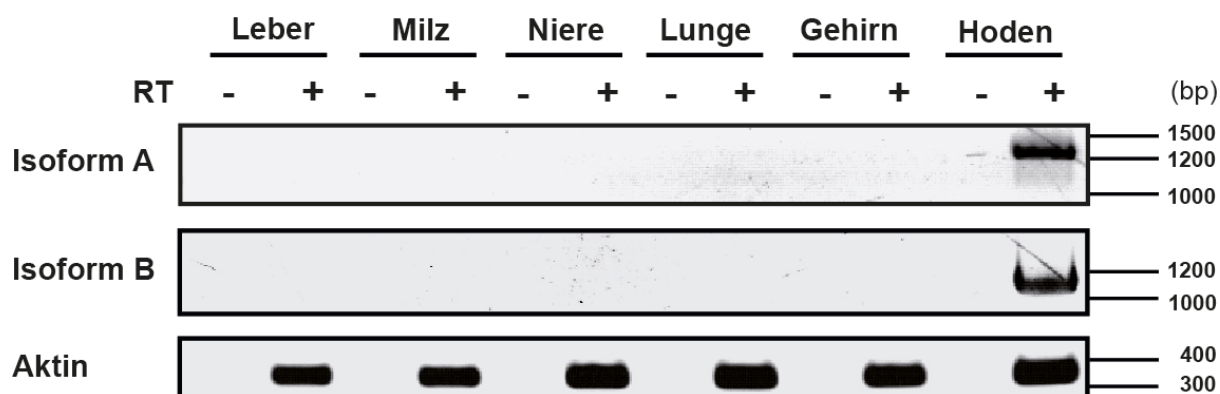


Abbildung 22: mRNA-Expressionsanalyse aus murinen Organen. Von jedem Organ wurde nach der RNA-Isolierung je ein RT-PCR-Ansatz mit oder ohne Reverse Transkriptase inkubiert. Danach wurde die Expression der beiden SPPL2c-Isoformen und Aktin als Ladekontrolle mit spezifischen Primern mittels PCR überprüft. Die Amplifikate wurden abschließend auf einem 1,5%-igen Agarosegel aufgetrennt.

Anschließend wurde die Expression des Proteins in männlichen Geschlechtsorganen mit der Expression in den weiblichen Geschlechtsorganen Ovarien und Uterus auf mRNA-Ebene verglichen. Da in der Erstbeschreibung der Presenilin-Homologen SPPL2c-mRNA besonders stark im menschlichen Herzen nachgewiesen wurde (Friedmann, 2004), wurden zusätzlich murine Herzen auf eine Expression von SPPL2c-mRNA untersucht. Aus den RNA-Proben, die aus Hodengewebe gewonnen wurden, konnte mSPPL2c-spezifische mRNA synthetisiert werden. Es konnte allerdings weder in Ovar, Uterus noch im Herzen SPPL2c-mRNA nachgewiesen werden (siehe Abbildung 23). Auch dies deutete auf eine ausschließliche Expression beider Isoformen im Hoden hin.

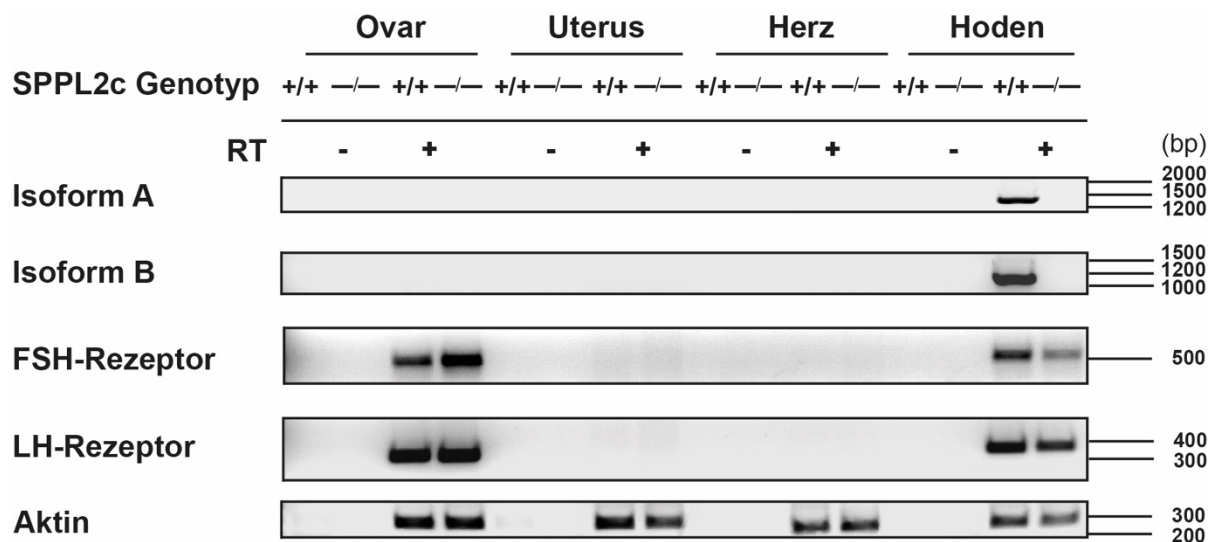


Abbildung 23: mRNA-Expressionanalyse aus murinem Reproduktionsgewebe und Herzen. Von je einem Wildtyp- und SPPL2^{-/-}-Männchen und Weibchen wurden die angegebenen Organe isoliert und wie unter Abbildung 22 beschrieben behandelt. Die Herzen stammten von den männlichen Tieren. Zusätzlich zu beiden mSPPL2c-Isoformen wurden die mRNA der Hoden- bzw. Ovar-spezifischen Gene FSH- und LH-Rezeptor amplifiziert, um die korrekte anatomische Isolierung der Organe zu überprüfen. Um eine mögliche Kontamination der Proben mit gDNA zu überprüfen, wurde mittels spezifischen Primern zusätzlich ein Fragment des Aktin-ORFs amplifiziert.

3.4 Biochemische Charakterisierung des endogenen SPPL2c-Proteins

Im Folgenden soll ein Vergleich der Daten, die aus Überexpressionsstudien in Modellzellsystemen über das mSPPL2c-Protein gewonnenen wurden (s. 3.2) mit dem endogenen Protein SPPL2c durchgeführt werden: Dafür wurde zunächst eine mögliche Glykosylierung des endogenen mSPPL2c-Proteins in murinen Testis untersucht. Dabei ergab sich bei der enzymatischen Deglykosylierung von Hodenorganlysaten mit Endo H und PNGase F ebenfalls eine Reduktion des apparenten Molekulargewichts des Proteins (Abbildung 24 A und B).

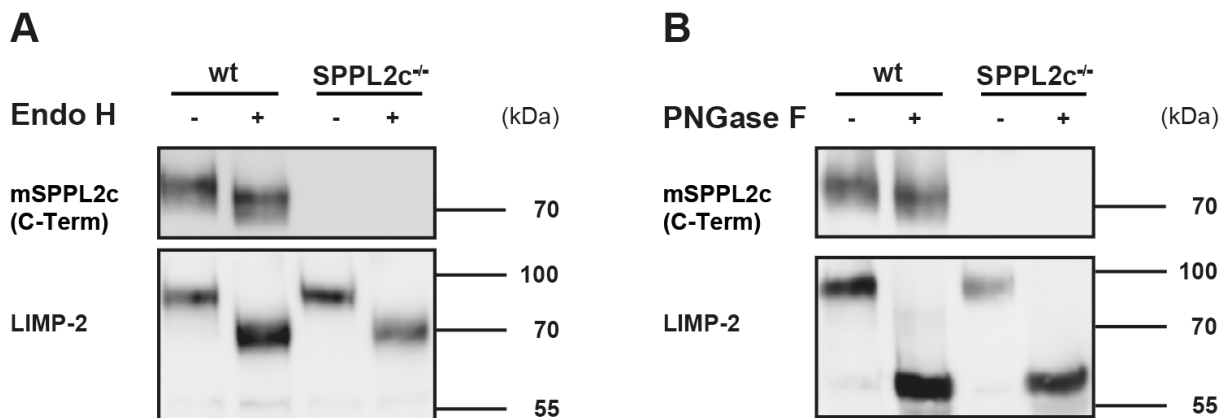


Abbildung 24: Enzymatische Deglykosylierung von Hodentotallysaten. Hodentotallysate aus Wildtyp -und SPPL2c-defizienten Mäusen wurden je 3 h mit den Glykosidasen Endo H (A) und PNGase F (B) bei 37 Grad Celsius inkubiert und anschließend per *Western Blotting* analysiert. Es erfolgte die Detektion von SPPL2c und LIMP-2, welches als Kontrollsubstrat der Glykosidasen eingesetzt wurde.

Anschließend wurde mittels Dichtegradientenzentrifugation von Hodentotallysaten die subzelluläre Lokalisation des Proteins *in vivo* untersucht. Dabei zeigte sich, dass das mSPPL2c-Protein in den gleichen Fraktionen sedimentiert wie das ER-ständige Enzym Proteindisulfid-Isomerase (PDI).

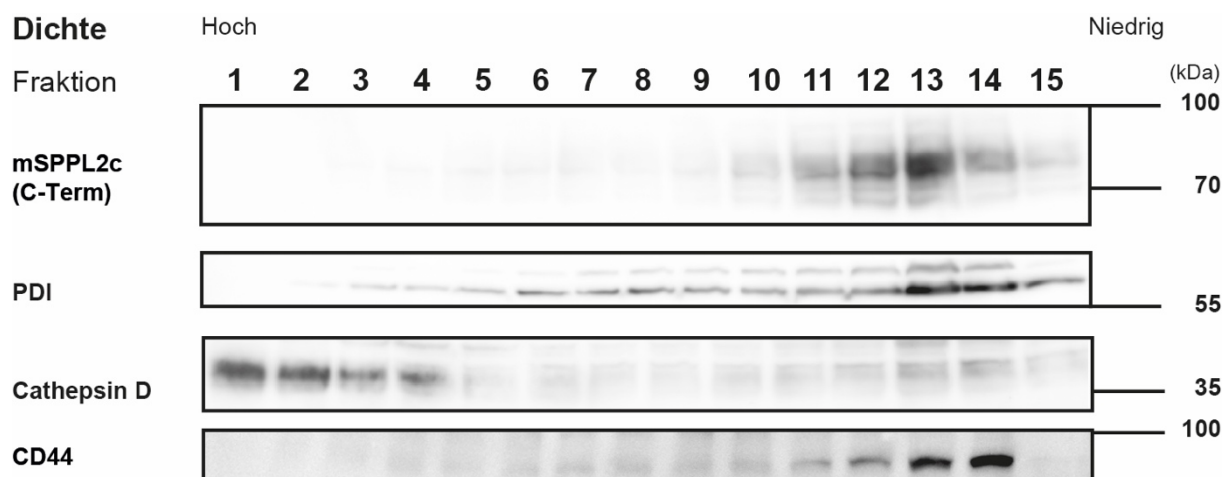


Abbildung 25: Dichtegradientenzentrifugation des postnukleären Überstandes eines Mäusehodens. Durch Dichtezentrifugation wurden die verschiedenen Zellorganellen eines murinen Hodens voneinander getrennt. Dabei reicherten sich Lysosomen (hier durch die lysosomale Protease *Cathepsin D* als Markerprotein dargestellt) aufgrund ihrer höheren Dichte in den unteren Fraktionen des Gradienten an. Das mSPPL2c-Protein ließ sich dabei in den gleichen Fraktionen (12-14) detektieren wie das ER-ständige Enzym Proteindisulfid-Isomerase (PDI). CD44 wurde als Markerprotein für die Zellmembran verwendet.

3.5 Altersabhängigkeit der SPPL2c-Expression

Die vollständige Geschlechtsreife setzt bei Nagetieren wie *Mus musculus* zwischen der 6. und 8. Lebenswoche ein (Dutta, 2016). Zur Klärung, ob es einen zeitlichen Zusammenhang zwischen der Expression von mSPPL2c und der sexuellen Reproduktionskapazität gibt, wurde von Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten ihrer sexuellen Reifung Hoden entnommen und per *Western Blotting* analysiert. Hierbei zeigte sich ein deutlicher Anstieg der Detektierbarkeit des mSPPL2c-Proteins im Zuge der sexuellen Entwicklung der männlichen Jungtiere (Abbildung 26).

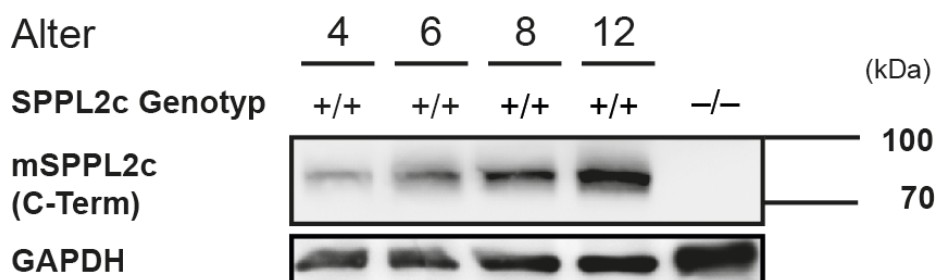


Abbildung 26: Altersabhängigkeit der Expression von SPPL2c im Testis. Von C57BL/6-Mäusen im Alter von 4 bis 12 Wochen wurden aus Hoden Totallysate hergestellt. Anschließend wurden die darin enthaltenen Proteine mittels SDS-PAGE getrennt und durch *Western Blotting* auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. SPPL2c wurde mit Hilfe des C-terminalen Antikörper nachgewiesen. Als Vergleich diente ein Hodentotallysat einer SPPL2c-defizienten Maus. GAPDH wurde als Ladekontrolle detektiert, um eine gleichmäßige Beladung der Proben anzuzeigen.

3.6 Verteilung des SPPL2c-Proteins im Hoden

Da die Analyse der verschiedenen murinen Organe eine Expression von SPPL2c im Testis ergab, wurden von diesem Organ Gewebeschnitte angefertigt und histologisch untersucht. Zusätzlich wurde ein X-Gal-Reportersystems zur Visualisierung der Expression von SPPL2c in Knockout-Mäusen verwendet: Wie unter 2.1.5 erläutert, wird in den mSPPL2c^{-/-}-Mäusen anstatt des mSPPL2c-Proteins ein Reporterenzym, die β -Galaktosidase, exprimiert. Das Enzym β -Galaktosidase katalysiert die Hydrolyse der glykosidischen Bindungen von β -Galaktopyranosiden: Der Farbstoff X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid) wird daher bei exprimierter β -Galaktosidase in Galaktose und einen blauen, wasserunlöslichen Indigo-Farbstoff hydrolysiert.

Zur Validierung des X-Gal-Reportersystems wurde die β -Galaktosidase zunächst aus Hodentotallysaten per *Western Blotting* detektiert (siehe Abbildung 27). Dabei ließ sich in den Lysaten aus SPPL2c-defizienten Mäusen ein Signal unterhalb der 130 kDa-Markerbande nachweisen, welches in den Wildtyphoden nicht vorhanden war. Das errechnete Molekulargewicht der β -Galaktosidase beträgt 116 kDa und entsprach damit wahrscheinlich dem detektierten Protein.

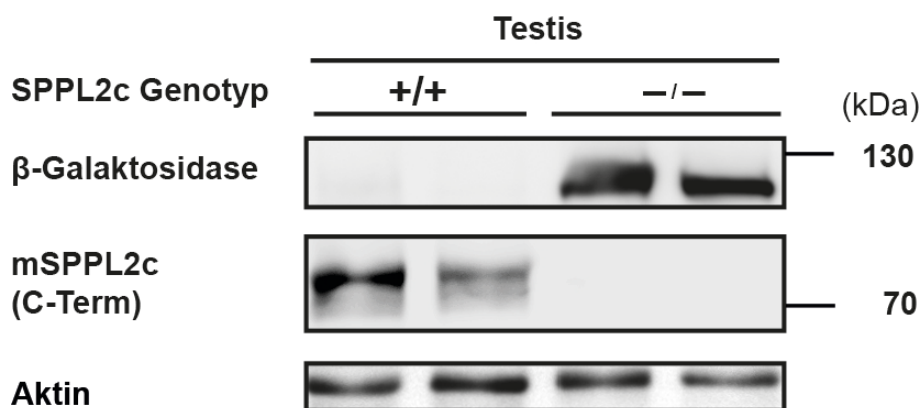


Abbildung 27: Detektion der β -Galaktosidase aus Hodentotallysaten. Es wurden je 2 Hoden von Wildtyp und SPPL2c^{-/-}-Mäusen lysiert und anschließend auf eine Expression des Reporterenzym β -Galaktosidase per *Western Blotting* untersucht. Die Expression des SPPL2c-Proteins in den Wildtypmäusen wurde durch die Detektion von mSPPL2c mittels des C-terminalen Antikörpers bestätigt. Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet.

Im Anschluss wurde die Aktivität des β -Galaktosidase-Reportersystems in histologischen Gewebeschnitten analysiert. Abbildung 28 zeigt einen histologischen Schnitt von Hodengewebe nach der Inkubation der Objektträger mit dem Farbstoff X-Gal. In den SPPL2c-defizienten Mäuse färbte sich eine Population von lumennah gelegenen Zellen innerhalb der *Tubuli seminiferi* an, die elongierte Zellkörper aufwiesen. In den entsprechenden Wildtyp-Kontrollschnitten ließ sich kein Signal detektieren.

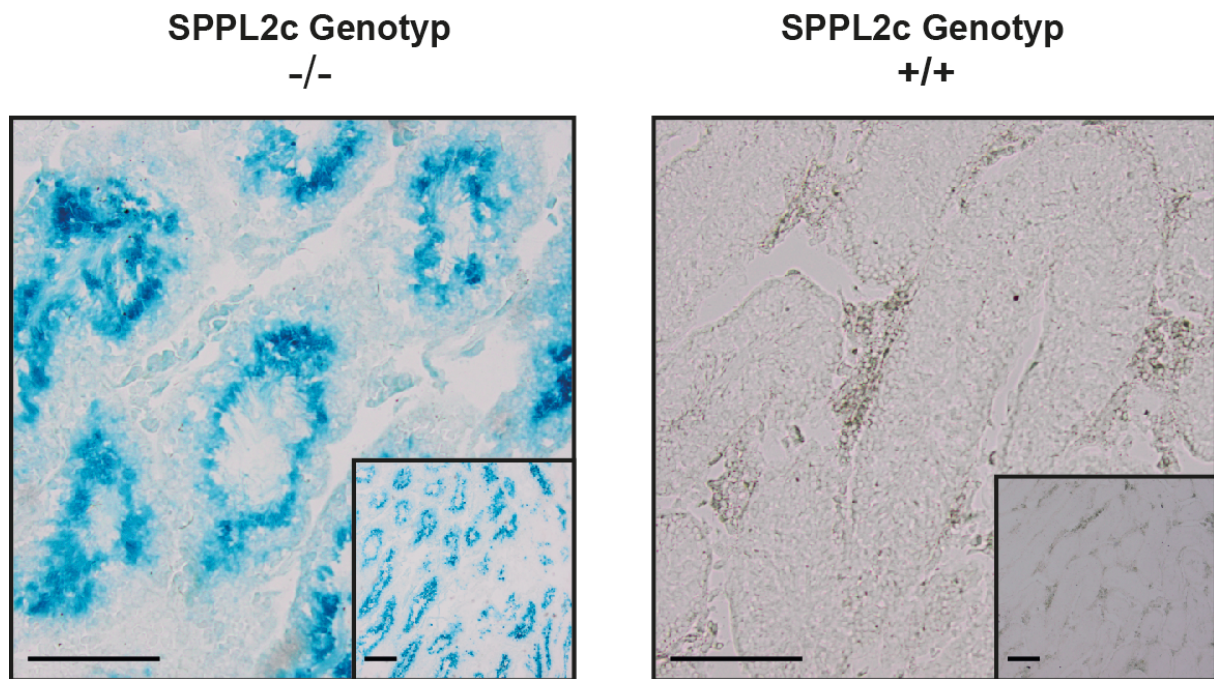


Abbildung 28: Histochemische Darstellung der β -Galaktosidase-Aktivität in Wildtyp- und SPPL2c^{-/-}-Mäusen. Die Mäusehoden wurde über Nacht in 4% PFA fixiert und anschließend bei -20°C eingefroren. Im gefrorenen Zustand wurde mittels eines Cryotoms 7 μ m dicke Organschnitte angefertigt. Nach der Permeabilisierung des Gewebes wurde dieses für 3 Stunden bei 37 °C mit dem Indikatorfarbstoff X-Gal inkubiert. Die Blaufärbung der Zellen zeigt die Aktivität des Reporterenzym β -Galaktosidase an. Die Bilder an den rechten, unteren Bilderrändern zeigen die jeweiligen Übersichtsaufnahmen. Maßstab = 100 μ m.

Zusätzlich wurde mittels immunhistochemischen Färbungen unter Verwendung der SPPL2c-spezifischen Antikörper das Protein in Gewebeschnitten aus Wildtyp- und SPPL2c^{-/-}-Hoden detektiert (siehe Abbildung 29). Hier zeigte sich in den Hoden der Wildtypmäuse ein Signal im Zytoplasma tubulusständiger Zellen. In Schnitten aus SPPL2c-defizienten Mäusen konnte kein immunhistochemisches Signal wahrgenommen werden. Auffallend war die Nähe der signalpositiven Zellen zum Lumen der *Tubuli seminiferi* und ihre elongierten Zellkörper. Diese Keimzellen entsprechen daher wahrscheinlich elongierten Spermatozyten, die sich in einem Spätstadium der Spermatogenese befinden.

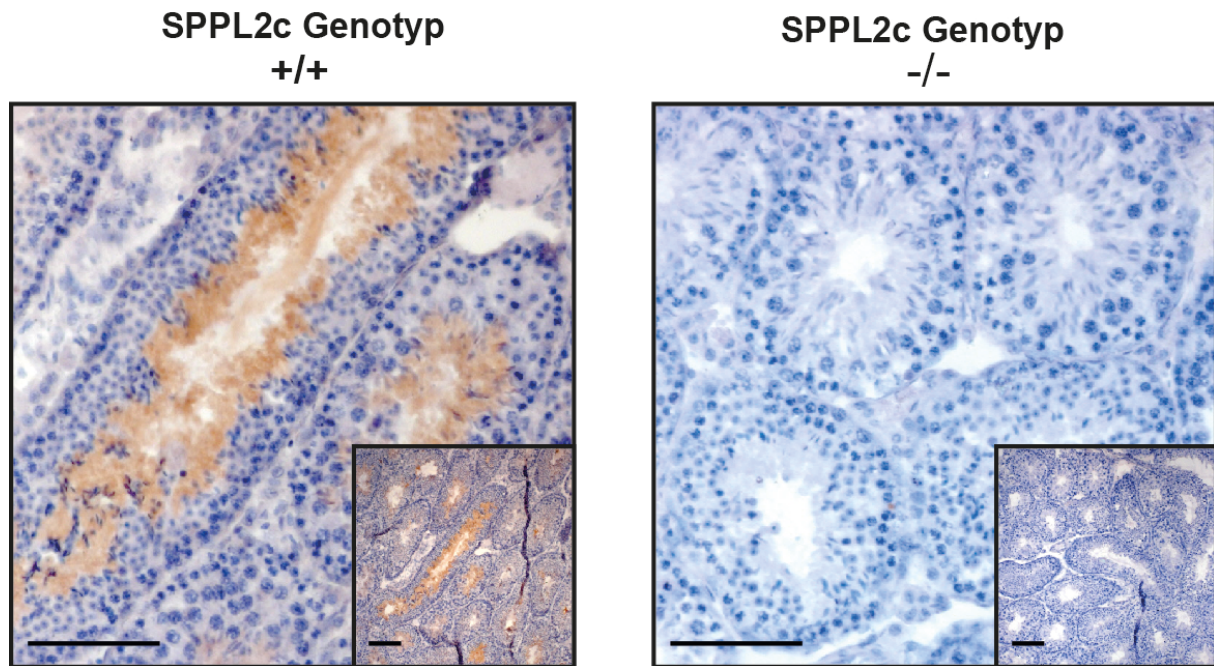


Abbildung 29: Immunhistochemische Detektion von mSPPL2c in murinem Hodengewebe. Hoden aus Wildtyp- und SPPL2c^{-/-}-Mäusen wurde über Nacht mit Bouin'scher Lösung fixiert. Es wurden 7 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt und diese mit dem mSPPL2c-spezifischen C-Term-Antikörper inkubiert. Anschließend erfolgte die Bindung des biotinylierten Sekundärantikörpers. Nach Zugabe des Avidin-Biotin-Enzymkonjugats (ABC) wurden die Gewebeschnitte mit dem Indikatorfarbstoff DAB inkubiert. Das ABC katalysierte die Reaktion des DAB zu dem braunen Niederschlagsprodukt. Die Darstellung des Zellkerns erfolgte mittels Hämalaunfärbung. Maßstab = 100 µm.

3.7 Phänotypisierung der mSPPL2c^{-/-}-Mäuse

Um die Frage nach den möglichen Funktionen der Intramembranprotease SPPL2c näher einzugrenzen, wurden die SPPL2c-defizienten Mäuse eingehend untersucht. Analysiert wurden dabei mögliche Alterationen der Gewebearchitektur der *Tubuli seminiferi* durch histologische Methoden und durchflusszytometrische Analysen. Weiter wurden die Wildtyp- und Knockout-Mäuse hinsichtlich ihrer sexuellen Reproduktionsfähigkeit, der Anzahl und Motilität ihrer maturen Spermien sowie des Verhältnisses von Körper- zu Hodengewicht verglichen.

Zunächst wurden in Zusammenarbeit mit dem Anatomischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel histologische Gewebeschnitte aus Wildtyp- und Knockout-Mäusehoden angefertigt. In Kooperation mit der AG Meinhardt von der Justus-Liebig-Universität Gießen wurden diese anschließend auf Pathologien der Tubulusarchitektur untersucht. Dabei zeigten sich zunächst keine grobmorphologischen Auffälligkeiten in den Testes der SPPL2c^{-/-}-Tiere, wobei subtile Veränderung möglicherweise nicht detektiert wurden (siehe Abbildung 30).

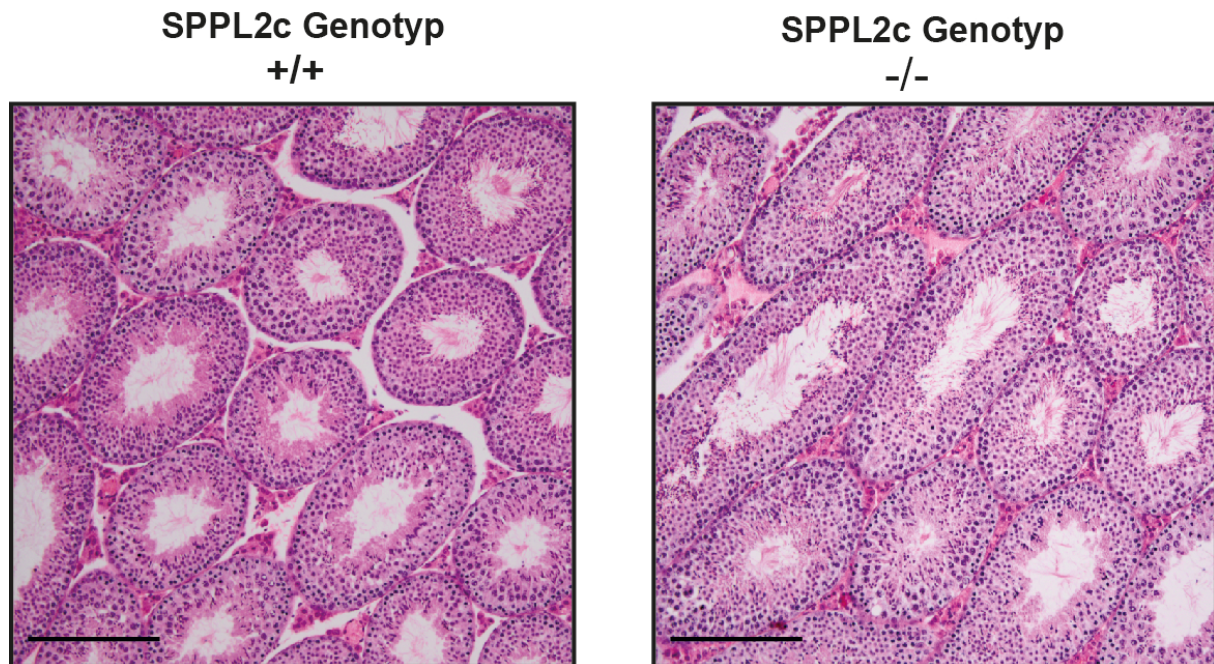


Abbildung 30: Übersichtsaufnahmen aus Hoden von Wildtyp- und SPPL2c-defizienten Mäusen. Die Hoden wurden über Nacht mittels Bouin'scher Lösung fixiert und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden 5 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt und diese mittels HE (Hämalaun + Eosin) gefärbt. Die mikroskopische Analyse wurde jeweils an 6 Wildtyp- und SPPL2c^{-/-}-Mäusen durchgeführt. Maßstab = 100 µm.

Bei der Präparation der Hoden aus SPPL2c^{-/-} Mäusen zeigte sich, dass diese im Vergleich zu den Hoden aus den SPPL2c^{+/+}-Tieren eine geringere Größe aufwiesen. Zur Objektivierung dieses Befundes wurde der Quotient aus Gesamtkörpergewicht und Hodengewicht von mehreren Mäusen gebildet (Abbildung 31). Hier zeigte sich ein signifikant erniedrigtes relatives Hodengewicht der SPPL2c^{-/-} Mäuse.

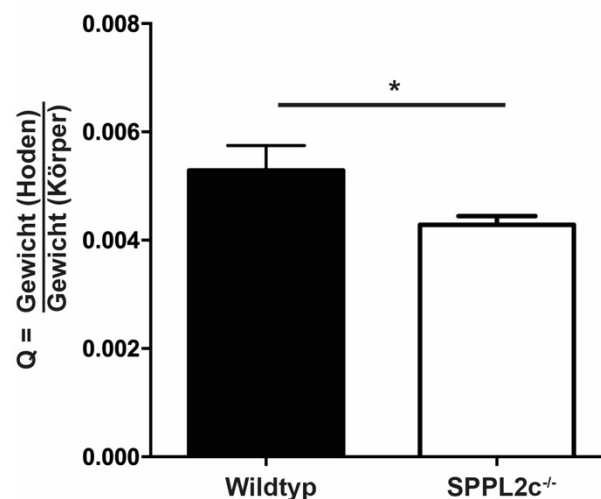


Abbildung 31: Hoden-/Körpergewicht-Quotient von Wildtyp- und mSPPL2c^{-/-}-Mäusen: Die Hoden aus den Mäusen wurden isoliert, gewogen und in Relation zum Körpergewicht der Tiere gesetzt. Die Balken zeigen den mittleren Hoden-/Körpergewichts-Quotienten. Zur statistischen Analyse wurde ein *student's t-test* durchgeführt. n = 12, * = p-Wert ≤ 0,05. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.

3.7.1 Zellpopulationsanalyse der *Tubuli seminiferi*

Um einen möglichen Verlust von Zellpopulationen zu analysieren, wurden die einzelnen Subpopulationen des Keimzellepithels durch Durchflusszytometrie und Lichtmikroskopie näher untersucht.

Per FACS-Analyse wurden die einzelnen Populationen des Hodens anhand ihres DNA-Gehalts voneinander getrennt und anschließend ihr Anteil an der Gesamtpopulation des Hodens berechnet. Hierbei zeigte sich eine Abnahme der 1C-Population in den mSPPL2c^{-/-}-Hoden, die allerdings statistisch nicht signifikant war (Abbildung 32 B). In dieser Population sind neben den elongierten Spermatiden, die in den gezeigten Ergebnissen detektierbares SPPL2c-Protein aufwiesen, auch die runden Spermatiden enthalten, die nach der oben gezeigten histologischen Analyse kein bzw. wenig mSPPL2c exprimieren (siehe auch Abbildung 32 C). Gleichzeitig nahm der prozentuale Anteil der 4C-Population, der den Vorläuferzellen der Spermatiden, den Spermatozyten, entspricht, leicht zu.

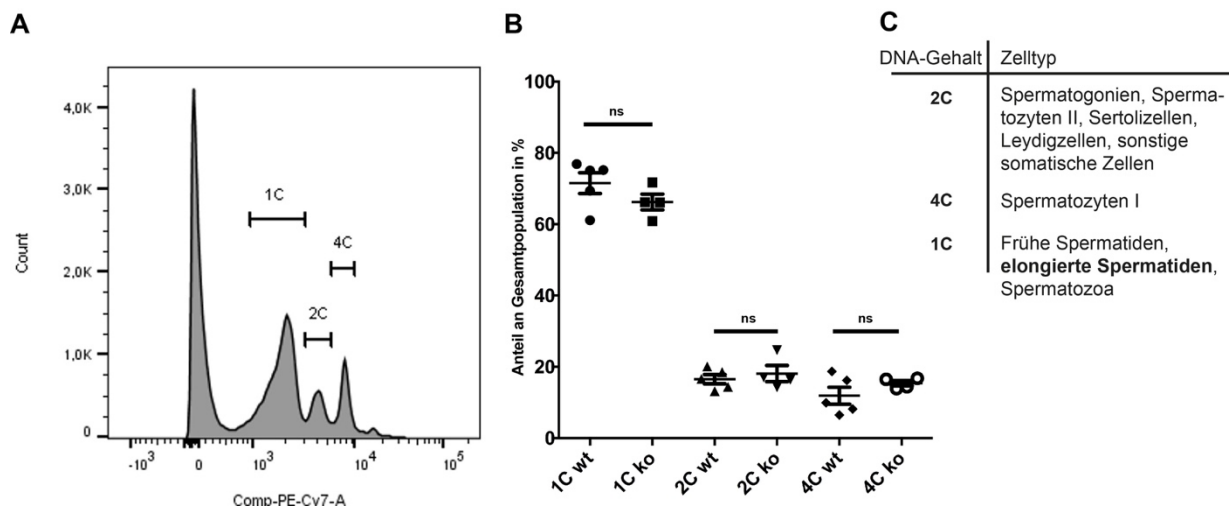


Abbildung 32: Durchflusszytometrische Analyse der Zellpopulationen im Hodengewebe.

A: Die Hoden wurden homogenisiert und die Zellpopulationen für 30 Minuten mit dem zellpermeablen DNA-Interkalator DRAQ5TM inkubiert und mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie analysiert. Anschließend konnte die Identifizierung und Quantifizierung von drei distinkten Populationen in der Hodenzellsuspension erfolgen. Als Vergleich diente eine nicht gefärbte Probe. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm FlowJo, Version 10.2 (FlowJo, LLC). Abkürzung: C = Zahl der Chromatiden pro Chromosomenpaar.

B: Die Testes von 5 Wildtyp- und SPPL2c-defizienten Tiere wurde zunächst homogenisiert und die darin enthaltenen Zellen mit dem DNA-Farbstoff DRAQ5TM gefärbt und bei 647 nm angeregt. Zur statistischen Analyse wurden *student's t-tests* durchgeführt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an, n = 5. Abkürzungen: C = Zahl der Chromatiden pro Chromosomenpaar, wt = Wildtyp, ko = mSPPL2c-Knockout, ns = statistisch nicht signifikant.

C: Überblick über den DNA-Gehalt der verschiedenen Zellpopulationen im Hoden. Fett markiert ist die Population der SPPL2c-exprimierenden Zellen.

Da es nicht möglich ist, mittels der eingesetzten FACS-Untersuchung zwischen elongierten und runden Spermatiden zu unterscheiden, wurde die Anzahl der elongierten Spermatiden pro Tubulus in Wildtyp- und Knockout-Mäusen per Lichtmikroskopie quantifiziert und verglichen.

Der Mittelwert der elongierten Spermatiden pro Tubulus lag in den Knockout-Mäusen mit 60,63 (Standardabweichung=10,28, n=6) dabei ca. 20 % unter dem Mittelwert in den Wildtyp-Mäusen, welcher 75,43 elongierte Spermatiden pro Tubulus betrug (Standardabweichung=6,90, n=6) (siehe Abbildung 33).

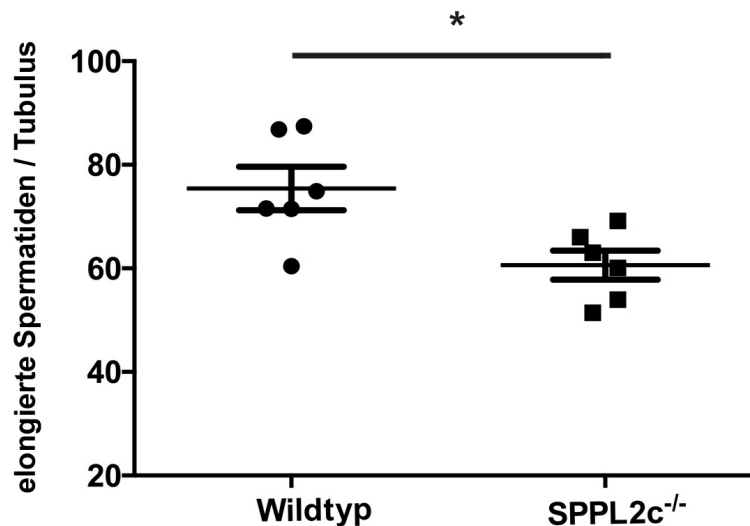


Abbildung 33: Anzahl der elongierten Spermatiden in wildtyp- und mSPPL2c-defizienten Mäusen. Die Hoden der Mäuse wurden mittels Bouin'scher Lösung fixiert und in Paraffin eingebettet. Es wurden pro Hoden je 3 Gewebeschnitte angefertigt und nach der Entparaffinierung mit HE gefärbt. Nach der Verblindung wurden aus 20 quer angeschnittenen *Tubuli seminiferi* die Anzahl der elongierten Spermatiden bestimmt und der Mittelwert errechnet. Identifiziert wurden die elongierten Spermatiden anhand ihrer Lokalisation als unmittelbar lumennah lokalisierte Zellen mit hakenförmigem, stark kondensiertem, exzentrisch gelegenen Zellkern. Hierbei zeigte sich eine Erniedrigung der Anzahl der elongierten Spermatiden in den mSPPL2c^{-/-}-Hoden. n=6, * = p-Wert ≤ 0,05 im *student's t-test*. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.

3.7.2 Fertilitätsanalyse

Aufgrund der oben beschriebenen Veränderungen der Anzahl elongierter Spermatiden im Tubulusepithel der SPPL2c^{-/-}-Mäuse wurde die Fertilität der Mäuse näher analysiert (siehe Abbildung 34). Als Referenz diente dabei die Anzahl der Nachkommen aus den Verpaarungen der Wildtyp-Männchen mit Wildtyp-Weibchen (6,875 Nachkommen pro Wurf, Standardabweichung=2,42, n=8). Die Analyse ergab eine deutliche, statistisch signifikante Reduktion der Wurfgröße in den Verpaarungen der Knockout-Männchen mit Knockout-Weibchen (4,0 Nachkommen pro Wurf, Standardabweichung=1,23, n=9). Die durchschnittliche Anzahl der Nachkommen von Verpaarungen der mSPPL2c^{-/-}-Männchen mit mSPPL2c^{+/+}-Weibchen war allerdings nicht statistisch signifikant verändert (7,0 Nachkommen pro Wurf, Standardabweichung=1,16, n=8).

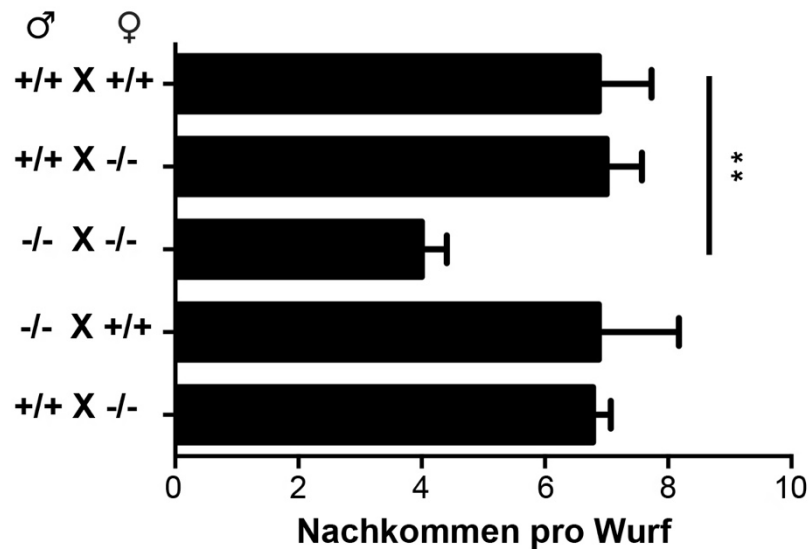


Abbildung 34: Wurfgrößenanalyse der Verpaarungen von Mäusen mit verschiedenen SPPL2c-Genotypen. Die Anzahl an Nachkommen aus Verpaarungen von Mäusen mit verschiedenen SPPL2c-Genotypen wurde verglichen. Dabei zeigten sich die Zahl der Nachkommen aus Verpaarungen der mSPPL2c^{-/-}-Männchen mit mSPPL2c^{-/-}-Weibchen erniedrigt. Die Anzahl der Nachkommen aus Verpaarungen mit den weiteren SPPL2c-Genotypen zeigte keine signifikante Veränderung. Auf der Y-Achse sind die Genotypen und Geschlechter der Elterngeneration aufgetragen. ** = p-Wert ≤ 0,01. Zur statistischen Analyse wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an (nach Niemeyer, 2019).

3.7.3 Untersuchungen an Spermien aus SPPL2c^{-/-}-Mäusen

Die oben gezeigten Ergebnisse zur Fertilität der SPPL2c-defizienten Mäusen ließen eine qualitative Einschränkung der Spermien vermuten. Daher wurden Übersichtsaufnahmen von einzelnen Spermien beider Genotypen per Phasenkontrastmikroskopie aufgenommen und anschließend verglichen. Hierbei gab es keinen Anhalt für einen morphologischen Defekt der Spermien aus den SPPL2c-defizienten Mäusen, wobei auch hier subtile Veränderungen möglicherweise nicht detektiert wurden (Abbildung 35).

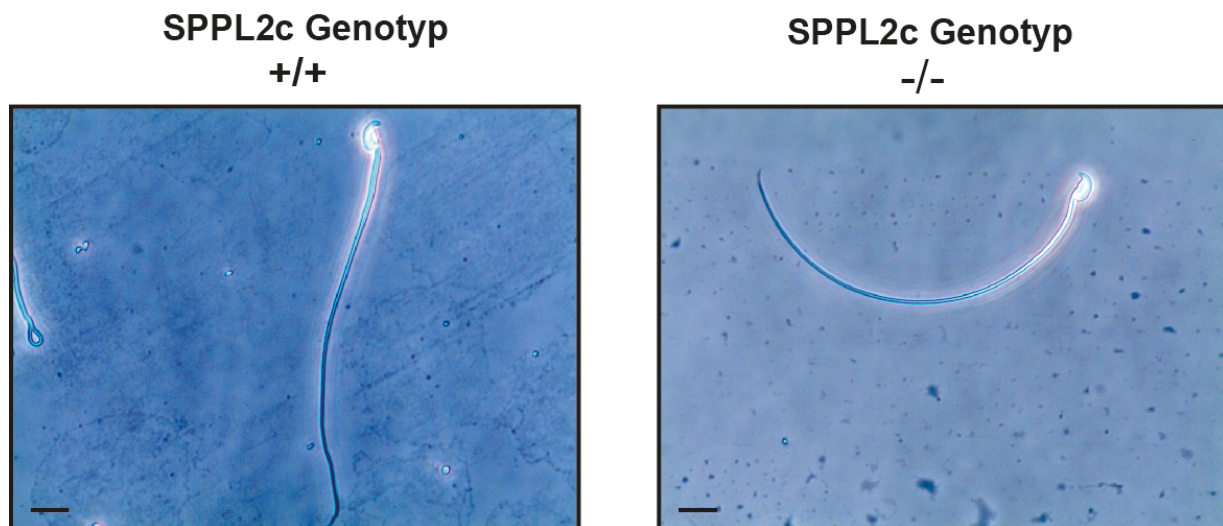


Abbildung 35: Mikroskopische Aufnahme repräsentativer Spermien aus Wildtyp- und SPPL2c-Knockout-Tieren. Mature Spermien wurden durch passives Ausschwimmen für 30 Minuten bei 37°C aus den *Caudae epididymides* von Wildtyp- und SPPL2c-ko-Mäusen gewonnen, vereinzelt und mit Methanol auf Objektträgern fixiert. Die morphologische Analyse erfolgte per Phasenkontrastmikroskopie nach Verblindung der Proben. Dabei zeigten sich morphologisch keine deutlichen Unterschiede zwischen Spermien aus Wildtyp- oder SPPL2c-ko-Tieren, n = 6. Maßstab = 10 µm.

Um Aussagen über verschiedene Qualitätsparameter der Spermien wie der Motilität treffen zu können, wurden in Zusammenarbeit mit der AG Wennemuth (Universität Duisburg-Essen) CASA-Messungen (*Computer assisted sperm analysis*) durchgeführt. Dafür wurden die Bewegungsgeschwindigkeiten einzelner maturer Spermien aus Wildtyp- und SPPL2c^{-/-}-Mäusen untersucht (Abbildung 36). Die Spermien aus den Knockout-Mäusen zeigten sich beweglich, sie wiesen jedoch im Vergleich mit der Spermengruppe aus Wildtypmäusen eine signifikante Verlangsamung in den gemessenen Motilitätsparametern auf.

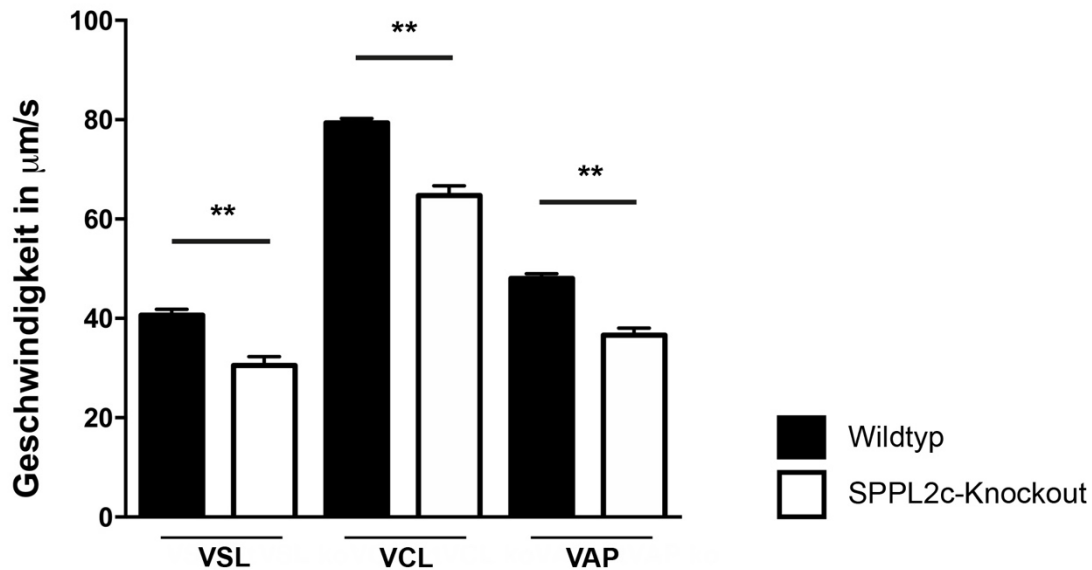


Abbildung 36: Motilitätsmessungen von isolierten Spermien. Spermien aus Nebenhodenschwänzen wurden gewonnen und die Bewegungen von 200 Spermien pro Versuchstier gemessen. Anschließend wurde mittels der CASA-Software von Medical Technology die Bewegungsgeschwindigkeit errechnet und analysiert. Zur statistischen Analyse wurden *student's t-tests* durchgeführt. In den Kästchen an der rechten Abbildungsseite sind die Genotypen der untersuchten Tiere vermerkt. Abkürzungen: VSL = Velocity straight line, VCL = Velocity curvilinear, VAP = Velocity average path. Für eine genaue Erläuterung der einzelnen Parameter siehe 2.2.8, $n = 3$, ** = $p\text{-Wert} \leq 0,01$. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.

Zusätzlich wurden die analysierten Keimzellen noch anhand der WHO-Kriterien zur Qualität von Spermien untersucht und eingeteilt. Dort ließ sich eine Tendenz zur Reduktion der schnellen, linear progressiven Spermien feststellen, der allerdings statistisch nicht signifikant war (siehe Anhang, Abbildung 48).

3.8 Vergleich der Gewebeexpression der anderen SPP/SPPL-Proteasen

3.8.1 SPPL2a und SPPL2b

Um zu prüfen, ob die anderen Mitglieder der SPP/SPPL-Proteasen ebenfalls im Hoden exprimiert werden, wurden analog zu den oben gezeigten Resultaten aus SPPL2a- und SPPL2b-defizienten Mäusen Hodengewebe gewonnen. Die dazugehörigen *Western-Blot*-Analyse zeigte detektierbares SPPL2a- und SPPL2b-Protein in den Wildtyphoden (Abbildung 37).

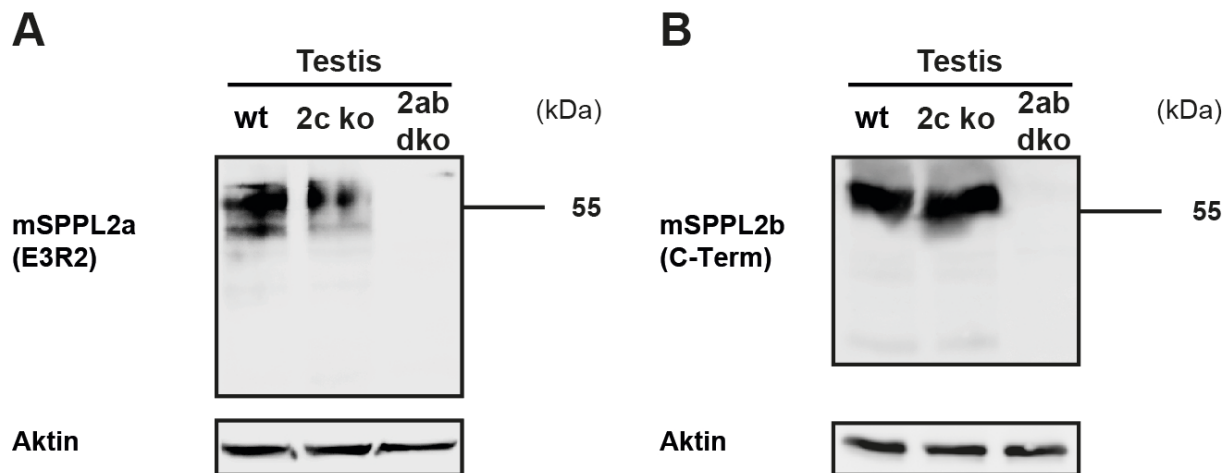


Abbildung 37: Expression von mSPPL2a und mSPPL2b im Testis. Hodentotallysate aus Wildtyp und SPPL2c^{-/-}-Mäusen wurden hergestellt und per *Western Blotting* mittels Antikörper, die gegen Epitope von SPPL2a (A) und SPPL2b (B) gerichtet waren, auf eine Expression von SPPL2a und SPPL2b untersucht. Als Kontrolle für die Antikörperspezifität diente Hodentotallysate aus SPPL2a/SPPL2b *double-knockout*-Mäusen, welches keine spezifische Antikörperbindung zeigte. Aktin wurde als Kontrolle für einen gleichmäßigen Proteinauftrag eingesetzt. Abkürzungen: wt = Wildtyp, ko = Knockout, 2c = SPPL2c, 2abdco = SPPL2a/b-Doppel-Knockout, E3R2 = Epitop-3-Tier-2-Antikörper.

Bei der Analyse von Gewebeschnitten aus mSPPL2a/b-defizienten Mäusen zeigten sich Unsicherheiten bezüglich der Reaktivität der mSPPL2a/b-Antikörper auf Hodengewebeschnitten. Eine sichere Detektion von SPPL2a- und SPPL2b-exprimierenden Zellen in Hodengewebe mittels immunhistochemischen Verfahren wie der DAB-Färbung war daher nicht möglich.

3.8.2 SPP

SPP, als weiteres Mitglied der SPP/SPPL-Proteasen, ist als ER-residentes Protein beschrieben (Lichtenthaler, 2018, Kühnle, 2019). Eine Kompensierung des Ausfalls von SPPL2c durch SPP in den SPPL2c^{-/-}-Mäusen erschien somit denkbar. Aus diesem Grund sollte SPP in Wildtyp- und SPPL2c^{-/-}-Mäusehoden per Immunhistochemie detektiert und hinsichtlich der Lokalisation mit SPPL2c verglichen werden.

Da SPP^{-/-}-Tiere nicht überlebensfähig sind (siehe 1.3.3.2), ist Hodengewebe aus SPP-defizienten Mäusen nicht verfügbar. Es fehlte daher die Möglichkeit, die Spezifität des mSPP-Antikörpers anhand von Gewebematerial aus SPP^{-/-}-Tieren zu verifizieren. Alternativ wurde daher Standard-polyklonales IgG aus Kaninchenserum anstelle des Primärantikörpers eingesetzt. Die immunhistochemische Detektion von mSPP zeigte ein Signal in Zellen, die um die *Tubuli seminiferi* herumgelagert sind und möglicherweise den Leydig-Zellen entsprechen (Abbildung 38). Innerhalb des Tubulusepithels fand sich keine detektierbare Anfärbung von Keim- oder somatischen Zellen, weder in den Wildtyp- noch in den SPPL2c-defizienten Mäusen. Zusammengefasst zeigte sich somit keine nennenswerte Überlappung mit der Verteilung des SPPL2c-Proteins im Hoden. Eine Kompensation des Ausfalls des SPPL2c

durch SPP ist zudem nicht wahrscheinlich, da es auch in den SPPL2c-defizienten Mäusen keine Veränderung der Gewebeexpression von SPP zeigte.

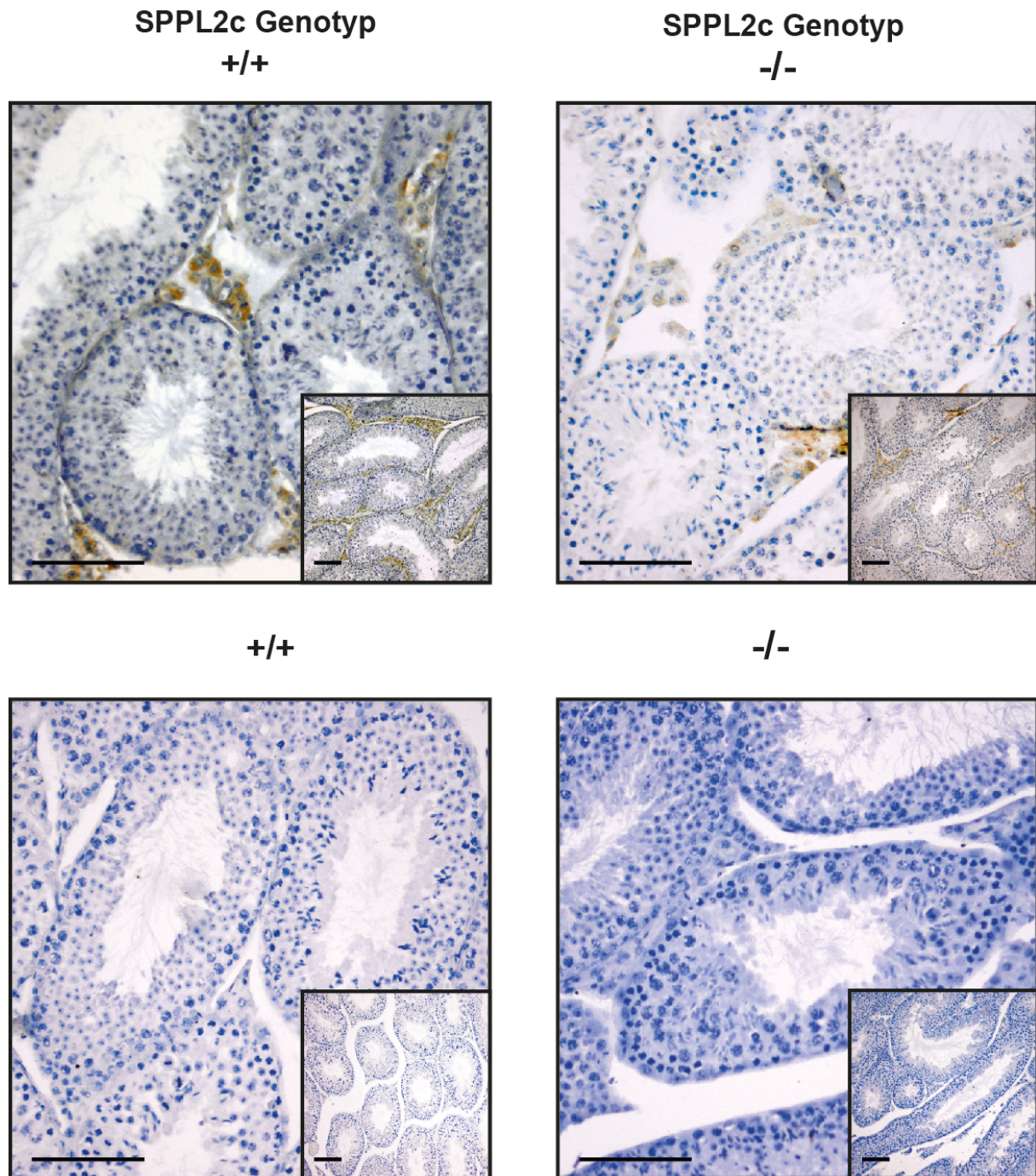


Abbildung 38: Immunhistochemische Detektion der SPP-Protease im Hoden. Mittels Bouin'scher Lösung fixierter Hoden wurde vor der DAB-Färbung einer Antigendemaskierung mit Citrat-Puffer unterzogen. Ein polyklonales SPP-Antiserum wurde als Primärantikörper verwendet (oben). Als Kontrolle für die Spezifität des Antikörpers wurden zusätzlich Färbungen mit einem Standard-polyklonalem IgG-Kaninchenserum durchgeführt (unten). Die rechts unten gezeigten Bilder zeigen Übersichtsaufnahmen. Die Visualisierung der Zellkerne erfolgte mit Hämalaunlösung. Maßstab = 100 µm.

4 Diskussion

Seit die Prinzipien der Regulierten Intramembranproteolyse und I-CLIPS vor 20 Jahren entdeckt und beschrieben wurden, hat sich das Wissen um die zellbiologischen Funktionen dieses Typus an Proteasen in verschiedenen Organsystemen stark vergrößert. Es konnte eine Beteiligung der I-CLIPs an einer Vielzahl von (patho)-physiologischen Vorgängen gezeigt werden (Urban, 2013, Yücel, 2020).

Jedoch ist das Wissen über diese Proteasen noch nicht vollständig. Vor dem Hintergrund einer möglichen klinischen Verwendung von Modulatoren oder Inhibitoren verschiedener Aspartyl-I-CLIPs (Preseniline und SPP/SPPLs-Proteasen) (Velcicky, 2019, van Kempen, 2020) erschien es sinnvoll, eine eingehende Charakterisierung der bisher nur wenig untersuchten Protease SPPL2c vorzunehmen.

4.1 Zellbiologische Charakteristika von SPPL2c

Die bisherigen Publikationen über SPPL2c zeigen, dass SPPL2c unter Überexpressionsbedingungen in Modellzellsystemen im Endoplasmatischen Retikulum exprimiert wird (Friedmann, 2004, Brady, 2014). Dieses konnte, wie in der Abbildung 11 dargestellt, im Rahmen dieser Arbeit für beide Isoformen des Proteins bestätigt werden. Allerdings konnte auch geringe Mengen des Proteins im ERGIC detektiert werden (Abbildung 12). Die geringe Kolo-kalisierung mit dem ERGIC-Markerprotein spricht möglicherweise für einen retrograden Transport von falsch sortiertem SPPL2c-Protein zurück in das ER. Diese Funktion des ERGIC ist beschrieben (Appenzeller-Herzog, 2006).

Die Untersuchung des Glykosylierungsmusters des Proteins zeigte, dass die konjugierten Zuckermoleküle entweder aus Hybrid- oder aus Oligomannose-Glykanen bestehen (Abbildung 14). In der erstbeschreibenden Publikation von Friedmann *et al.* konnte ebenfalls eine Glykosylierung der humanen Form von SPPL2c nachgewiesen werden (Friedmann, 2004). Eine Identifizierung der glykosylierten Aminosäure wurde dort allerdings nicht vorgenommen. Im Rahmen dieser Arbeit sorgte der Austausch des N106 für eine komplette Aufhebung der Glykosylierung, sodass die glykosylierte Aminosäure bestimmt werden konnte (Abbildung 16). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass auch endogenes SPPL2c mit Endoglykosidase-H-sensitiven N-Glykanen modifiziert ist (Abbildung 24) und SPPL2c mit dem ER-Markerprotein PDI in einer subzellulären Fraktionierung aus murinem Hodengewebe kosedimentiert (Abbildung 25). Eine Lokalisierung des Glykoproteins SPPL2c im Endoplasmatischen Retikulum unter endogenen Bedingungen erscheint somit wahrscheinlich.

Eine Möglichkeit, Determinanten der zellulären Sortierung zu identifizieren, die für eine Retention bzw. Relokalisation des SPPL2c-Proteins in das ER sorgen, bietet die Analyse der

Aminosäuresequenz von SPPL2c. In dem C-Terminus der Aminosäuresequenz findet sich ein zytosolisch gelegenes Di-Lysin-Motiv (KKXX) (s. Anhang, Abbildung 40), welches als ER-Retentionssignal anderer Proteine beschrieben ist (Vincent, 1998, Ma, 2013). Mittels chimärer Konstrukte ließe sich die Funktion dieser Aminosäuren für die zelluläre Sortierung des Proteins überprüfen. Eine analoge Untersuchung wurde für C-terminale Tyrosinreste von SPPL2a, die für eine Sortierung zu den späten Endosomen/Lysosomen sorgen, bereits durchgeführt (Behnke, 2011).

4.2 Identifikation möglicher SPPL2c-Substrate/Interaktionspartner

Wie einleitend beschrieben, waren bis zu Beginn dieser Arbeit keine Substrate von SPPL2c bekannt (Mentrup, 2017). Bei der weiteren Untersuchung der Protease konnte jedoch gezeigt werden, dass SPPL2c unter Überexpressionsbedingungen bekannte Substrate der ebenfalls ER-ständigen SPP prozessieren kann (Niemeyer, 2019). Diese Substrate sind – im Gegensatz zu den meisten bekannten Substrate von SPPL2a/b – keine klassischen Typ-II-Transmembranproteine, sondern *Tail-anchored* Proteine wie HO-1 oder RAMP4-2. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Typ-II-Proteine aus der Gruppe der ATF6-ähnlichen Transkriptionsfaktoren zeigten in den durchgeführten Koexpressionsanalysen keine erkennbare Prozessierung durch SPPL2c oder SPP (Abbildung 17 und Anhang 42-45).

Um zusätzliche mögliche Substrate der SPPL2c-Protease zu identifizieren, wurden bei der weiteren Charakterisierung des Proteins zwei verschiedene Ansätze gewählt:

In einem Ansatz wurden HEK-Zellen generiert, die stabil SPPL2c überexprimierten (Papadopoulou, 2019). Diese Zellen wurden eingesetzt, um mittels massenspektrometrischer Verfahren das Proteom angereicherter Membranproteine mit einer Kontrollmembranpräparation zu vergleichen. Dies stellt eine etablierte Methodik zur Identifizierung potenzieller Substrate von Intramembranproteasen dar (Tam, 2004, Voss, 2014, Johnson, 2017). Dabei wurde eine Reihe weiterer möglicher Substrate von SPPL2c identifiziert, unter anderen das *Tail-anchored* Protein Syntaxin 8. In einem anderen Ansatz wurden die Proteome von Membranpräparationen aus Hodenlysaten von Wildtyp- und SPPL2c^{-/-}-Mäusen verglichen (Niemeyer, 2019). Das Outcome beider Ansätze überlappte sich partiell, wobei mittels des Ansatzes aus Organlysaten deutlich weniger mögliche Substrate identifiziert wurden. Mittels beider Methoden wurde Syntaxin 8 als Substratkandidat erfasst. In den SPPL2c^{-/-}-Hoden akkumulierten zusätzlich das *Tail-anchored* Protein Phospholamban (s.u.) und *Disco Interacting Protein 2 Homologue b* (Dip2b), wobei letzteres ein lösliches Protein ohne Transmembrandomäne ist und daher nicht weiter als mögliches Substrat untersucht wurde.

In Koexpressionsstudien konnte anschließend gezeigt werden, dass Proteine aus der SNARE-Proteinfamilie wie Syntaxin 8 und *Vesicle-associated membrane protein 8* (VAMP8) von SPPL2c proteolytisch prozessiert werden können. Diese TA-Proteine sind u.a. an der Membranfusion von intrazellulären Vesikeln und der Exozytose von Vesikeln beteiligt (Wang, 2007, Kasai, 2008, Cornick, 2019). Aufgrund der Eigenschaften der neu identifizierten Substrate scheint es möglich, dass SPPL2c eine Selektivität für die Prozessierung von TA-Proteinen aufweist.

Papadopoulou et al. demonstrierten zudem, dass bei Überexpression von katalytisch aktiver SPPL2c und der Glykosyltransferase N-Acetylglucosaminyltransferase V (GnTV) sich die Maturierung und intrazelluläre Lokalisation dieser Glykosyltransferase verändert. Zusätzlich wurde eine Hypoglykosylierung verschiedener Glykoproteine wie Nicastrin oder LAMP-2 beobachtet. Die Autoren der Studie vermuteten, dass SPPL2c durch eine Prozessierung von verschiedenen Vesikel-assoziierten Proteinen den korrekten Ablauf des vesikulären Transports zwischen ER und Golgi stört. Dies führe zu einer Retention der immaturren Glykosyltransferase innerhalb des ER und resultiere in einer weniger effizienten Proteinglykosylierung (Papadopoulou, 2019).

Zusätzlich zeigten sich in den SPPL2c überexprimierenden HEK-Zellen Unterschiede in der Abundanz verschiedener Glykan-modifizierender Proteine wie Mannosyl-Oligosaccharid 1,2-Alpha-Mannosidase IB (MAN1A2) oder GnTV.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das bei der Regulierung des Glykosylierungsmusters von Keimzellen beteiligte GnT1IP-Protein auf eine Prozessierung durch SPPL2c mittels Koexpression untersucht (Abb. 18). Dort ergab sich keinen Anhalt für eine proteolytische Spaltung dieses Proteins durch SPPL2c. GnT1IP ist in dem *Proteomics*-Screening von Glykan-modifizierenden Proteinen der SPPL2c-überexprimierenden HEK-Zellen nicht aufgeführt und konnte weder vermehrt noch vermindert detektiert werden (Papadopoulou, 2019). Über die intrazellulären Sortierungsmechanismen von GnT1IP ist letztlich wenig bekannt (Huang, 2015). Es scheint daher möglich, dass die Sortierung von GnT1IP unabhängig von den möglicherweise durch SPPL2c prozessierten SNARE-Proteinen stattfindet.

Bei der weiterführenden Untersuchung des SPPL2c-Proteins fanden sich zudem Hinweise, dass das Protein die intrinsische Fähigkeit besitzt, höhermolekulare Komplexe zu formen. Mittels *blue-native*-Gelelektrophorese wurde gezeigt, dass das SPPL2c-Protein in murinen Testes in Proteinkomplexen mit einem Molekulargewicht von etwa 500 kDa vorkommt (Niemeyer, 2019).

Eine Möglichkeit, um zusätzliche Interaktionspartner von SPPL2c zu detektieren, bietet das *Proximity-dependent biotin identification* (BioID)-System. Das BioID-System basiert auf der Aktivität einer mutierten Biotinligase aus dem Genom von *Escherichia coli*, der BirA*. Durch die Mutation erhöht sich die Biotinylierungsaktivität von BirA* stark. Für die Untersuchung wird ein Konstrukt, welches für ein Fusionsprotein aus dem untersuchten Protein, hier: SPPL2c und BirA*, kodiert, hergestellt und exprimiert. Proteine, die sich in einem 10 – 15 nm Radius zu dem Fusionsprotein befinden, werden biotinyliert und anschließend nach Extraktion über einen Streptavidin-Pulldown per Massenspektroskopie identifiziert (Roux, 2013, Roux 2018). Inwieweit sich mit dieser Methode, die ebenfalls auf einer Expression eines Fusionsproteins in Modellzellsystemen basiert, auf die Situation *in vivo* in murinen Testes schließen lässt, ist allerdings noch nicht geklärt.

4.3 SPPL2c im männlichen Geschlechtstrakt

Im Rahmen dieser Arbeit wurde murines Gewebe aus diversen Organen auf eine Expression von SPPL2c untersucht (Abbildung 19 ff.). Dabei wurde eine Expression von SPPL2c sowohl auf der mRNA-Ebene als auch auf der Proteinebene ausschließlich in den männlichen Geschlechtsorganen beobachtet. Friedmann *et al.* konnten in ihren *microarray*-Screeninguntersuchungen von menschlichen Geweben SPPL2c-mRNA zusätzlich in verschiedenen anderen Geweben nachweisen, u. a. im Gehirn, im Herzen, in der Haut und auch im Hoden (Friedmann, 2004). Mehrere Faktoren könnten diese Diskrepanz erklären:

Die publizierten Ergebnisse der *microarray*-Untersuchungen könnten aufgrund technischer Probleme, wie beispielsweise einer Kontamination der cDNA-Proben mit genomischer DNA falsch-positive Daten aufweisen. *Microarrays* sind zudem u.a. aufgrund der Komplexität der statistischen Analyse fehleranfällig (Kroll, 2008, Jaksik, 2015).

Andererseits erscheint es möglich, dass die Sensitivität der eingesetzten Antikörper nicht ausreicht, um nur geringe Mengen des Proteins in den untersuchten Organen zu detektieren. Zum anderen ist es denkbar, dass bestimmte Zelltypen nur unter bestimmten, noch nicht bekannten Bedingungen die Expression von SPPL2c induzieren. Weiter wird SPPL2c möglicherweise in Organen exprimiert, die im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht wurden. Nicht zuletzt wurde von Friedmann *et al.* humanes Gewebe untersucht, während es sich bei den hier untersuchten Organen um murines Gewebe handelt. Inwieweit die gewebespezifischen Expressionsmuster orthologer Gene variieren, ist für ein Großteil der Gene noch nicht geklärt (Dowell, 2011). Zheng-Bradley *et al.* verglichen in einer Metastudie murine und humane Transkriptome, die unter verschiedenen experimentellen Bedingungen generiert wurden (Zheng-Bradley, 2010). Sie fanden einen hohen Grad an Konservierung der gewebespezifischen Expressionsmuster von orthologen Genen. Dies

konnte später von Söllner *et al.* für eine geringere Anzahl verglichener Gene bestätigt werden (Söllner, 2017). Frühere Vergleiche deuteten jedoch eher auf ausgeprägte Unterschiede in den Expressionsprofilen orthologer Gene zwischen Menschen und Mäusen hin (Yanai, 2004). Obwohl die Expression von SPPL2c im Menschen nicht geklärt ist, lässt sich zusammenfassend feststellen, dass SPPL2c nicht, wie von verschiedenen Autoren vermutet (Golde, 2009, Voss, 2013) ein Pseudogen darstellt, sondern *in vivo* in Säugerorganismen wie dem *M. musculus* exprimiert wird.

4.4 SPPL2c – Expression ausschließlich in elongierten Spermatiden?

Innerhalb des Hodens wurde durch die Visualisierung der Aktivität des β -Galaktosidase-Reporters Hinweise auf eine Expression von SPPL2c in den *Tubuli seminiferi* gewonnen (Abbildung 28). Anschließend erfolgte mittels immunhistochemischen Methoden die Validierung dieses Befundes: Es zeigte sich eine Expression von SPPL2c unter basalen Bedingungen in einem spezialisierten Subtyp von Keimzellen, den späten elongierten Spermatiden (Abbildung 29).

Es ist jedoch denkbar, dass aufgrund einer geringen Sensitivität der eingesetzten Antikörper bei der immunhistochemischen Detektion eine Expression der Protease in anderen Zellen der Spermatogenese oder in Nicht-Keimzellen/somatischen Zellen (Sertoli-Zellen, Leydig-Zellen u. a.) nicht möglich war. Eine Möglichkeit, dieses zu überprüfen, wäre es, analog zu Simard *et al.* und Zi *et al.*, die einzelnen Populationen des Hodens mittels eines DNA-bindenden Farbstoffs anfärben und anschließend per FACS-*sorting* nach ihrem jeweiligen DNA-Gehalt zu sortieren. Die gewonnenen Proben könnten nach der Zellyse mittels *Western Blotting* auf eine Expression von SPPL2c überprüft werden (Simard, 2015, Zi, 2017). In der weiteren Untersuchung der Protease wurde diese Methode eingesetzt (Niemeyer, 2019). Dabei ließ sich mSPPL2c-Protein auch in 2C- bzw. 4C-Populationen nachweisen, wobei die Signalintensität in der 1C-Population am ausgeprägtesten war. Dies spräche dafür, dass die Expression in den Vorläuferkeimzellen startet und in den elongierten Spermatiden ein Maximum erreicht. Denkbar wäre jedoch, dass bei dieser Methode eine mögliche Verunreinigung der Proben durch falsch sortierte Zellen stattfand. Für eine ausschließliche Expression von SPPL2c in den elongierten Spermatiden spricht wiederum, dass in humanen Gewebeschnitten aus Hodengewebe mittels eines humanen SPPL2c-Antikörpers das Protein ebenfalls v.a. in elongierten Spermatiden nachweisbar war (Niemeyer, 2019).

Eine weitere, ungleich aufwendigere Methode eine Expression des Proteins zu detektieren, wäre die Methode nach Esakky *et al.* Per Laser-Mikrodissektion (LMD) werden hierbei unter mikroskopischer Kontrolle aus Gewebeschnitten von Hodengewebe, welches vorher mittels

einer HE-Färbung gefärbt wurde, Keimzellpopulationen verschiedener Reifestadien isoliert und anschließend per RT-PCR und qRT-PCR auf die Expression verschiedener Gene untersucht (Esakky, 2013).

Bei der näheren Analyse der einzelnen Teilorgane der männlichen (und weiblichen) Geschlechtsorgane zeigte sich, dass SPPL2c in späten, elongierten Spermatiden exprimiert wird (s.o.). In den Zellen, die aus diesen Spermatiden hervorgehen, den murenen Spermatozoen, fand sich allerdings keine Expression (Abbildung 20). Eine mögliche Erklärung für diesen Umstand könnte die Reorganisation von Form und Inhalt des Zytoplasmas der elongierten Spermatiden sein. Um eine stromlinienförmige Form der Spermien zu erzeugen, werden sämtliche nicht mehr benötigte Zellorganellen wie das Endoplasmatische Retikulum, der Golgi-Apparat, Ribosomen, Lysosomen etc. und überschüssiges Zytoplasma als Residualkörper von den Sertoli-Stützzellen phagozytiert (Brewis, 2010, Franca, 2016). Das Zytoplasma von Spermien besteht daher vor allem aus Mitochondrien zur Generierung von ATP, dem motilen Flagellum mit den Mikrotubuli und dem Akrosom (O'Donnell, 2011). Es scheint daher möglich, dass SPPL2c als ER-ständiges Protein während dieser Umbauprozesse von den Sertoli-Zellen als Teil des Residualkörpers abgebaut wird.

4.5 Mögliche Funktionen von SPPL2c in Spermatiden

Die Analyse der SPPL2c^{-/-}-Mäuse zeigte im Hinblick auf die Zytoarchitektur der Testes eine reduzierte Spermatidenzahl pro Tubulus (Abbildung 33) und eine signifikante Erniedrigung des Quotienten aus Hoden- zu Gesamtgewicht (Abbildung 31). Eine solche Reduktion von eher allgemeinen Maßzahlen ist für eine Vielzahl an Proteinen beschrieben, deren Expression auf den Hoden beschränkt zu sein scheint (O'Donnell, 2014). So sorgt der Knockout von Cystatin 8 aus der Gruppe der Cysteinprotease-Inhibitoren für einen gestörten Aufbau der *Tubuli seminiferi*, einem Verlust von Spermatiden und einer reduzierten Fertilität der Cystatin 8^{-/-}-Mäuse (Parent, 2011). *Family With Sequence Similarity 170 Member A* (FAM170A) ist ein hodenspezifischer Transkriptionsfaktor (Miyata, 2016), der über eine Zinkfingerdomäne an die DNA bindet und für die Aktivierung verschiedener Signalkaskaden wie dem AP-1-Signalweg (*Activator Protein-1*) sorgt (Lei, 2010). FAM170a^{-/-}-Mäuse zeigen ebenfalls pathologisch konfigurierte elongierte Spermatiden und ein Verlust von Spermien im Nebenhodenschwanz (Devlin, 2020).

Die Spermien der SPPL2c^{-/-}-Mäuse wiesen neben dieser moderaten Störung der Spermatogenese signifikant reduzierte Geschwindigkeitsparameter auf (Abbildung 34). Dies deutet auf eine gestörte Bewegung der Spermien der SPPL2c^{-/-}-Tiere hin. Damit Spermien eine erfolgreiche Vorwärtsbewegung erzeugen können, sind im Wesentlichen drei

Hauptfaktoren nötig (du Plessis, 2015, Freitas, 2017). Die Spermien benötigen ein morphologisch intaktes, funktionierendes Flagellum. Sie müssen zusätzlich in der Lage sein, chemische Energie in Form von ATP zu produzieren, um die axonemalen Dynein-ATPasen anzutreiben. Das ATP wird durch die zahlreichen Mitochondrien im Mittelstück der Spermien erzeugt. Da Spermatozoen transkriptionell inaktive Zellen sind, muss zudem die Funktionalität verschiedenster Signalwege innerhalb des Spermiums gegeben sein (Koch, 2015).

Da SPPL2c, wie oben beschrieben, in murenen Spermien nicht nachzuweisen ist, scheint es wenig wahrscheinlich, dass das Protein selber ein Bestandteil des Spermienflagellums ist. Bei der histologischen Untersuchung einzelner Spermien zeigten sich zudem keine morphologischen Auffälligkeiten an der Spermiengeißel (Abbildung 35). Nach den oben dargestellten Ergebnissen wird SPPL2c im ER exprimiert und nicht in Mitochondrien, ist demnach eher nicht an der Erzeugung von ATP beteiligt. Denkbar ist daher eine Beteiligung des Proteins in verschiedenen Signaltransduktionskaskaden von Spermien:

Spermatozoa, die vom Tubulusepithel abgelöst sind, sind noch unbeweglich und erlangen ihre Bewegungsfähigkeit erst im Nebenhoden (Cornwall, 2009): Eine wichtige Signalkaskade in diesem Zusammenhang stellt die Regulierung der Aktivität der Phosphoprotein-Phosphatase-1 (PPP-1) dar. Obwohl die genauen Mechanismen nicht im Detail bekannt sind, führt die Aktivität von PPP-1 zu einer verstärkten Dephosphorylierung von phosphorylierten Serin- und Threoninresten verschiedener Zielenzyme, die für eine Abnahme der Beweglichkeit von Spermien sorgen (Smith, 1999, Freitas, 2017). Ein zentraler Regulator der PPP-1-Aktivität in Spermien ist die Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK-3). Die GSK-3 inhibiert über die Phosphorylierung des regulatorischen Proteins Proteinphosphatase Inhibitor 2 (PPP1R2) die Interaktion zwischen PPP1R2 und PPP-1. Somit wird PPP-1 vermehrt aktiviert und sorgt damit für eine verminderte Bewegungsfähigkeit der Spermien (Somanath, 2004, Koch, 2015).

Eine Möglichkeit, eine Beteiligung von SPPL2c bei diesen Signalwegen zu überprüfen, ist, Spermienlysate aus Wildtyp und SPPL2c^{-/-}-Mäusen auf eine veränderte Phosphorylierung von kritischen Threonin- bzw. Serinresten von PPP1R2 und GSK-3 per *Western Blot* zu untersuchen.

Andere Modulatoren der Bewegungsgeschwindigkeit der Spermien sind verschiedene *second messenger* wie cAMP, das in Spermien u. a. durch lösliche Adenylylcyclasen (sAC) synthetisiert wird. Eine erhöhte intrazelluläre cAMP-Konzentration führt über verschiedene Signalwege zu einer Erhöhung der Motilität der Spermienflagellen (Freitas, 2017). Die Aktivität der Adenylylcyclasen wird u. a. durch die Konzentration an Ca²⁺-Ionen reguliert (Darszon, 2011): Eine geringe intrazelluläre Konzentration an Ca²⁺-Ionen korreliert mit der Basismotilität menschlichen Spermien im Nebenhodenschwanz. Im weiblichen Genitaltrakt steigt die Geschwindigkeit der Spermien u. a. durch den Influx von Ca²⁺-Ionen stark an (Rahman, 2014). Als Reservoir der Ca²⁺-Ionen innerhalb der Spermien werden – neben der

Extrazellulärflüssigkeit – u. a. die Kernmembran und das Akrosom vermutet (Costello, 2009). Mögliche Regulatoren der intrazellulären Calciumkonzentration sind die *Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase* (SERCA)-Pumpen und SERCA-ähnlichen *Secretory pathway Ca²⁺-ATPase* (SPCA), die in menschlichen Spermien nachgewiesen werden konnten (Harper, 2005, Lawson, 2007).

In der weiterführenden Untersuchung der Protease konnte mittels *Proteomics*-basierten Untersuchungen gezeigt werden, dass u.a. das *Tail-anchored* Protein Phospholamban in den Testes der SPPL2c^{-/-}-Mäuse akkumuliert (s.o.) (Niemeyer, 2019).

Phospholamban ist als einer der Hauptregulatoren der SERCA-Aktivität in Kardiomyozyten bekannt (Hagemann, 2012). Es wurde gezeigt, dass SPPL2c unter Überexpressionsbedingungen Phospholamban proteolytisch prozessiert und in den Hoden der SPPL2c^{-/-}-Mäusen per *Western Blotting* vermehrt detektierbar ist (Niemeyer, 2019). Zusätzlich ließ sich per Durchflusszytometrie mittels einer fluoreszenten Calciumsonde eine Verringerung der intrazellulären Calciumkonzentration in den SPPL2c-defizienten Spermatiden nachweisen. Es ist daher möglich, dass sich die reduzierte Motilität der Spermien aus SPPL2c^{-/-}-Mäusen aufgrund einer Akkumulation von Phospholamban mit konsekutiv veränderter Calcium-Homöostase erklären lässt.

Neben dieser Reduktion der Fortbewegungsgeschwindigkeiten ergab die Analyse der Fertilität aus Verpaarungen von SPPL2c^{-/-}-Männchen mit -Weibchen eine signifikante Reduktion der Anzahl an Nachkommen (Abbildung 34). Diese Subfertilität der Knockout-Mäuse deutet auf eine nicht-redundante Funktion des Proteins während der Spermatogenese hin. Interessanterweise war die Anzahl der Nachkommen aus Verpaarungen von SPPL2c-Knockout-Männchen mit Wildtyp-Weibchen ähnlich wie die aus Wildtyp-Verpaarungen. Insofern muss die Subfertilität relativiert werden, da sie nur manifest wird, wenn beide Partnertiere die Protease nicht exprimieren können. Dieser Umstand deutet auf eine mögliche Expression von SPPL2c im weiblichen Genitaltrakt hin. Bei der Analyse des Ovars und des Uterus konnte dort keine Expression, weder auf mRNA- noch auf Proteinebene (Abbildungen 20 und 23) beobachtet werden. Es ist allerdings denkbar, dass SPPL2c in diesen oder anderen, nicht untersuchten Organen nur in wenigen Zellen exprimiert und daher die Sensitivität der eingesetzten Methoden nicht ausreicht, um es zu detektieren. Eine Detektion von SPPL2c in weiblichen Keimzellen wird zudem dadurch erschwert, dass im Vergleich zum männlichen Keimepithel nur wenige Oozyten und ihre Vorläufer gleichzeitig reifen (Virant-Klun, 2016).

Aufgrund der Komplexität der Spermatogenese und der Befruchtung werden eine Vielzahl von Genen mit einer verminderten oder komplett aufgehobenen Fruchtbarkeit des Mannes

assoziiert (Krausz, 2018). Ätiologisch teilt man die vom Manne ausgehende Infertilität in die vier Kategorien quantitative Defekte der Spermatogenese, qualitative Defekte der Spermatogenese, Störungen der Hypothalamus-Hypophysen-Achse und Verlegung der Ausführungsgänge ein (Tournaye, 2017). Der beobachtete Phänotyp der SPPL2c^{-/-}-Mäuse entspräche somit am ehesten quantitativen und qualitativen Defekten der Spermatogenese. Zusätzlich zu der reduzierten Motilität der Spermien aus SPPL2c^{-/-}-Tieren und der verringerten Anzahl an Spermatiden pro Tubulus könnten weitere Faktoren zu einer funktionellen Störung der Keimzellen führen:

Bei der massenspektrometrischen Untersuchung der SPPL2c^{-/-}-Mäuse akkumulierten neben Phospholamban das SNARE-Protein Syntaxin 8 und das noch gering charakterisierte Protein lösliche Protein Dip2b (Niemeyer, 2019). Aufgrund der örtlichen und zeitlichen Restriktion der Expression des SPPL2c-Proteins (s.o.) erscheint es allerdings möglich, dass das Fehlen der Protease in den Knockout-Mäusen zu keiner ausreichenden Akkumulation von weiteren Substraten führt und diese daher nicht per Massenspektrometrie nachweisbar waren.

Inwieweit die Akkumulation von Syntaxin 8 für den Phänotyp der SPPL2c^{-/-}-Mäuse mitverantwortlich ist, ist noch nicht vollständig geklärt. Erste Hinweise fanden sich bei der histologischen Analyse von Hodenschnitten von Wildtyp- und SPPL2c^{-/-}-Mäuse. Dort zeigten sich Formierungsstörungen des Akrosoms, das u.a. aus dem Golgi-Apparat hervorgeht (Berruti, 2011, Papadopoulou, 2019). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Spermien aus den SPPL2c^{-/-}-Mäusen Veränderungen von Lektin-bindenden Glykoproteinen aufweisen, die u.a. im Akrosom vorkommen und für den Erhalt der Fertilität notwendig sind (Benoff, 1997, Pang, 2011). Die Autoren der Studie vermuteten daher, dass SPPL2c durch eine Prozessierung von SNARE-Proteinen an der Formierung des Akrosoms beteiligt ist.

Eine direkte Beteiligung von Syntaxin 8 im Rahmen der Spermatogenese wurde zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht untersucht. Allerdings verursacht die Mutation eines weiteren Mitgliedes der Syntaxin-Familie, Syntaxin 2, eine nonobstruktive Azoospermie, ein komplettes Fehlen von Spermien im Ejakulat (Nakamura, 2018). Der Grund hierfür ist wahrscheinlich ein Reifungsarrest von Spermatozyten, der durch Pathologien der Interzellularbrücken aufgrund einer Fehllokalisierung von Sulfoglykolipiden bedingt ist (Fujiwara, 2013). Um genauere Einblicke über die Rolle von Syntaxin 8 während der Formierung des Akrosoms zu erhalten, ließe sich dieses Protein mittels Immungoldfärbung per Transmissionselektronenmikroskopie in Wildtyp- und SPPL2c-defizienten Mäusen detektieren (Zakrzewski, 2017).

Erste Versuche, die Spermatogenese *in vitro* mittels künstlich generierten Tubuliorganoiden zu untersuchen, wurden bereits unternommen, sind aufgrund der Komplexität der Feinarchitektur der *Tubuli seminiferi* und ihres Mikromilieus aber noch nicht etabliert (Sousa, 2002, Alves-Lopes, 2017).

Wie in der Einleitung dargestellt, findet sich bei dem 17q21.31-Mikrodeletionssyndrom (auch als Koolen-De-Vries-Syndrom bekannt) u.a. eine Deletion des SPPL2c-Gens. Neben diversen anderen Pathologien wie Herzfehlern, epileptischen Anfällen und urologischen Fehlbildungen gibt es Berichte über eine reduzierte Fruchtbarkeit von erkrankten Personen (Rezaei, 2018). Es ist daher denkbar, dass die fehlende Expression von SPPL2c für diesen Phänotyp verantwortlich ist. Um diese Hypothese zu verfolgen, ließe sich mittels CASA-Messungen die Qualität der Spermien der Patienten mit den hier gezeigten Bewegungsdefekten vergleichen. Zusätzlich ließe sich Hodenbiopsien bei den Patienten entnehmen, um mögliche Ursachen der verringerten Fertilität zu eruieren.

4.6 Vergleich von SPPL2c mit anderen SPP/SPPL2-Proteasen

Die im Rahmen dieser Arbeit festgestellte restriktive Expression von SPPL2c in einer Subpopulation von Keimzellen steht in einem starken Kontrast zu der eher ubiquitären Expression der anderen Mitglieder der SPPL2-Proteasen, SPPL2a und SPPL2b (Schneppenheim, 2014a). Basierend auf den Phänotypen der SPPL2a/b-defizienten Mäuse konnte gezeigt werden, dass diese Proteasen vor allem in Zellen der erworbenen Immunität relevant sind, eine Expression in den männlichen Geschlechtsorganen ist bisher nicht beschrieben (Mentrup, 2017). Durch die hier dargestellte Analyse von SPPL2c konnte die Bedeutung der SPP/SPPL-Proteasen *in vivo* um ein weiteres Organsystem erweitert werden. Wie unter Abbildung 37 gezeigt, ließ sich per *Western Blotting* von Hodentotallysaten ebenfalls SPPL2a und SPPL2b im Hoden detektieren. Hinweise auf die Funktionen von SPPL2a/b im Hoden würde die Untersuchung möglicher Phänotypen in den Testes der jeweiligen Knockout-Mäusen bringen. Interessanterweise können scheinbar weder SPPL2a noch SPPL2b den Knockout von SPPL2c kompensieren. Als mögliche Erklärung dafür kann der Umstand dienen, dass diese beiden Proteasen nicht im ER lokalisiert sind, sondern im Lysosom/späten Endosom bzw. der Plasmamembran (Behnke, 2011). Inwieweit zwischen den Proteasen eine funktionelle Redundanz besteht, wäre daher ein mögliches Thema einer weiteren Untersuchung:

Um eine mögliche Hochregulierung von SPPL2a/b in der SPPL2c^{-/-}-Maus zu prüfen, ließen sich die beiden Proteasen aus einer größeren Anzahl von Wildtyp- und SPPL2c^{-/-}-Hodentotalysaten per *Western Blotting* detektieren und die Detektionslevel mit einem konstitutiv exprimierten Protein wie Aktin vergleichen. Weitere Hinweise auf eine mögliche Kompensation des SPPL2c-Ausfalls durch andere Mitglieder der SPPL2-Proteasen würde die Analyse einer SPPL2a/b/c-*triple-knockout*-Maus bieten: Falls SPPL2a oder SPPL2b die Eigenschaften von SPPL2c in der SPPL2c^{-/-}-Maus (teil-)kompensieren können, müsste sich bei dem Verlust dieser Proteasen ein anderer Phänotyp zeigen als in den SPPL2c^{-/-}-Mäusen.

Eine histochemische Untersuchung der Testes von SPPL2a/b-defizienten Mäusen könnte zudem wichtige Hinweise auf den exprimierenden Zelltyp liefern (s.o.). Dafür könnte analog zu den hier gezeigten Experimenten die Aktivität des β -Galaktosidase-Reporters in SPPL2b-defizienten Mäusen dargestellt werden (Schneppenheim, 2014a).

Über die Funktionen von SPPL2a und SPPL2b während der Spermatogenese lässt sich nur spekulieren, da SPPL2a/b-*single-knockout* und SPPL2a/b-*double-knockout*-Mäusen sich zwar fortpflanzen können aber noch nicht auf eine mögliche Subfertilität untersucht wurden. (Voss, 2013, Schneppenheim, 2014a, Mentrup, 2020). Verschiedene *in vitro* Substrate beider Proteasen ließen sich im Hoden nachweisen, wie der TfR in den Sertoli-Zellen (Kissel, 1998), ITM2b in adluminalen Zellen und Spermatogonien (Rengaraj, 2008) sowie Neuregulin Typ III in Leydig-Zellen, die mit Luteinisierendem Hormon (LH) oder humanem Choriogonadotropin (hCG) stimuliert wurden (Umehara, 2016). Inwieweit hier eine Prozessierung dieser Proteine durch SPPL2a oder SPPL2b *in vivo* stattfindet, ist allerdings noch unklar.

Dass verschiedene Mitglieder einer Proteasenfamilie in unterschiedlichen Zelltypen mit verschiedenen subzellulären Lokalisationen während der Spermatogenese exprimiert werden, ist auch für weitere Proteasen beschrieben: Für die drei Serinproteasen Tessp-2 (*Testis-specific serine protease*), Tessp-3 und Tessp-4 konnte gezeigt werden, dass sie sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene während der Spermatogenese in verschiedenen Zellen exprimiert werden (Yoneda, 2013).

Neben SPPL2c ist SPP als ein weiteres ER-ständiges Mitglied dieser Proteasenfamilie beschrieben (Voss, 2013, Kronenberg-Versteeg, 2018). Es ist aufgrund dieser Konstellation denkbar, dass SPP den Ausfall von SPPL2c kompensieren könnte und die Proteasen eine funktionelle Redundanz aufweisen. Es zeigten sich jedoch bereits in Modellzellsystemen Unterschiede der Eigenschaften dieser Proteasen: So konnten Papadopoulou et al. darstellen, dass bei längerer ektopter Expression von SPPL2c in HEK-Zellen der intrazelluläre Vesikeltransport und die Morphologie des Golgi-Apparates beeinträchtigt sind (s. 4.2). Eine längere Überexpression von katalytisch aktiver SPP resultiert dagegen in der Formierung von ER-Clustern, wahrscheinlich aufgrund einer Suppression von ER-Mikrotubuli-Interaktionen (Avci, 2019). Zudem bilden SPP und SPPL2c innerhalb der ER-Membran Proteinkomplexe unterschiedlicher molekularer Größen und sind somit wahrscheinlich nicht Teil des gleichen Proteinkomplexes. Für eine gewisse funktionelle Überlappung der Proteasen spricht jedoch, dass verschiedene SPP-Substrate auch durch SPPL2c prozessiert werden können (Niemeyer, 2019).

Da SPP^{-/-}-Mäuse nicht lebensfähig sind (Aizawa, 2016, Mentrup, 2020), erfolgte die Untersuchung der Lokalisation von SPP in Wildtyp- und SPPL2c^{-/-}-Mäusen. Nach den unter Abbildung 38 gezeigten immunhistochemischen Untersuchungen wird SPP *in vivo* allerdings in anderen Zelltypen als den Spermatiden exprimiert, wahrscheinlich in den Leydig-Zellen. In

den SPPL2c^{-/-}-Mäusen ließ sich SPP ebenfalls nicht innerhalb der *Tubuli seminiferi* detektieren. Aufgrund einer mangelnden Sensitivität der eingesetzten Antikörper ist es allerdings möglich, dass eine schwache Expression von SPP in den Keimzellen übersehen wurde. Problematisch ist zudem, dass bei der Untersuchung die Kontrolle der Spezifität des SPP-Antikörpers nur bedingt gegeben war.

Letztendlich deutet der manifeste Phänotyp der SPPL2c^{-/-}-Mäuse nicht darauf hin, dass SPP den Knockout von SPPL2c kompensiert. Für diese These spricht zudem der Umstand, dass sich bei der Quantifizierung der SPP-mRNA in SPPL2c^{-/-}-Mäusen mittels qRT-PCR keine Unterschiede zu den Wildtypmäusen feststellen ließen (Niemeyer, 2019). Eine fehlende Hochregulation schließt eine Überlappung der Funktionen der beiden Proteasen allerdings nicht sicher aus.

Um die Bedeutung von SPP innerhalb der männlichen Geschlechtsorgane weiter zu untersuchen, könnte man – aufgrund der embryonalen Letalität der SPP^{-/-}-Mäuse – auf konditionelle Genknockoutmodelle zurückgreifen.

Die Bedeutung der SPP/SPPL-Proteasen für die Spermatogenese wird zusätzlich durch den Umstand bestärkt, dass SPPL3-defiziente männliche Mäuse aus noch ungeklärten Gründen unfruchtbar sind (Tang, 2010). Auch hier könnte eine weiterführende Untersuchung zur Klärung dieses Phänotyps beitragen.

4.7 Regulierte Intramembranproteolyse in der Spermatogenese

Neben SPPL2c wurde für eine Vielzahl weiterer Proteasen verschiedene Funktionen während der Spermatogenese festgestellt (Le Magueresse-Battistoni, 2007, Moreno, 2011, Cho, 2012). Die Gesamtanzahl aller im Hoden exprimierten Proteasen wird auf bis zu 300 geschätzt (Kappelhoff, 2017). Trotzdem konnte bislang nur für wenige I-CLIPs eine Beteiligung an der Spermatogenese beobachtet werden. Ein prominentes Beispiel ist der γ -Sekretase-Komplex mit der katalytisch aktiven Untereinheit, dem SPP/SPPL-Homologen Presenilin-1, dessen Expression in Sertoli-Zellen und Spermatogonien in den Testes neugeborener Mäuse gezeigt werden konnte (Dirami, 2001):

Eine mögliche Funktion der γ -Sekretase während der Spermatogenese ist die Prozessierung des aktivierten Notch-Rezeptors. Der Notch-Rezeptor und verschiedene Liganden wie Jagged1 und Dll4 (*Delta-like 4*) werden in unterschiedlichen Keimzellenpopulationen des Hodens exprimiert (Murta, 2014). Eine *in vivo* Blockierung der Presenilinaktivität mit DAPT, welches *in vitro* auch die Aktivität der SPPL2c-Protease hemmt (Mentrup, 2020), sorgte für eine stark gestörte Spermatogenese mit einer hohen Anzahl von Spermien mit irregulärer Form, einer erhöhten Apoptoserate innerhalb der Keimzellen der *Tubuli seminiferi* sowie einer gestörten Differenzierung von Spermatiden (Murta, 2014).

Neben den Presenilinen ist auch ein Mitglied der Rhomboid-Intramembranproteasen, RHBD1, im menschlichen und murinen Hoden exprimiert (Wang, 2008). Die Funktionen dieser Serinprotease im Rahmen der Spermatogenese ist allerdings noch weitestgehend unklar. *In vitro* Studien deuten auf eine mögliche Involvierung bei der BIK/Bcl2-vermittelten Apoptose hin (Wang, 2009).

In der Zusammenschau sind RIP-abhängige Prozesse während der Spermatogenese allerdings noch weitestgehend unerforscht. Schwierigkeiten bei der Untersuchung dieser Vorgänge resultieren aus dem Umstand, dass die Keimzellen während ihrer Reifung eine ausgeprägte Kompaktierung und Differenzierung durchlaufen und sie in einem komplexen Zusammenhang mit den somatischen Zellen des Tubulusepithels stehen.

4.8 Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte erstmalige Charakterisierung der Intramembranprotease SPPL2c ist nur ein Baustein zur weiteren Analyse dieses Proteins. Von besonderem Interesse wäre eine nähere Analyse der Interaktion mit den jüngst identifizierten, physiologischen Substraten Syntaxin 8 und Phospholamban. Mittels immunhistologischer Methoden wäre es möglich, eine Expression von Syntaxin 8 in den elongierten Spermatiden zu prüfen. Durch ortsspezifische Mutagenese-Untersuchungen wie einem Alanin-Scan ließen sich die für die Proteolyse kritische Aminosäuren innerhalb des Syntaxin-8-Proteins identifizieren. Es bleibt zudem zu untersuchen, ob externe Stimuli wie beispielsweise eine Calciumzufuhr die Expression von SPPL2c und Phospholamban in Modellzellen induzieren können.

Aus den publizierten Daten geht zudem hervor, dass SPPL2c Komplexe mit anderen, unbekannten Proteinen bildet (Niemeyer, 2019). Zur Identifizierung dieser Proteine ließe sich neben dem präsentierten BioID-System auf etablierte Methoden wie der TAP (*Tandem Affinity Purification*) zurückgreifen.

Einer Klärung bedürfen auch die Hinweise einer möglichen Expression von SPPL2c im weiblichen Reproduktionstrakt. Neben histologischen Untersuchungen an den weiblichen Follikeln ließen sich durch ein Zusammenführen mehrerer Ovarien mit anschließender Untersuchung per *Western Blotting* die Menge an detektierbaren Proteinen deutlich erhöhen.

Es konnte gezeigt werden, dass die SPP/SPPL-Proteasen in einer Vielzahl von wichtigen biochemischen Prozessen wie dem Vesikeltransport oder der Proteinglykosylierung involviert sind. Um weitere Details hinsichtlich der Orchestrierung der Aktivität der SPPL2-Proteasen in den Testes zu erhalten, könnten zukünftige Untersuchungen nebst histologischen Analysen

auch Promotoranalysen der jeweiligen Gene beinhalten. Schließlich bleibt zu untersuchen, ob der Einsatz von neuen SPPL2a-Inhibitoren wie SPL-410 die Aktivität von SPPL2c modulieren. Zusammenfassend zeigt das komplexe Wechselspiel zwischen Synthese, Funktion und Degradierung innerhalb verschiedenster Organsysteme die Vielfalt dieser faszinierenden Gruppe von Proteinen.

5 Zusammenfassung

Proteasen sind aufgrund ihrer regulatorischen und degradierenden Funktionen Schlüsselenzyme einer Vielzahl von zellbiologischen Prozessen. Intramembranproteasen prozessieren ihre Substrate innerhalb deren hydrophober Transmembrandomäne. Die Proteinfamilie der Aspartyl-Intramembranproteasen besteht aus den Presenilinen, der *Signal Peptide Peptidase* (SPP) sowie ihrer vier Homologen, *Signal Peptide Peptidase-like 2a-c* und SPPL3. Die SPPL2-Proteasen sind u.a. für die Maturierung von B-Zellen und dendritischen Zellen *in vivo* beteiligt. Zudem sind sie in die Prozessierung eines proatherogenen endothelialen Rezeptors involviert.

SPPL2c (*Signal Peptide Peptidase Like 2c*) ist ein nur gering charakterisiertes Protein, dessen Gen aufgrund seiner intronlosen und SNP-reichen Struktur als ein mögliches Pseudogen angesehen wurde. Ziel dieser Arbeit war es, grundlegende zellbiologische Eigenschaften des Proteins und dessen mögliche Gewebeexpression zu untersuchen sowie eine Phänotypisierung der SPPL2c-defizienten Maus vorzunehmen.

Bei heterologer Überexpression zeigte sich eine Lokalisation des SPPL2c-Proteins im Endoplasmatischen Retikulum. Mittels ortsspezifischer Mutagenese wurde eine N-Glykosylierung des Proteins an N106 nachgewiesen. Für die Analyse einer proteolytischen Prozessierung möglicher Substrate wurde ein Ko-Expressionssystem in Modellzellen eingesetzt. Als Substratkandidaten wurden u.a. ER-ständige Typ-II-Transmembranproteine, die bei einer Ansammlung fehlgefalteter Proteine vermehrt exprimiert werden, untersucht. Bei den untersuchten Proteinen ergaben sich jedoch keine Hinweise auf eine Prozessierung durch die Protease SPPL2c.

Bei *Western-Blotting*-Analysen der Hauptorgansysteme von Mäusen wurde das SPPL2c-Protein ausschließlich im murinen Testis nachgewiesen. Mittels RT-PCR wurde diese limitierte Expression bestätigt, wobei sich im weiblichen Reproduktionstrakt keine Expression des SPPL2c-Gens fand. Unter Zuhilfenahme eines β -Galaktosidase-Reportersystems wurden Hinweise auf eine Expression von SPPL2c innerhalb der *Tubuli seminiferi*, des Keimepithels, gewonnen. Durch immunhistochemische Verfahren konnte das SPPL2c-Protein in Vorläuferzellen der Spermatozoa, den elongierten Spermatiden, detektiert werden.

Phänotypisch hatte das Fehlen des SPPL2c-Proteins eher milde Auswirkungen auf den murinen Organismus: Reduziert waren u.a. die Zahl der elongierter Spermatiden pro Tubulus sowie das Hodengewicht im Verhältnis zum Gesamtgewicht. Zusätzlich war die Motilität der muren Spermien vermindert. Funktionell deutet dies auf eine mögliche Involvierung des SPPL2c-Proteins bei der Bewegungserzeugung der Spermien hin. Die Defizienz des SPPL2c-Proteins sorgte zudem für eine moderate Fertilitätseinschränkung der Tiere; die Zahl der Nachkommen aus Verpaarungen von SPPL2c^{-/-}-Männchen mit SPPL2c^{-/-}-Weibchen war im Vergleich zu den Wildtypverpaarungen reduziert.

Neben SPPL2c wurden, abgesehen von SPPL3, auch die anderen Mitglieder der SPPL-Familie im Hoden detektiert. Die genaue Lokalisation dieser Proteine innerhalb des Testis konnte jedoch nicht sicher dargestellt werden. Eine mögliche Kompensation des Ausfalls von SPPL2c durch die ebenfalls ER-ständige SPP erschien indes unwahrscheinlich, da diese Protease sowohl in Wildtyp- als auch in SPPL2c^{-/-}-Mäusen nicht innerhalb der *Tubuli seminiferi* detektiert wurde.

Zusammenfassend konnte mit dieser Charakterisierung des SPPL2c-Proteins die physiologische Bedeutung der SPPL2-Proteasen um den männlichen Reproduktionstrakt erweitert werden. Zukünftige Studien könnten die Interaktion von SPPL2c mit den Proteinen Phospholamban und Syntaxin 8 im Hinblick auf der Spermatogenese näher untersuchen. Diese *Tail-anchored* Proteine wurden bei der weiteren Untersuchung der SPPL2c-defizienten Maus als physiologische Substrate der Protease identifiziert. Zudem ließen sich mittels Promotoranalysen Faktoren identifizieren, die eine Expression des SPPL2c-Gens induzieren können. Schließlich könnte die Generierung und Analyse einer SPPL2a/b/c-defizienten Maus weitere Hinweise auf die (patho-)physiologischen Funktionen dieser Proteasen im Rahmen der männlichen Reproduktion liefern.

6 Literaturverzeichnis

6.1 Aus Zeitschriften

Aizawa, S., Okamoto, T., Sugiyama, Y., Kouwaki, T., Ito, A., Suzuki, T., Ono, C., Fukuhara, T., Yamamoto, M., Okochi, M., Hiraga, N., Imamura, M., Chayama, K., Suzuki, R., Shoji, I., Moriishi, K., Moriya, K., Koike, K., Matsuura, Y. (2016). TRC8-dependent degradation of hepatitis C virus immature core protein regulates viral propagation and pathogenesis Nat Commun 7: 11379.

Alves-Lopes, J., Soder, O., Stukenborg, J. (2017). Testicular organoid generation by a novel in vitro three-layer gradient system Biomaterials 130: 76-89.

Appenzeller-Herzog, C., Hauri, H. (2006). The ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC): in search of its identity and function J Cell Sci 119: 2173-2183.

Asada, R., Kanemoto, S., Kondo, S., Saito, A., Imaizumi, K. (2011). The signalling from endoplasmic reticulum-resident bZIP transcription factors involved in diverse cellular physiology J Biochem 149(5): 507-518.

Auclair, S., Bhanu, M., Kendall, D. (2012). Signal peptidase I: cleaving the way to mature proteins Protein Sci 21(1): 13-25.

Avci, D., Malchus, N., Heidasch, R., Lorenz, H., Richter, K., Nessling, M., Lemberg, M. (2019). The intramembrane protease SPP impacts morphology of the endoplasmic reticulum by triggering degradation of morphogenic proteins J Biol Chem 294(8): 2786-2800.

Batista, F., Lu, L., Williams, S., Stanley, P. (2012). Complex N-glycans are essential, but core 1 and 2 mucin O-glycans, O-fucose glycans, and NOTCH1 are dispensable, for mammalian spermatogenesis Biol Reprod 86(6): 179.

Beel, A., Sanders, C. (2008). Substrate specificity of gamma-secretase and other intramembrane proteases Cell Mol Life Sci 65(9): 1311-1334.

Beers, C., Burich, A., Kleijmeer, M., Griffith, J., Wong, P., Rudensky, A. (2005). Cathepsin S controls MHC class II-mediated antigen presentation by epithelial cells in vivo J Immunol 174(3): 1205-1212.

Behnke, J., Schneppenheim, J., Koch-Nolte, F., Haag, F., Saftig, P., Schroder, B. (2011). Signal-peptide-peptidase-like 2a (SPPL2a) is targeted to lysosomes/late endosomes by a tyrosine motif in its C-terminal tail FEBS Lett 585(19): 2951-2957.

Beisner, D., Langerak, P., Parker, A., Dahlberg, C., Otero, F., Sutton, S., Poirot, L., Barnes, W., Young, M., Niessen, S., Wiltshire, T., Bodendorf, U., Martoglio, B., Cravatt, B., Cooke, M. (2013). The intramembrane protease Sppl2a is required for B cell and DC development and survival via cleavage of the invariant chain J Exp Med 210(1): 23-30.

Benoff, S. (1997). Carbohydrates and fertilization: an overview Mol Hum Reprod 3(7): 599-637.

Bergmann, H., Yabas, M., Short, A., Miosge, L., Barthel, N., Teh, C., Roots, C., Bull, K., Jeelall, Y., Horikawa, K., Whittle, B., Balakishnan, B., Sjollem, G., Bertram, E., Mackay, F., Rimmer, A., Cornall, R., Field, M., Andrews, T., Goodnow, C., Enders, A. (2013). B cell survival, surface BCR and BAFFR expression, CD74 metabolism, and CD8-dendritic cells require the intramembrane endopeptidase SPPL2A J Exp Med 210(1): 31-40.

- Berruti, G., Paiardi, C. (2011). Acrosome biogenesis: revisiting old questions to yield new insights Spermatogenesis 1(2): 95-98.
- Biswas, B., Batista, F., Sundaram, S., Stanley, P. (2018). MGAT1 and complex N-glycans regulate ERK signaling during spermatogenesis Sci Rep 8(1): 2022.
- Boname, J., Bloor, S., Wandel, M., Nathan, J., Antrobus, R., Dingwell, K., Thurston, T., Smith, D., Smith, J., Randow, F., Lehner, P. (2014). Cleavage by signal peptide peptidase is required for the degradation of selected tail-anchored proteins J Cell Biol 205(6): 847-862.
- Bonds, J., Kuttner-Hirshler, Y., Bartolotti, N., Tobin, M., Pizzi, M., Marr, R., Lazarov, O. (2015). Presenilin-1 dependent neurogenesis regulates hippocampal learning and memory PLoS One 10(6): e0131266.
- Brady, O., Zhou, X., Hu, F. (2014). Regulated intramembrane proteolysis of the frontotemporal lobar degeneration risk factor, TMEM106B, by signal peptide peptidase-like 2a (SPPL2a) J Biol Chem 289(28): 19670-19680.
- Bray, S. (2016). Notch signalling in context Nature Reviews Molecular Cell Biology 17(11): 722-735.
- Brewis, I., Gadella, B. (2010). Sperm surface proteomics: from protein lists to biological function Mol Hum Reprod 16(2): 68-79.
- Brown, M., Ye, J., Rawson, R., Goldstein, J. (2000). Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans Cell 100(4): 391-398.
- Caolo, V., Swennen, G., Chalaris, A., Wagenaar, A., Verbruggen, S., Rose-John, S., Molin, D., Vooijs, M., Post, M. (2015). ADAM10 and ADAM17 have opposite roles during sprouting angiogenesis Angiogenesis 18(1): 13-22.
- Chen, C., Malchus, N., Hehn, B., Stelzer, W., Avci, D., Langosch, D., Lemberg, M. (2014). Signal peptide peptidase functions in ERAD to cleave the unfolded protein response regulator XBP1u EMBO J 33(21): 2492-2506.
- Chio, U., Cho, H., Shan, S. (2017). Mechanisms of tail-anchored membrane protein targeting and insertion Annual review of cell and developmental biology 33(1): 417-438.
- Cho, C. (2012). Testicular and epididymal ADAMs: expression and function during fertilization Nat Rev Urol: 9(10), 550-560.
- Cooper, T., Noonan, E., Eckardstein, S., Auger, J., Baker, H., Behre, H., Haugen, T., Kruger, T., Wang, C., Mbizvo, M., Vogelsong, K. (2009). World health organization reference values for human semen characteristics. Human reproduction update 16(3): 231-245.
- Cornick, S., Kumar, M., Moreau, F., Gaisano, H., Chadee, K. (2019). VAMP8-mediated MUC2 mucin exocytosis from colonic goblet cells maintains innate intestinal homeostasis Nat Commun 10(1): 4306.
- Cornwall, G. (2009). New insights into epididymal biology and function Hum Reprod Update 15(2): 213-227.
- Costello, S., Michelangeli, F., Nash, K., Lefievre, L., Morris, J., Machado-Oliveira, G., Barratt, C., Kirkman-Brown, J., Publicover, S. (2009). Ca²⁺-stores in sperm: their identities and functions Reproduction 138(3): 425-437.

- Darszon, A., Nishigaki, T., Beltran, C., Treviño, C. (2011). Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa Physiological Reviews 91(4): 1305-1355.
- DenBoer, L., Hardy-Smith, P., Hogan, M., Cockram, G., Audas, T., Lu, R. (2005). Luman is capable of binding and activating transcription from the unfolded protein response element Biochem Biophys Res Commun 331(1): 113-119.
- Devlin, D., Nozawa, K., Ikawa, M., Matzuk, M. (2020). Knockout of family with sequence similarity 170 member A (Fam170a) causes male subfertility, while Fam170b is dispensable in mice Biol Reprod 103(2): 205-222.
- Dirami, G., Ravindranath, N., Achi, M., Dym, M. (2001). Expression of notch pathway components in spermatogonia and sertoli cells of neonatal mice J Androl 22(6): 944-952.
- Douaiher, J., Succar, J., Lancerotto, L., Gurish, M., Orgill, D., Hamilton, M., Krilis, S., Stevens, R. (2014). Development of mast cells and importance of their tryptase and chymase serine proteases in inflammation and wound healing Adv Immunol 122: 211-252.
- Dowell, R. (2011). The similarity of gene expression between human and mouse tissues Genome biology 12(1): 101
- Duggan, S., McCarthy, J. (2016). Beyond gamma-secretase activity: The multifunctional nature of presenilins in cell signalling pathways Cell Signal 28(1): 1-11.
- Dutta, S., Sengupta, P. (2016). Men and mice: Relating their ages Life Sci 152: 244-248.
- Erez, E., Fass, D., Bibi, E. (2009). How intramembrane proteases bury hydrolytic reactions in the membrane Nature 459(7245): 371-378.
- Esakky, P., Hansen, D., Drury, A., Moley, K. (2013). Molecular analysis of cell type-specific gene expression profile during mouse spermatogenesis by laser microdissection and qRT-PCR Reprod Sci 20(3): 238-252.
- Ezkurdia, I., Juan, D., Rodriguez, J., Frankish, A., Diekhans, M., Harrow, J., Vazquez, J., Valencia, A., Tress, M. (2014). Multiple evidence strands suggest that there may be as few as 19 000 human protein-coding genes Hum Mol Genet 23(22): 5866-5878.
- Fleck, D., Voss, M., Brankatschk, B., Giudici, C., Hampel, H., Schwenk, B., Edbauer, D., Fukumori, A., Steiner, H., Kremmer, E., Haug-Kroper, M., Rossner, M., Fluhrer, R., Willem, M., Haass, C. (2016). Proteolytic processing of neuregulin 1 type III by three intramembrane-cleaving proteases J Biol Chem 291(1): 318-333.
- Flieg, L., Bergbold, N., Sahasrabudhe, P., Geiger, B., Kaltak, L., Lemberg, M. (2012). Ubiquitin-dependent intramembrane rhomboid protease promotes ERAD of membrane proteins Mol Cell 47(4): 558-569.
- Flexner, C. (2007). HIV drug development: the next 25 years Nat Rev Drug Discov 6(12): 959-966.
- Franca, L., Hess, R., Dufour, J., Hofmann, M., Griswold, M. (2016). The sertoli cell: one hundred fifty years of beauty and plasticity Andrology 4(2): 189-212.
- Freeman, M. (2006). Structural biology: enzyme theory holds water Nature 444(7116): 153-155.

Freitas, M., Vijayaraghavan, S., Fardilha, M. (2017). Signaling mechanisms in mammalian sperm motility Biol Reprod 96(1): 2-12.

Friedmann, E., Lemberg, M., Weihofen, A., Dev, K., Dengler, U., Rovelli, G., Martoglio, B. (2004). Consensus analysis of signal peptide peptidase and homologous human aspartic proteases reveals opposite topology of catalytic domains compared with presenilins J Biol Chem 279(49): 50790-50798.

Friedmann, E., Hauben, E., Maylandt, K., Schleegeer, S., Vreugde, S., Lichtenthaler, S., Kuhn, P., Stauffer, D., Rovelli, G., Martoglio, B. (2006). SPPL2a and SPPL2b promote intramembrane proteolysis of TNF α in activated dendritic cells to trigger IL-12 production Nat Cell Biol 8(8): 843-848.

Fujiwara, Y., Ogonuki, N., Inoue, K., Ogura, A., Handel, M., Noguchi, J., Kunieda, T. (2013). t-SNARE Syntaxin2 (STX2) is implicated in intracellular transport of sulfoglycolipids during meiotic prophase in mouse spermatogenesis Biol Reprod 88(6): 141.

Galen, P., Kreso, A., Mbong, N., Kent, D., Fitzmaurice, T., Chambers, J., Xie, S., Laurenti, E., Hermans, K., Eppert, K., Marciniak, S., Goodall, J., Green, A., Wouters, B., Wienholds, E., Dick, J. (2014). The unfolded protein response governs integrity of the haematopoietic stem-cell pool during stress Nature 510(7504): 268-272.

Gane, E., Roberts, S., Stedman, C., Angus, P., Ritchie, B., Elston, R., Ipe, D., Morcos, P., Baher, L., Najera, I., Chu, T., Lopatin, U., Berrey, M., Bradford, W., Laughlin, M., Shulman, N., Smith, P. (2010). Oral combination therapy with a nucleoside polymerase inhibitor (RG7128) and danoprevir for chronic hepatitis C genotype 1 infection (INFORM-1): a randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial Lancet 376(9751): 1467-1475.

Golde, T., Wolfe, M., Greenbaum, D. (2009). Signal peptide peptidases: a family of intramembrane-cleaving proteases that cleave type 2 transmembrane proteins Semin Cell Dev Biol 20(2): 225-230.

Hagemann, D., Xiao, R. (2002). Dual site phospholamban phosphorylation and its physiological relevance in the heart Trends Cardiovasc Med 12(2): 51-56.

Hamblet, C., Makowski, S., Tritapoe, J., Pomerantz, J. (2016). NK cell maturation and cytotoxicity are controlled by the intramembrane aspartyl protease SPPL3 J Immunol 196(6): 2614-2626.

Harbut, M., Patel, B., Yeung, B., McNamara, C., Bright, A., Ballard, J., Supek, F., Golde, T., Winzeler, E., Diagana, T., Greenbaum, D. (2012). Targeting the ERAD pathway via inhibition of signal peptide peptidase for antiparasitic therapeutic design Proc Natl Acad Sci U S A 109(52): 21486-21491.

Harper, C., Wootton, L., Michelangeli, F., Lefievre, L., Barratt, C., Publicover, S. (2005). Secretory pathway Ca(2+)-ATPase (SPCA1) Ca(2+) pumps, not SERCAs, regulate complex Ca(2+)(i) signals in human spermatozoa J Cell Sci 118(8): 1673-1685.

Hauri, H., Kappeler, F., Andersson, H., Appenzeller, C. (2000). ERGIC-53 and traffic in the secretory pathway J Cell Sci 113 (4): 587-596.

Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., Mori, K. (1999). Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress Molecular Biology of the Cell 10(11): 3787-3799.

- Hegde, R., Keenan, R. (2011). Tail-anchored membrane protein insertion into the endoplasmic reticulum Nat Rev Mol Cell Biol 12(12): 787-798.
- Honma, Y., Kanazawa, K., Mori, T., Tanno, Y., Tojo, M., Kiyosawa, H., Takeda, J., Nikaido, T., Tsukamoto, T., Yokoya, S., Wanaka, A. (1999). Identification of a novel gene, OASIS, which encodes for a putative CREB/ATF family transcription factor in the long-term cultured astrocytes and gliotic tissue Brain Res Mol Brain Res 69(1): 93-103.
- Huang, H., Stanley, P. (2010). A testis-specific regulator of complex and hybrid N-glycan synthesis J Cell Biol 190(5): 893-910.
- Huang, H., Hassinen, A., Sundaram, S., Spiess, A., Kellokumpu, S., Stanley, P. (2015). GnT1IP-L specifically inhibits MGAT1 in the Golgi via its luminal domain Elife 4: e08916.
- Humphrey, S., James, D., Mann, M. (2015). Protein phosphorylation: a major switch mechanism for metabolic regulation Trends Endocrinol Metab 26(12): 676-687.
- Jaksik, R., Iwanaszko, M., Rzeszowska-Wolny, J., Kimmel, M. (2015). Microarray experiments and factors which affect their reliability Biol Direct 10(1): 46.
- Johnson, N., Brezinova, J., Stephens, E., Burbridge, E., Freeman, M., Adrain, C., Strisovsky, K. (2017). Quantitative proteomics screen identifies a substrate repertoire of rhomboid protease RHBDL2 in human cells and implicates it in epithelial homeostasis Sci Rep 7(1): 7283.
- Kappelhoff, R., Puente, X., Wilson, C., Seth, A., Lopez-Otin, C., Overall, C. (2017). Overview of transcriptomic analysis of all human proteases, non-proteolytic homologs and inhibitors: organ, tissue and ovarian cancer cell line expression profiling of the human protease degradome by the CLIP-CHIP DNA microarray Biochim Biophys Acta Mol Cell Res 1864 (11 Pt B): 2210-2219.
- Kasai, K., Suga, K., Izumi, T., Akagawa, K. (2008). Syntaxin 8 has two functionally distinct dileucine-based motifs Cell Mol Biol Lett 13(1): 144-154.
- Kataoka, H., Kume, N., Miyamoto, S., Minami, M., Moriwaki, H., Murase, T., Sawamura, T., Masaki, T., Hashimoto, N., Kita, T. (1999). Expression of lectinlike oxidized low-density lipoprotein receptor-1 in human atherosclerotic lesions Circulation 99(24): 3110-3117.
- Kempen, T., Leijten, E., Lindenbergh, M., Nordkamp, M., Driessen, C., Lebbink, R., Baerlecken, N., Witte, T., Radstake, T., Boes, M. (2020). Impaired proteolysis by SPPL2a causes CD74 fragment accumulation that can be recognized by anti-CD74 autoantibodies in human ankylosing spondylitis Eur J Immunol 50(8): 1209-1219.
- Kilic, A., Klose, S., Dobberstein, B., Knust, E., Kapp, K. (2010). The drosophila crumbs signal peptide is unusually long and is a substrate for signal peptide peptidase Eur J Cell Biol 89(6): 449-461.
- Kirkin, V., Cahuzac, N., Guardiola-Serrano, F., Huault, S., Luckerath, K., Friedmann, E., Novac, N., Wels, W., Martoglio, B., Hueber, A., Zornig, M. (2007). The Fas ligand intracellular domain is released by ADAM10 and SPPL2a cleavage in T-cells Cell Death Differ 14(9): 1678-1687.
- Kissel, K., Hamm, S., Schulz, M., Vecchi, A., Garlanda, C., Engelhardt, B. (1998). Immunohistochemical localization of the murine transferrin receptor (TfR) on blood-tissue barriers using a novel anti-TfR monoclonal antibody Histochem Cell Biol 110(1):

63-72.

Klein, G., Schmal, O., Aicher, W. (2015). Matrix metalloproteinases in stem cell mobilization Matrix Biol 44-46: 175-183.

Koch, S., Acebron, S., Herbst, J., Hatiboglu, G., Niehrs, C. (2015). Post-transcriptional Wnt signaling governs epididymal sperm maturation Cell 163(5): 1225-1236.

Kondo, S., Saito, A., Hino, S., Murakami, T., Ogata, M., Kanemoto, S., Nara, S., Yamashita, A., Yoshinaga, K., Hara, H., Imaizumi, K. (2007). BBF2H7, a novel transmembrane bZIP transcription factor, is a new type of endoplasmic reticulum stress transducer Mol Cell Biol 27(5): 1716-1729.

Kondo, S., Murakami, T., Tatsumi, K., Ogata, M., Kanemoto, S., Otori, K., Iseki, K., Wanaka, A., Imaizumi, K. (2005). OASIS, a CREB/ATF-family member, modulates UPR signalling in astrocytes Nat Cell Biol 7(2): 186-194.

Kong, X., Martinez-Barricarte, R., Kennedy, J., Mele, F., Lazarov, T., Deenick, E., Ma, C., Breton, G., Lucero, K., Langlais, D., Bousfiha, A., Aytekin, C., Markle, J., Trouillet, C., Jabot-Hanin, F., Arlehamn, C., Rao, G., Picard, C., Lasseau, T., Latorre, D., Hambleton, S., Deswarte, C., Itan, Y., Abarca, K., Moraes-Vasconcelos, D., Ailal, F., Ikinciogullari, A., Dogu, F., Benhsaien, I., Sette, A., Abel, L., Boisson-Dupuis, S., Schroder, B., Nussenzweig, M., Liu, K., Geissmann, F., Tangye, S., Gros, P., Sallusto, F., Bustamante, J., Casanova, J. (2018). Disruption of an antimycobacterial circuit between dendritic and helper T cells in human SPPL2a deficiency Nat Immunol 19(9): 973-985.

Koolen, D., Sharp, A., Hurst, J., Firth, H., Knight, S., Goldenberg, A., Saugier-veber, P., Pfundt, R., Vissers, L., Destree, A., Grisart, B., Rooms, L., Aa, N., Field, M., Hackett, A., Bell, K., Nowaczyk, M., Mancini, G., Poddighe, P., Schwartz, C., Rossi, E., Gregori, M., Antonacci-Fulton, L., McLellan, M., Garrett, J., Wiechert, M., Miner, T., Crosby, S., Ciccone, R., Willatt, L., Rauch, A., Zenker, M., Aradhya, S., Manning, M., Strom, T., Wagenstaller, J., Krepischi-Santos, A., Vianna-Morgante, A., Rosenberg, C., Price, S., Stewart, H., Shaw-Smith, C., Brunner, H., Wilkie, A., Veltman, J., Zuffardi, O., Eichler, E., Vries, B. (2008). Clinical and molecular delineation of the 17q21.31 microdeletion syndrome J Med Genet 45(11): 710-720.

Koolen, D., Kramer, J., Neveling, K., Nillesen, W., Moore-Barton, H., Elmslie, F., Toutain, A., Amiel, J., Malan, V., Tsai, A., Cheung, S., Gilissen, C., Verwiel, E., Martens, S., Feuth, T., Bongers, E., Vries, P., Scheffer, H., Vissers, L., Brouwer, A., Brunner, H., Veltman, J., Schenck, A., Yntema, H., Vries, B. (2012). Mutations in the chromatin modifier gene KANSL1 cause the 17q21.31 microdeletion syndrome Nat Genet 44(6): 639-641.

Krausz, C., Riera-Escamilla, A. (2018). Genetics of male infertility Nat Rev Urol 15(6): 369-384.

Kroll, K., Barkema, G., Carlon, E. (2008). Modeling background intensity in DNA microarrays Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys 77(6 Pt 1): 061915.

Kronenberg-Versteeg, D., Eichmann, M., Russell, M., Ru, A., Hehn, B., Yusuf, N., Veelen, P., Richardson, S., Morgan, N., Lemberg, M., Peakman, M. (2018). Molecular pathways for immune recognition of preproinsulin signal peptide in type 1 diabetes Diabetes 67(4): 687-696.

Kuhnle, N., Dederer, V., Lemberg, M. (2019). Intramembrane proteolysis at a glance: from signalling to protein degradation J Cell Sci 132(16): jcs217745.

Kurokawa, M., Kornbluth, S. (2009). Caspases and kinases in a death grip Cell 138(5): 838-854.

Labanca, E., Luca, P., Gueron, G., Paez, A., Moiola, C., Massillo, C., Porretti, J., Giudice, J., Zalazar, F., Navone, N., Vazquez, E., Siervi, A. (2015). Association of HO-1 and BRCA1 is critical for the maintenance of cellular homeostasis in prostate cancer Mol Cancer Res 13(11): 1455-1464.

Lander, E., Linton, L., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczký, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, Y., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J., Mungall, A., Plumb, R., Ross, M., Shownkeen, R., Sims, S., Waterston, R., Wilson, R., Hillier, L., McPherson, J., Marra, M., Mardis, E., Fulton, L., Chinwalla, A., Pepin, K., Gish, W., Chissoe, S., Wendl, M., Delehaunty, K., Miner, T., Delehaunty, A., Kramer, J., Cook, L., Fulton, R., Johnson, D., Minx, P., Clifton, S., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng, J., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M., Gibbs, R., Muzny, D., Scherer, S., Bouck, J., Sodergren, E., Worley, K., Rives, C., Gorrell, J., Metzker, M., Naylor, S., Kucherlapati, R., Nelson, D., Weinstock, G., Sakaki, Y., Fujiyama, A., Hattori, M., Yada, T., Toyoda, A., Itoh, T., Kawagoe, C., Watanabe, H., Totoki, Y., Taylor, T., Weissenbach, J., Heilig, R., Saurin, W., Artiguenave, F., Brottier, P., Bruls, T., Pelletier, E., Robert, C., Wincker, P., Smith, D., Doucette-Stamm, L., Rubenfield, M., Weinstock, K., Lee, H., Dubois, J., Rosenthal, A., Platzer, M., Nyakatura, G., Taudien, S., Rump, A., Yang, H., Yu, J., Wang, J., Huang, G., Gu, J., Hood, L., Rowen, L., Madan, A., Qin, S., Davis, R., Federspiel, N., Abola, A., Proctor, M., Myers, R., Schmutz, J., Dickson, M., Grimwood, J., Cox, D., Olson, M., Kaul, R., Raymond, C., Shimizu, N., Kawasaki, K., Minoshima, S., Evans, G., Athanasiou, M., Schultz, R., Roe, B., Chen, F., Pan, H., Ramser, J., Lehrach, H., Reinhardt, R., McCombie, W., Bastide, M., Dedhia, N., Blocker, H., Hornischer, K., Nordsiek, G., Agarwala, R., Aravind, L., Bailey, J., Bateman, A., Batzoglou, S., Birney, E., Bork, P., Brown, D., Burge, C., Cerutti, L., Chen, H., Church, D., Clamp, M., Copley, R., Doerks, T., Eddy, S., Eichler, E., Furey, T., Galagan, J., Gilbert, J., Harmon, C., Hayashizaki, Y., Haussler, D., Hermjakob, H., Hokamp, K., Jang, W., Johnson, L., Jones, T., Kasif, S., Kasprzyk, A., Kennedy, S., Kent, W., Kitts, P., Koonin, E., Korf, I., Kulp, D., Lancet, D., Lowe, T., McLysaght, A., Mikkelsen, T., Moran, J., Mulder, N., Pollara, V., Ponting, C., Schuler, G., Schultz, J., Slater, G., Smit, A., Stupka, E., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Wagner, L., Wallis, J., Wheeler, R., Williams, A., Wolf, Y., Wolfe, K., Yang, S., Yeh, R., Collins, F., Guyer, M., Peterson, J., Felsenfeld, A., Wetterstrand, K., Patrinos, A., Morgan, M., Jong, P., Catanese, J., Osoegawa, K., Shizuya, H., Choi, S., Chen, Y., Szustakowski, J., Sequencing, C. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome Nature 409(6822): 860-921.

Lawson, C., Dorval, V., Goupil, S., Leclerc, P. (2007). Identification and localisation of SERCA 2 isoforms in mammalian sperm Mol Hum Reprod 13(5): 307-316.

Lei, C., Liu, Q., Wang, W., Li, J., Xu, F., Liu, Y., Liu, J., Wu, S., Wang, M. (2010). Isolation and characterization of a novel zinc finger gene, ZNFD, activating AP1(PMA) transcriptional activities Mol Cell Biochem 340(1-2): 63-71.

Lemberg, M., Bland, F., Weihofen, A., Braud, V., Martoglio, B. (2001). Intramembrane proteolysis of signal peptides: an essential step in the generation of HLA-E epitopes J Immunol 167(11), 6441-6446.

- Lemberg, M., Martoglio, B. (2002). Requirements for signal peptide peptidase-catalyzed intramembrane proteolysis Mol Cell 10(4): 735-744*
- Lichtenthaler, S., Güner, G. (2019). Pathology-linked protease caught in action Science 363(6428): 690-691.*
- Lichtenthaler, S., Lemberg, M., Fluhrer, R. (2018). Proteolytic ectodomain shedding of membrane proteins in mammals-hardware, concepts, and recent developments EMBO J 37(15)*
- Lichtenthaler, S., Haass, C., Steiner, H. (2011). Regulated intramembrane proteolysis-lessons from amyloid precursor protein processing J Neurochem 117(5): 779-796.*
- Loboda, A., Jozkowicz, A., Dulak, J. (2015). HO-1/CO system in tumor growth, angiogenesis and metabolism - Targeting HO-1 as an anti-tumor therapy Vascul Pharmacol 74: 11-22.*
- Lopez-Otin, C., Bond, J. (2008). Proteases: multifunctional enzymes in life and disease J Biol Chem 283(45): 30433-30437.*
- Ma, W., Goldberg, J. (2013). Rules for the recognition of dilysine retrieval motifs by coatamer EMBO J 32(7): 926-937.*
- Magueresse-Battistoni, B. (2007). Serine proteases and serine protease inhibitors in testicular physiology: the plasminogen activation system Reproduction 134(6): 721-729.*
- Manolaridis, I., Kulkarni, K., Dodd, R., Ogasawara, S., Zhang, Z., Bineva, G., Reilly, N., Hanrahan, S., Thompson, A., Cronin, N., Iwata, S., Barford, D. (2013). Mechanism of farnesylated CAAX protein processing by the intramembrane protease Rce1 Nature 504(7479): 301-305.*
- Martin, L., Fluhrer, R., Reiss, K., Kremmer, E., Saftig, P., Haass, C. (2007). Regulated intramembrane proteolysis of Bri2 (Itm2b) by ADAM10 and SPPL2a/SPPL2b Journal of Biological Chemistry 283(3): 1644-1652.*
- Martoglio, B., Dobberstein, B. (1998). Signal sequences: more than just greasy peptides Trends Cell Biol 8(10): 410-415.*
- Masters, C., Selkoe, D. (2012). Biochemistry of amyloid beta-protein and amyloid deposits in Alzheimer disease Cold Spring Harb Perspect Med 2(6): a006262.*
- Matsuhisa, K., Saito, A., Cai, L., Kaneko, M., Okamoto, T., Sakaue, F., Asada, R., Urano, F., Yanagida, K., Okochi, M., Kudo, Y., Matsumoto, M., Nakayama, K., Imaizumi, K., Matsuhisa, K. (2019). Production of BBF2H7-derived small peptide fragments via endoplasmic reticulum stress-dependent regulated intramembrane proteolysis. FASEB 34(1): 865-880.*
- McLauchlan, J., Lemberg, M., Hope, G., Martoglio, B. (2002). Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets EMBO J 21(15): 3980-3988.*
- Mentrup, T., Theodorou, K., Cabrera-Cabrera, F., Helbig, A., Happ, K., Gijbels, M., Gradtke, A., Rabe, B., Fukumori, A., Steiner, H., Tholey, A., Fluhrer, R., Donners, M., Schröder, B. (2019). Atherogenic LOX-1 signaling is controlled by SPPL2-mediated intramembrane proteolysis SPPL2 proteases control LOX-1 signaling J Exp Med 216(4), 807-830.*
- Mentrup, T., Fluhrer, R., Schroder, B. (2017). Latest emerging functions of SPP/SPPL intramembrane proteases Eur J Cell Biol 96(5): 372-382.*

Mentrup, T., Cabrera-Cabrera, F., Fluhrer, R., Schroder, B. (2020). Physiological functions of SPP/SPPL intramembrane proteases Cell Mol Life Sci 77: 2959-2979.

Milstein, C., Brownlee, G., Harrison, T., Mathews, M. (1972). A possible precursor of immunoglobulin light chains Nat New Biol 239(91): 117-120.

Miyata, H., Castaneda, J., Fujihara, Y., Yu, Z., Archambeault, D., Isotani, A., Kiyozumi, D., Kriseman, M., Mashiko, D., Matsumura, T., Matzuk, R., Mori, M., Noda, T., Oji, A., Okabe, M., Prunskaitė-Hyyryläinen, R., Ramirez-Solis, R., Satouh, Y., Zhang, Q., Ikawa, M., Matzuk, M. (2016). Genome engineering uncovers 54 evolutionarily conserved and testis-enriched genes that are not required for male fertility in mice Proc Natl Acad Sci U S A 113(28): 7704-7710.

Moreno, R., Urriola-Munoz, P., Lagos-Cabre, R. (2011). The emerging role of matrix metalloproteases of the ADAM family in male germ cell apoptosis Spermatogenesis 1(3): 195-208.

Murakami, T., Kondo, S., Ogata, M., Kanemoto, S., Saito, A., Wanaka, A., Imaizumi, K. (2006). Cleavage of the membrane-bound transcription factor OASIS in response to endoplasmic reticulum stress J Neurochem 96(4): 1090-1100.

Murta, D., Batista, M., Trindade, A., Silva, E., Henrique, D., Duarte, A., Lopes-da-Costa, L. (2014). In vivo notch signaling blockade induces abnormal spermatogenesis in the mouse PLoS One 9(11): e113365.

Nagamori, I., Yabuta, N., Fujii, T., Tanaka, H., Yomogida, K., Nishimune, Y., Nojima, H. (2005). Tisp40, a spermatid specific bZip transcription factor, functions by binding to the unfolded protein response element via the Rip pathway Genes Cells 10(6): 575-594.

Nakamura, N., Rabouille, C., Watson, R., Nilsson, T., Hui, N., Slusarewicz, P., Kreis, T., Warren, G. (1995). Characterization of a cis-Golgi matrix protein, GM130 J Cell Biol 131(6 Pt 2): 1715-1726.

Nakamura, S., Kobori, Y., Ueda, Y., Tanaka, Y., Ishikawa, H., Yoshida, A., Katsumi, M., Saito, K., Nakamura, A., Ogata, T., Okada, H., Nakai, H., Miyado, M., Fukami, M. (2018). STX2 is a causative gene for nonobstructive azoospermia Hum Mutat 39(6): 830-833.

Nascimento, G., Pinto, I., Melo, A., Cruz, D., Ribeiro, C., Silva, C., Cruz, A., Minasi, L. (2017). Molecular characterization of Koolen De Vries syndrome in two girls with idiopathic intellectual disability from central brazil Mol Syndromol 8(3): 155-160.

Nemec, K., Schubert-Zsilavecz, M. (2003). Rationales Design von Hemmern: Vom Teprotid zum Captopril Pharmazie in unserer Zeit 32(1): 11-16.

Neurath, H., Walsh, K. (1976). Role of proteolytic enzymes in biological regulation (a review) Proc Natl Acad Sci U S A 73(11): 3825-3832.

Niemeyer, J., Mentrup, T., Heidasch, R., Muller, S., Biswas, U., Meyer, R., Papadopoulou, A., Dederer, V., Haug-Kroper, M., Adamski, V., Lullmann-Rauch, R., Bergmann, M., Mayerhofer, A., Saftig, P., Wennemuth, G., Jessberger, R., Fluhrer, R., Lichtenthaler, S., Lemberg, M., Schroder, B. (2019). The intramembrane protease SPPL2c promotes male germ cell development by cleaving phospholamban EMBO Rep 20(3)

Noth, I., Zhang, Y., Ma, S., Flores, C., Barber, M., Huang, Y., Broderick, S., Wade, M., Hysi, P., Scuirba, J., Richards, T., Juan-Guardela, B., Vij, R., Han, M., Martinez, F., Kossen, K., Seiwert, S., Christie, J., Nicolae, D., Kaminski, N., Garcia, J. (2013). Genetic variants associated with idiopathic pulmonary fibrosis susceptibility and mortality: a genome-wide association study *Lancet Respir Med* 1(4): 309-317.

Nyborg, A., Jansen, K., Ladd, T., Fauq, A., Golde, T. (2004). A signal peptide peptidase (SPP) reporter activity assay based on the cleavage of type II membrane protein substrates provides further evidence for an inverted orientation of the SPP active site relative to presenilin *J Biol Chem* 279(41): 43148-43156.

O'Donnell, L. (2014). Mechanisms of spermiogenesis and spermiation and how they are disturbed *Spermatogenesis* 4(2): e979623.

O'Donnell, L., Nicholls, P., O'Bryan, M., McLachlan, R., Stanton, P. (2011). Spermiation: The process of sperm release *Spermatogenesis* 1(1): 14-35.

Oakberg, E. (1957). Duration of spermatogenesis in the mouse *Nature* 180(4595): 1137-1138.

Oda, K. (2012). New families of carboxyl peptidases: serine-carboxyl peptidases and glutamic peptidases *J Biochem* 151(1): 13-25.

Olson, O., Joyce, J. (2015). Cysteine cathepsin proteases: regulators of cancer progression and therapeutic response *Nat Rev Cancer* 15(12): 712-729.

Pang, P., Chiu, P., Lee, C., Chang, L., Panico, M., Morris, H., Haslam, S., Khoo, K., Clark, G., Yeung, W., Dell, A. (2011). Human sperm binding is mediated by the sialyl-Lewis(x) oligosaccharide on the zona pellucida *Science* 333(6050): 1761-1764.

Papadopoulou, A., Muller, S., Mentrup, T., Shmueli, M., Niemeyer, J., Haug-Kroper, M., Blume, J., Mayerhofer, A., Feederle, R., Schroder, B., Lichtenthaler, S., Fluhrer, R. (2019). Signal peptide peptidase-like 2c (SPPL2c) impairs vesicular transport and cleavage of SNARE proteins *EMBO Rep* 20(3): e46451.

Parent, A., Cornwall, G., Liu, L., Smith, C., Hermo, L. (2011). Alterations in the testis and epididymis associated with loss of function of the cystatin-related epididymal spermatogenic (CRES) protein *J Androl* 32(4): 444-463.

Plessis, S., Agarwal, A., Mohanty, G., Linde, M. (2015). Oxidative phosphorylation versus glycolysis: what fuel do spermatozoa use? *Asian J Androl* 17(2): 230-235.

Ponting, C., Hutton, M., Nyborg, A., Baker, M., Jansen, K., Golde, T. (2002). Identification of a novel family of presenilin homologues *Hum Mol Genet* 11(9): 1037-1044.

Puente, X., Sanchez, L., Overall, C., Lopez-Otin, C. (2003). Human and mouse proteases: a comparative genomic approach *Nat Rev Genet* 4(7): 544-558.

Rabu, C., Schmid, V., Schwappach, B., High, S. (2009). Biogenesis of tail-anchored proteins: the beginning for the end? *J Cell Sci* 122(20): 3605-3612.

Raggo, C., Rapin, N., Stirling, J., Gobeil, P., Smith-Windsor, E., O'Hare, P., Misra, V. (2002). Luman, the cellular counterpart of herpes simplex virus VP16, is processed by regulated intramembrane proteolysis *Mol Cell Biol* 22(16): 5639-5649.

Raghu, G., Collard, H., Egan, J., Martinez, F., Behr, J., Brown, K., Colby, T., Cordier, J., Flaherty, K., Lasky, J., Lynch, D., Ryu, J., Swigris, J., Wells, A., Ancochea, J., Bouros, D., Carvalho, C., Costabel, U., Ebina, M., Hansell, D., Johkoh, T., Kim, D., King, T., Kondoh, Y., Myers, J., Muller, N., Nicholson, A., Richeldi, L., Selman, M., Dudden, R., Griss, B., Protzko, S., Schunemann, H. (2011). An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management Am J Respir Crit Care Med 183(6), 788-824.

Rahman, M., Kwon, W., Pang, M. (2014). Calcium influx and male fertility in the context of the sperm proteome: an update Biomed Res Int 2014: 841615.

Rawlings, N., Barrett, A., Thomas, P., Huang, X., Bateman, A., Finn, R. (2018). The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database Nucleic Acids Res 46(D1): D624-D632

Rawlings, N., Barrett, A., Finn, R. (2016). Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors Nucleic Acids Res 44(D1): D343-50.

Rawson, R., Zelenski, N., Nijhawan, D., Ye, J., Sakai, J., Hasan, M., Chang, T., Brown, M., Goldstein, J. (1997). Complementation cloning of S2P, a gene encoding a putative metalloprotease required for intramembrane cleavage of SREBPs Mol Cell 1(1): 47-57.

Rawson, R. (2013). The site-2 protease Biochim Biophys Acta 1828(12): 2801-2807.

Rengaraj, D., Liang, X., Gao, F., Deng, W., Mills, N., Yang, Z. (2008). Differential expression and regulation of integral membrane protein 2b in rat male reproductive tissues Asian J Androl 10(3): 503-511.

Rezaei, H., Asgharzadeh, N., Noradbeigi, A. (2018). A case of Koolen de Vries syndrome or 17q21.31 microdeletion syndrome associated with infertility: A Case Report SM J of Case Rep 4(1): 1080

Rogaev, E., Sherrington, R., Rogaeva, E., Levesque, G., Ikeda, M., Liang, Y., Chi, H., Lin, C., Holman, K., Tsuda, T. (1995). Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene Nature 376(6543): 775-778.

Roux, K., Kim, D., Burke, B. (2013). BioID: a screen for protein-protein interactions Curr Protoc Protein Sci 74(1): 19-23.

Roux, K., Kim, D., Burke, B., May, D. (2018). BioID: A screen for protein-protein interactions Curr Protoc Protein Sci 91(1), 1-19.

Russell, D., Brown, H., Dunning, K. (2015). ADAMTS proteases in fertility Matrix Biol 44-46: 54-63.

Schilling, O., Findeisen, P. (2014). Proteases and disease Proteomics Clin Appl 8(5-6): 296-298.

Schneppenheim, J., Dressel, R., Huttli, S., Lullmann-Rauch, R., Engelke, M., Dittmann, K., Wienands, J., Eskelinen, E., Hermans-Borgmeyer, I., Fluhrer, R., Saftig, P., Schroder, B. (2013). The intramembrane protease SPPL2a promotes B cell development and controls endosomal traffic by cleavage of the invariant chain J Exp Med 210(1): 41-58.

Schneppenheim, J., Huttl, S., Mentrup, T., Lullmann-Rauch, R., Rothaug, M., Engelke, M., Dittmann, K., Dressel, R., Araki, M., Araki, K., Wienands, J., Fluhrer, R., Saftig, P., Schroder, B. (2014). The intramembrane proteases signal Peptide peptidase-like 2a and 2b have distinct functions in vivo Mol Cell Biol 34(8): 1398-1411. Im laufenden Text als Schneppenheim, 2014a deklariert.

Schneppenheim, J., Huttl, S., Kruchen, A., Fluhrer, R., Muller, I., Saftig, P., Schneppenheim, R., Martin, C., Schroder, B. (2014). Signal-peptide-peptidase-like 2a is required for CD74 intramembrane proteolysis in human B cells Biochem Biophys Res Commun 451(1): 48-53. Im laufenden Text als Schneppenheim, 2014b deklariert.

Schroder, B. (2016). The multifaceted roles of the invariant chain CD74-More than just a chaperone Biochim Biophys Acta 1863(6 Pt A): 1269-1281.

Schwann, T. (1836). Ueber das Wesen des Verdauungsprocesses, Ann Pharm Chem 20: 28-34.

Selkoe, D. (1996). Amyloid beta-protein and the genetics of Alzheimer's disease J Biol Chem 271(31): 18295-18298.

Sherrington, R., Rogaev, E., Liang, Y., Rogaeva, E., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K., Tsuda, T., Mar, L., Foncin, J., Bruni, A., Montesi, M., Sorbi, S., Rainero, I., Pinessi, L., Nee, L., Chumakov, I., Pollen, D., Brookes, A., Sanseau, P., Polinsky, R., Wasco, W., Silva, H., Haines, J., Perkicak-Vance, M., Tanzi, R., Roses, A., Fraser, P., Rommens, J., George-Hyslop, P. (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease Nature 375(6534): 754-760.

Simard, O., Leduc, F., Acteau, G., Arguin, M., Gregoire, M., Brazeau, M., Marois, I., Richter, M., Boissonneault, G. (2015). Step-specific sorting of mouse spermatids by flow cytometry J Vis Exp

Sollner, J., Lepar, G., Hildebrandt, T., Klein, H., Thomas, L., Stupka, E., Simon, E. (2017). An RNA-Seq atlas of gene expression in mouse and rat normal tissues Sci Data 4(1): 170-185.

Somanath, P., Jack, S., Vijayaraghavan, S. (2004). Changes in sperm glycogen synthase kinase-3 serine phosphorylation and activity accompany motility initiation and stimulation J Androl 25(4): 605-617.

Sousa, M., Cremades, N., Alves, C., Silva, J., Barros, A. (2002). Developmental potential of human spermatogenic cells co-cultured with Sertoli cells Hum Reprod 17(1): 161-172.

Storlazzi, C., Mertens, F., Nascimento, A., Isaksson, M., Wejde, J., Brosjo, O., Mandahl, N., Panagopoulos, I. (2003). Fusion of the FUS and BBF2H7 genes in low grade fibromyxoid sarcoma Hum Mol Genet 12(18): 2349-2358.

Tam, E., Morrison, C., Wu, Y., Stack, M., Overall, C. (2004). Membrane protease proteomics: isotope-coded affinity tag MS identification of undescribed MT1-matrix metalloproteinase substrates Proc Natl Acad Sci U S A 101(18): 6917-6922.

Tang, T., Li, L., Tang, J., Li, Y., Lin, W., Martin, F., Grant, D., Solloway, M., Parker, L., Ye, W., Forrest, W., Ghilardi, N., Oravec, T., Platt, K., Rice, D., Hansen, G., Abuin, A., Eberhart, D., Godowski, P., Holt, K., Peterson, A., Zambrowicz, B., Sauvage, F. (2010). A mouse knockout library for secreted and transmembrane proteins Nat Biotechnol 28(7): 749-755.

Taveggia, C., Zanazzi, G., Petrylak, A., Yano, H., Rosenbluth, J., Einheber, S., Xu, X., Esper, R., Loeb, J., Shrager, P., Chao, M., Falls, D., Role, L., Salzer, J. (2005). Neuregulin-1 type III determines the ensheathment fate of axons Neuron 47(5): 681-694.

Tournaye, H., Krausz, C., Oates, R. (2017). Novel concepts in the aetiology of male reproductive impairment Lancet Diabetes Endocrinol 5(7): 544-553.

Uhlen, M., Fagerberg, L., Hallstrom, B., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, A., Kampf, C., Sjostedt, E., Asplund, A., Olsson, I., Edlund, K., Lundberg, E., Navani, S., Szigartyo, C., Odeberg, J., Djureinovic, D., Takanen, J., Hober, S., Alm, T., Edqvist, P., Berling, H., Tegel, H., Mulder, J., Rockberg, J., Nilsson, P., Schwenk, J., Hamsten, M., Feilitzten, K., Forsberg, M., Persson, L., Johansson, F., Zwahlen, M., Heijne, G., Nielsen, J., Ponten, F. (2015). Proteomics. Tissue-based map of the human proteome Science 347(6220): 1260419.

Umehara, T., Kawashima, I., Kawai, T., Hoshino, Y., Morohashi, K., Shima, Y., Zeng, W., Richards, J., Shimada, M. (2016). Neuregulin 1 regulates proliferation of leydig cells to support spermatogenesis and sexual behavior in adult mice Endocrinology 157(12): 4899-4913.

Urban, S. (2016). A guide to the rhomboid protein superfamily in development and disease Semin Cell Dev Biol 60: 1-4.

Urban, S., Lee, J., Freeman, M. (2001). Drosophila rhomboid-1 defines a family of putative intramembrane serine proteases Cell 107(2): 173-182.

Urban, S. (2013). Mechanisms and cellular functions of intramembrane proteases Biochim Biophys Acta 1828(12): 2797-2800

Urny, J., Hermans-Borgmeyer, I., Gercken, G., Chica-Schaller, H. (2003). Expression of the presenilin-like signal peptide peptidase (SPP) in mouse adult brain and during development Gene Expression Patterns 3(5): 685-691.

Velcicky, J., Mathison, C., Nikulin, V., Pflieger, D., Eppele, R., Azimioara, M., Cow, C., Michellys, P., Rigollier, P., Beisner, D., Bodendorf, U., Guerini, D., Liu, B., Wen, B., Zaharevitz, S., Brandl, T. (2019). Discovery of orally active hydroxyethylamine based SPPL2a inhibitors ACS Med Chem Lett 10(6): 887-892.

Velcicky, J., Bodendorf, U., Rigollier, P., Eppele, R., Beisner, D., Guerini, D., Smith, P., Liu, B., Feifel, R., Wipfli, P., Aichholz, R., Couttet, P., Dix, I., Widmer, T., Wen, B., Brandl, T. (2018). Discovery of the first potent, selective, and orally bioavailable signal peptide peptidase-like 2a (SPPL2a) inhibitor displaying pronounced immunomodulatory effects in vivo J Med Chem 61(3): 865-880.

Vidal, R., Revesz, T., Rostagno, A., Kim, E., Holton, J., Bek, T., Bojsen-Moller, M., Braendgaard, H., Plant, G., Ghiso, J., Frangione, B. (2000). A decamer duplication in the 3' region of the BRI gene originates an amyloid peptide that is associated with dementia in a danish kindred Proc Natl Acad Sci U S A 97(9): 4920-4925.

Vidal, R., Frangione, B., Rostagno, A., Mead, S., Revesz, T., Plant, G., Ghiso, J. (1999). A stop-codon mutation in the BRI gene associated with familial british dementia Nature 399(6738): 776-781.

Vincent, M., Martin, A., Compans, R. (1998). Function of the KKXX motif in endoplasmic reticulum retrieval of a transmembrane protein depends on the length and structure of the cytoplasmic domain J Biol Chem 273(2): 950-956.

Virant-Klun, I., Leicht, S., Hughes, C., Krijgsveld, J. (2016). Identification of maturation-specific proteins by single-cell proteomics of human oocytes Mol Cell Proteomics 15(8): 2616-2627.

Voss, M., Fukumori, A., Kuhn, P., Kunzel, U., Klier, B., Grammer, G., Haug-Kroper, M., Kremmer, E., Lichtenthaler, S., Steiner, H., Schroder, B., Haass, C., Fluhrer, R. (2012). Foamy virus envelope protein is a substrate for signal peptide peptidase-like 3 (SPPL3) J Biol Chem 287(52): 43401-43409.

Voss, M., Schroder, B., Fluhrer, R. (2013). Mechanism, specificity, and physiology of signal peptide peptidase (SPP) and SPP-like proteases Biochim Biophys Acta 1828(12): 2828-2839.

Voss, M., Kunzel, U., Higel, F., Kuhn, P., Colombo, A., Fukumori, A., Haug-Kroper, M., Klier, B., Grammer, G., Seidl, A., Schroder, B., Obst, R., Steiner, H., Lichtenthaler, S., Haass, C., Fluhrer, R. (2014). Shedding of glycan-modifying enzymes by signal peptide peptidase-like 3 (SPPL3) regulates cellular N-glycosylation EMBO J 33(24): 2890-2905.

Wahlberg, P., Nylander, A., Ahlskog, N., Liu, K., Ny, T. (2008). Expression and localization of the serine proteases high-temperature requirement factor A1, serine protease 23, and serine protease 35 in the mouse ovary Endocrinology 149(10): 5070-5077.

Wang, Y., Guan, X., Fok, K., Li, S., Zhang, X., Miao, S., Zong, S., Koide, S., Chan, H., Wang, L. (2008). A novel member of the Rhomboid family, RHBDD1, regulates BIK-mediated apoptosis Cell Mol Life Sci 65(23): 3822-3829.

Wang, J., Beher, D., Nyborg, A., Shearman, M., Golde, T., Goate, A. (2006). C-terminal PAL motif of presenilin and presenilin homologues required for normal active site conformation J Neurochem 96(1): 218-227.

Wang, Y., Zhang, Y., Ha, Y. (2006). Crystal structure of a rhomboid family intramembrane protease Nature 444(7116): 179-180.

Wang, Y., Song, W., Li, S., Guan, X., Miao, S., Zong, S., Koide, S., Wang, L. (2009). GC-1 mRHBDD1 knockdown spermatogonia cells lose their spermatogenic capacity in mouse seminiferous tubules BMC Cell Biol 10(1): 25.

Wang, Y., Xiao, Y., Zhong, L., Ye, D., Zhang, J., Tu, Y., Bornstein, S., Zhou, Z., Lam, K., Xu, A. (2014). Increased neutrophil elastase and proteinase 3 and augmented NETosis are closely associated with beta-cell autoimmunity in patients with type 1 diabetes Diabetes 63(12): 4239-4248.

Wang, C., Shi, H., Guo, K., Ng, C., Li, J., Gan, B., Liew, H., Leinonen, J., Rajaniemi, H., Zhou, Z., Zeng, Q., Hong, W. (2007). VAMP8/endobrevin as a general vesicular SNARE for regulated exocytosis of the exocrine system Mol Biol Cell 18(3): 1056-1063.

Weihofen, A., Binns, K., Lemberg, M., Ashman, K., Martoglio, B. (2002). Identification of signal peptide peptidase, a presenilin-type aspartic protease Science 296(5576): 2215-2218.
White, S., Sala-Newby, G., Newby, A. (2011). Overexpression of scavenger receptor LOX-1 in endothelial cells promotes atherogenesis in the ApoE(-/-) mouse model Cardiovasc Pathol 20(6): 369-373.

Willem, M. (2016). Proteolytic processing of neuregulin-1 Brain Res Bull 126(2): 178-182.

Wolfe, M. (2010). Structure, mechanism and inhibition of gamma-secretase and presenilin-like proteases Biol Chem 391(8): 839-847.

Yanai, I., Graur, D., Ophir, R. (2004). Incongruent expression profiles between human and mouse orthologous genes suggest widespread neutral evolution of transcription control OMICS 8(1): 15-24.

Ye, J., Rawson, R., Komuro, R., Chen, X., Dave, U., Prywes, R., Brown, M., Goldstein, J. (2000). ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs Mol Cell 6(6): 1355-1364.

Yip, B., Chen, S., Mulder, H., Hoppener, J., Schachter, H. (1997). Organization of the human beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase I gene (MGAT1), which controls complex and hybrid N-glycan synthesis Biochem J 321(2): 465-474.

Yoneda, R., Takahashi, T., Matsui, H., Takano, N., Hasebe, Y., Ogiwara, K., Kimura, A. (2013). Three testis-specific paralogous serine proteases play different roles in murine spermatogenesis and are involved in germ cell survival during meiosis Biol Reprod 88(5), 118.

Yücel, S., Lemberg, M. (2020). Signal peptide peptidase-type proteases: versatile regulators with functions ranging from limited proteolysis to protein degradation Journal Mol Biol 432(18): 5063-5078.

Zahn, C., Kaup, M., Fluhrer, R., Fuchs, H. (2013). The transferrin receptor-1 membrane stub undergoes intramembrane proteolysis by signal peptide peptidase-like 2b FEBS J 280(7): 1653-1663.

Zakrzewski, P., Lenartowski, R., Redowicz, M., Miller, K., Lenartowska, M. (2017). Expression and localization of myosin VI in developing mouse spermatids Histochem Cell Biol 148(4): 445-462.

Zhang, K., Shen, X., Wu, J., Sakaki, K., Saunders, T., Rutkowski, D., Back, S., Kaufman, R. (2006). Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response Cell 124(3): 587-599.

Zheng-Bradley, X., Rung, J., Parkinson, H., Brazma, A. (2010). Large scale comparison of global gene expression patterns in human and mouse Genome Biol 11(12): R124.

Zi, Z., Zhang, Z., Li, Q., An, W., Zeng, L., Gao, D., Yang, Y., Zhu, X., Zeng, R., Shum, W., Wu, J. (2015). CCNYL1, but Not CCNY, Cooperates with CDK16 to Regulate Spermatogenesis in Mouse PLoS Genet 11(8): e1005485.

6.2 Aus Büchern und Sammelwerken

Lippert, H. (2006). Lehrbuch Anatomie. Siebente Auflage, Urban & Fischer Verlag, München und Jena.

Lüllmann-Rauch, R. (2009). Taschenlehrbuch Histologie. Dritte Auflage, Thieme, Stuttgart.

Taylor, M. E., Drickamer K. (2007). Introduction to glycobiology. Zweite Auflage, Oxford University Press, Oxford und New York.

Walquist, M., El-Gewely, R. (2018). Mutagenesis: site-directed. In: Wiley J. (Hrsg.), eLS. Chichester. (Online-Referenzwerk).

Ilacqua A., Francomano D., Aversa A. (2018). The Physiology of the Testis. In: Belfiore A., LeRoith D. (Hrsg.) Principles of Endocrinology and Hormone Action. Endocrinology. Kapitel 17, S. 455-491. Springer, Cham (Schweiz).

7 Anhang

7.1 Ergänzende Tabellen und Abbildungen

```
# WEBSEQUENCE Length: 690
# WEBSEQUENCE Number of predicted TMHs: 8
# WEBSEQUENCE Exp number of AAs in TMHs: 180.59421
# WEBSEQUENCE Exp number, first 60 AAs: 14.95981
# WEBSEQUENCE Total prob of N-in: 0.21996
# WEBSEQUENCE POSSIBLE N-term signal sequence
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 outside 1 3
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 TMhelix 4 23
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 inside 24 190
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 TMhelix 191 213
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 outside 214 260
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 TMhelix 261 283
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 inside 284 284
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 TMhelix 285 307
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 outside 308 326
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 TMhelix 327 349
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 inside 350 383
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 TMhelix 384 406
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 outside 407 449
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 TMhelix 450 467
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 inside 468 479
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 TMhelix 480 502
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 outside 503 690
```

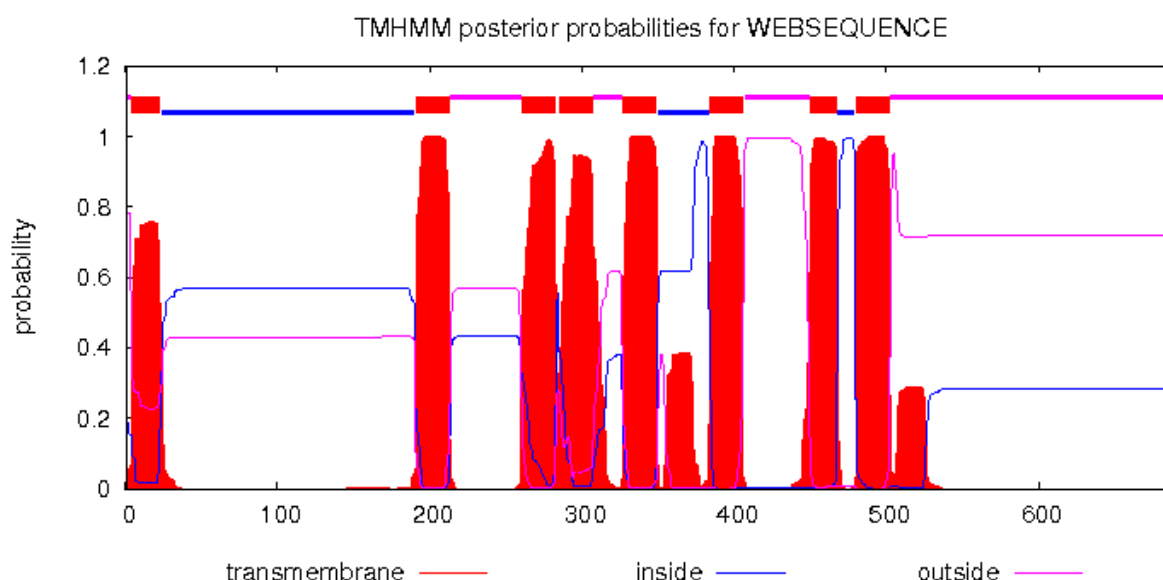


Abbildung 39: Putative Transmembrandomänen der Isoform A des mSPPL2c-Proteins. Mittels der TMHMM-Software (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) wurde anhand der Proteinsequenz der murinen Form von SPPL2c die Positionen von möglichen Transmembrandomänen errechnet. Die am N-Terminus gelegene Transmembrandomäne entspricht nach den Berechnungen wahrscheinlich einem Signalpeptid (Stand: 19.10.2020).

| | | | | |
|-------------|-------------|------------|------------|------------|
| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 |
| MACLGSLHPL | GSLLLLFI LL | SPEARGEY | GLVRVVSKNW | SKDYCVLYSS |
| 60 | 70 | 80 | 90 | 100 |
| DYVNLPRDLH | HAPLLSLHDG | TKTPWCPDED | SFHQAQDSSP | RQRPLHQTTT |
| 110 | 120 | 130 | 140 | 150 |
| MVTRGNC | SYFY | AKGWLAQDQG | AQGLLIVSRA | RNQQCSDTIS |
| 160 | 170 | 180 | 190 | 200 |
| ALTIPVAVLR | YTDMLDIVSH | TYGDTDVRVA | MFAPLEPVT | YNMAIIFILA |
| 210 | 220 | 230 | 240 | 250 |
| VGTVAAAGGYW | AGLMEANKLQ | RRQAQRGGGL | GGHNQQQTVA | AERSQRAWED |
| 260 | 270 | 280 | 290 | 300 |
| DDFEDAPMDF | TPAMTGAVVT | MSCSIMILLY | FFYDCFVYVM | IGIFSLGAST |
| 310 | 320 | 330 | 340 | 350 |
| GLYSCLAPIL | CHLPLWRYQW | VLPQQRVSVT | WPLLLLGLC | AMVTVLWVIH |
| 360 | 370 | 380 | 390 | 400 |
| RNEDHWAWLL | QDTLGVAYCL | FVLRRVRLPT | FKNCTLFLLA | LLAFDVFFVF |
| 410 | 420 | 430 | 440 | 450 |
| ITPLFTKTGE | SIMVEVASGP | ADSSSHERLP | MVLKVPRLSF | SALTLCNQPF |
| 460 | 470 | 480 | 490 | 500 |
| SILGFGD | IVV | PGFLVAYCHR | FDMQVQSRQV | YYMACTVAYA |
| 510 | 520 | 530 | 540 | 550 |
| ILMQMGQPAL | LYLVSTLLT | SLAVATCRQE | FTLFWTGQGR | AKIPAEPVAQ |
| 560 | 570 | 580 | 590 | 600 |
| PCIASAVGSK | MKLEDAKDSR | TTNRFEQAVD | GESGDLESST | GDDMAEMVTL |
| 610 | 620 | 630 | 640 | 650 |
| SEDEATSPEG | HSESSEGWS | TNLDPNELPS | GSPMALEAML | IPLIQPIPHP |
| 660 | 670 | 680 | 690 | |
| SELGHIRTQS | RVHDSSLPWM | GLHKRKGLKV | KKMSAQAPL | |

- Signal Peptid
- N-glykosylierte Aminosäure
- Kritische Aminosäuren des aktiven Zentrums
- Kanonisches ER-Retentionsmotiv

Abbildung 40: Aminosäuresequenz der Isoform A des mSPPL2c-Proteins.

Verschiedene kritische Aminosäuren/Peptide sind farblich hervorgehoben. Eine Erläuterung der einzelnen Farben findet sich unterhalb der Sequenz.

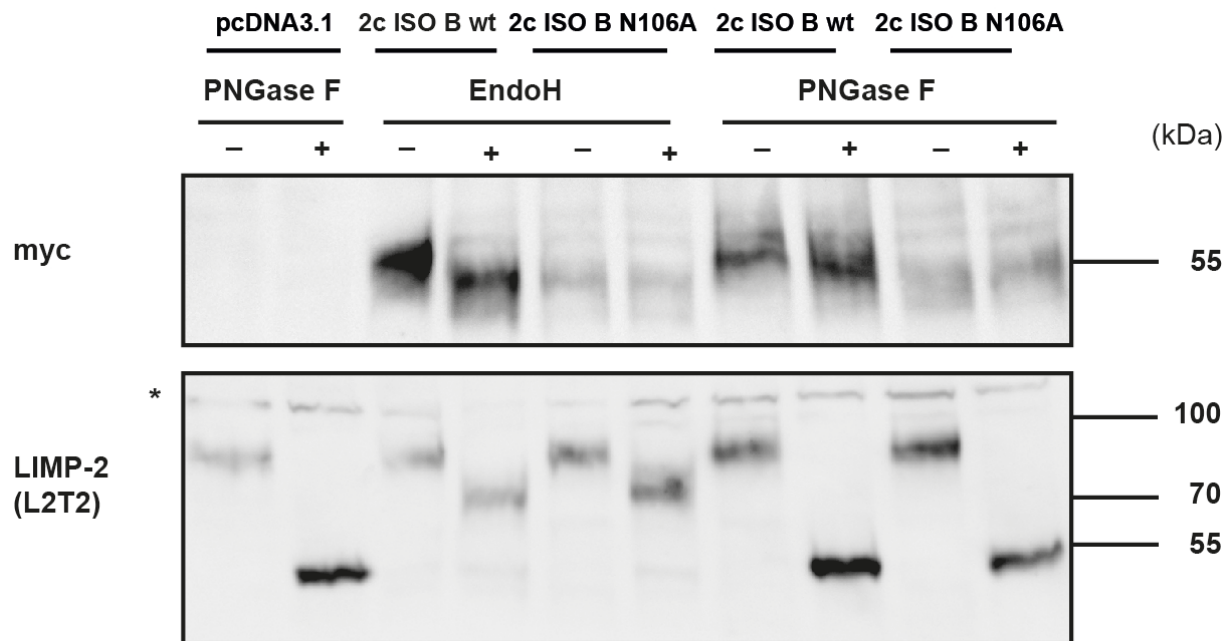


Abbildung 41: Deglykosylierungs-Assay der mutierten mSPPL2c-Isoform B. HEK293-Zellen wurden transient mit Wildtyp- und N106A-mSPPL2c-Isoform-B-Konstrukten transfiziert. An das C-terminale Ende dieser Konstrukte wurde eine Sequenz, die für ein myc-tag kodierte, fusioniert. Nach der Transfektion wurden die Proben lysiert und anschließend mit den angegebenen Deglykosidasen inkubiert. Es erfolgte die Auftrennung des Probenmaterials mittels *Western Blotting*. Die Detektion des SPPL2c-Proteins erfolgte mithilfe des myc-Antikörpers. Zusätzlich wurde das LIMP-2-Protein detektiert, da dieses sowohl komplex- als auch nicht-komplex gebundene N-Zucker aufweist und somit als Kontrolle für eine erfolgreiche Deglykosylierung eingesetzt werden konnte. Abkürzungen: ISO B = mSPPL2c Isoform A, LIMP-2 = *Lysosome membrane protein 2*, wt = Wildtypform des SPPL2c-Proteins, Sterne = unspezifische Antikörperbindungen. Ergänzung zu Abbildung 16.

Die Abbildungen 42-46 zeigen die Proteolyse-Assays der untersuchten Substratkandidaten als Ergänzung der unter Abbildung 17 und 18 gezeigten Ergebnisse:

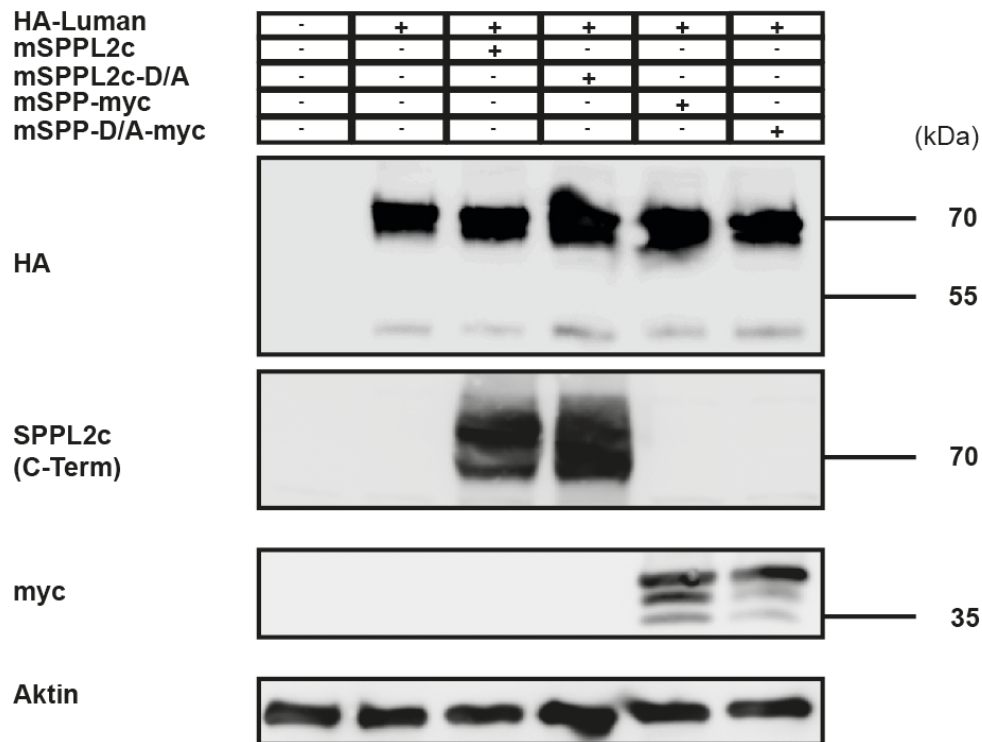


Abbildung 42: Proteolyse-Assay von Luman mit mSPPL2c und SPP. HEK293T-Zellen wurden transient mit HA-getagtem Luman-Konstrukt und proteolytisch aktivem und inaktivem mSPPL2c- und mSPP-Konstrukten transfiziert. Die Zellen wurden 24 h nach der Transfektion lysiert und die zellulären Proteine per SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem *Western Blotting* erfolgte mithilfe des HA-Antikörpers die Detektion des Luman-Proteins. Zusätzlich wurden die koexprimierten Proteasen mit den angegebenen Antikörpern detektiert. Aktin wurde als Ladekontrolle eingesetzt. Sterne = unspezifische Antikörperbindungen.

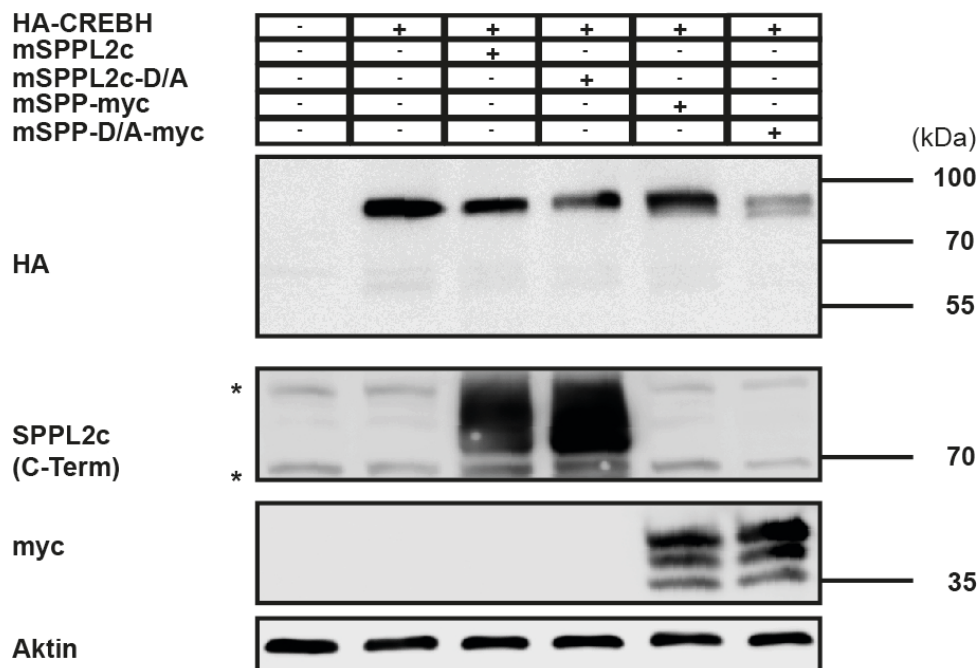


Abbildung 43: Proteolyse-Assay von CREBH mit mSPPL2c und SPP. Es erfolgte eine transiente Transfektion von HEK293T-Zellen mit HA-getaggttem CREBH-Konstrukt und proteolytisch aktivem bzw. inaktivem mSPPL2c- und mSPP-Konstrukten. Nach 24h wurden die Zellen lysiert und die zellulären Proteine per SDS-PAGE aufgetrennt. Im Anschluss an das *Western Blotting* erfolgte mithilfe des HA-Antikörpers die Detektion des CREBH-Proteins. Zudem wurden die koexprimierten Proteasen mit den angegebenen Antikörpern detektiert. Aktin wurde als Ladekontrolle detektiert. Sterne = unspezifische Antikörperbindungen.

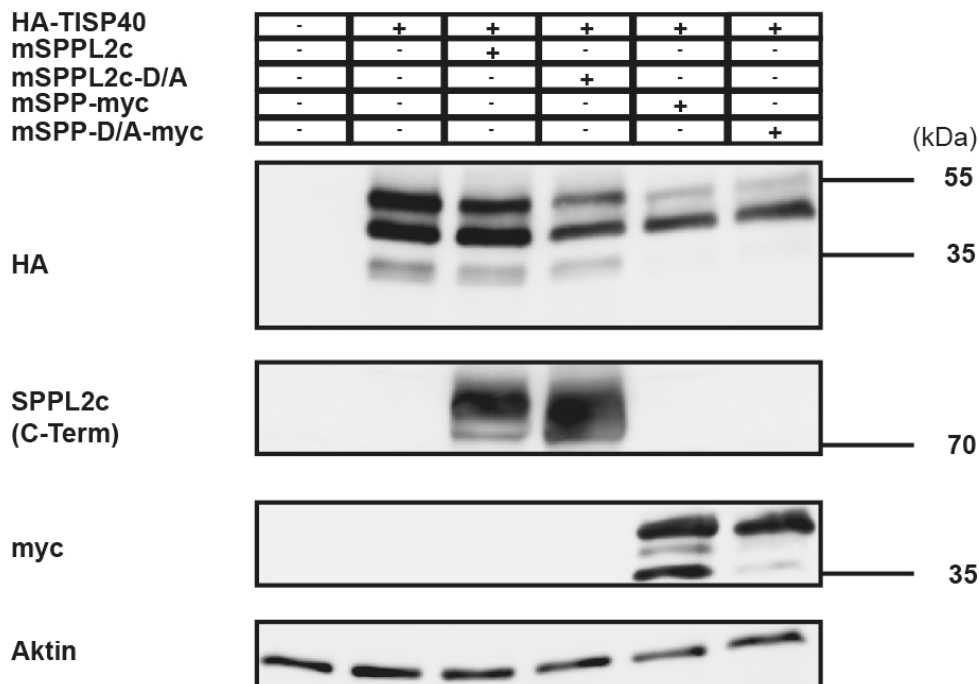


Abbildung 44: Proteolyse-Assay zu TISP40 mit mSPPL2c und SPP. HEK293T-Zellen wurden transient mit HA-getaggttem TISP40-Konstrukt sowie proteolytisch aktivem und inaktivem mSPPL2c- und mSPP-Konstrukten transfiziert. Im Anschluss wurden die Zellen lysiert und die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem *Western Blotting* erfolgte die Detektion des TISP40-Proteins. Zusätzlich wurden die koexprimierten Proteasen mit den angegebenen Antikörpern detektiert. Aktin wurde als Ladekontrolle eingesetzt und zeigt eine gleichmäßige Verteilung der Probenvolumina, Sterne = unspezifische Antikörperbindungen.

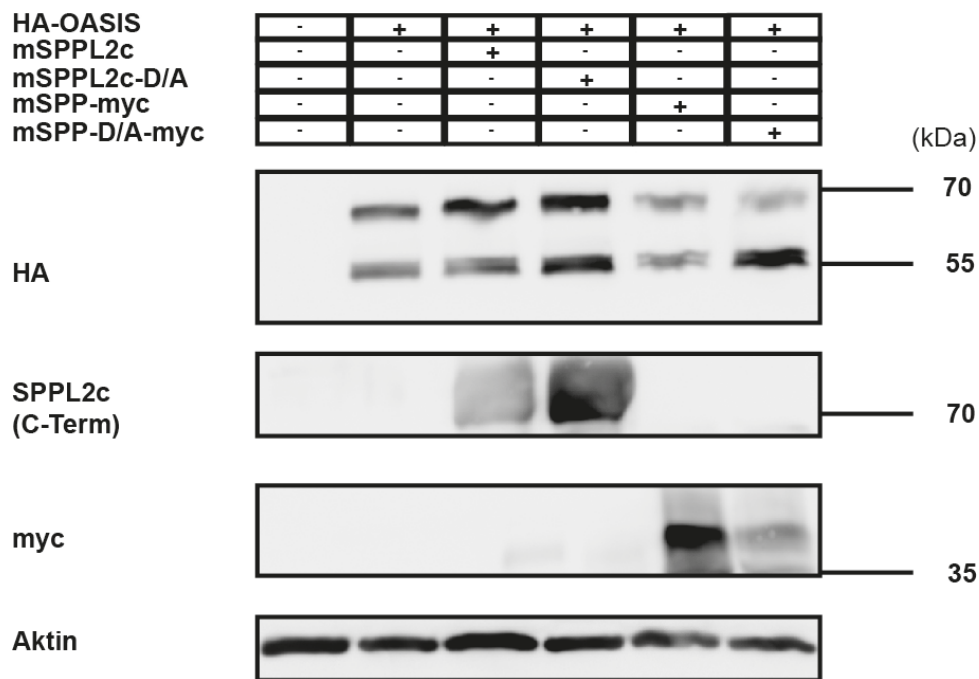


Abbildung 45: Proteolyse-Assay zu OASIS mit mSPPL2c und SPP. Es erfolgte eine transiente Transfektion von HEK293T-Zellen mit HA-getagtem OASIS-Konstrukt und proteolytisch aktivem bzw. inaktivem mSPPL2c- und mSPP-Konstrukten. Nach 24h wurden die Zellen lysiert und die zellulären Proteine per SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem *Western Blotting* wurden mittels des HA-Antikörper das OASIS-Protein detektiert. Zudem die Detektion der koexprimierten Proteasen mit den angegebenen Antikörpern. Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. Sterne = unspezifische Antikörperbindungen.

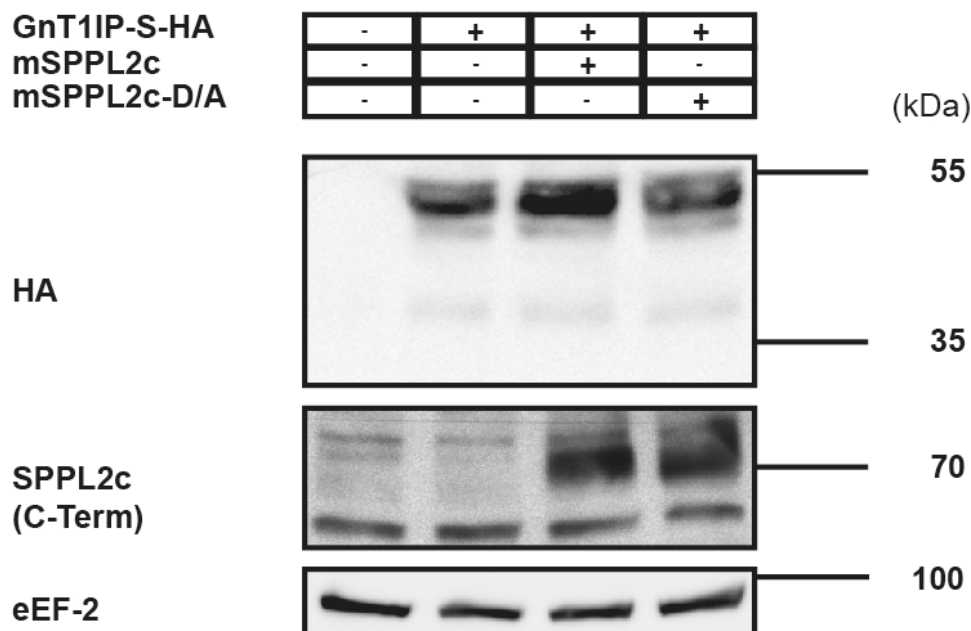


Abbildung 46: Proteolyse-Assay zu GnT1IP-S mit mSPPL2c. Für die Untersuchung wurden HEK293T-Zellen über Nacht mit Konstrukten des GnT1IP-Proteins transient transfiziert. Zusätzlich wurde je ein Ansatz mit Konstrukten, die für proteolytisch aktive bzw. inaktive SPPL2c-Protease kodierten, transfiziert. Nach der Transfektion wurden die in Proben enthaltenen Proteine mittels SDS-PAGE separiert. Es erfolgte die Übertragung auf eine Nitrocellulosemembran und die Detektion der jeweiligen Proteine mittels den angegebenen Antikörper. EEF-2 wurde als Ladekontrolle verwendet. Diese Abbildung ist eine Ergänzung zu Abbildung 18.

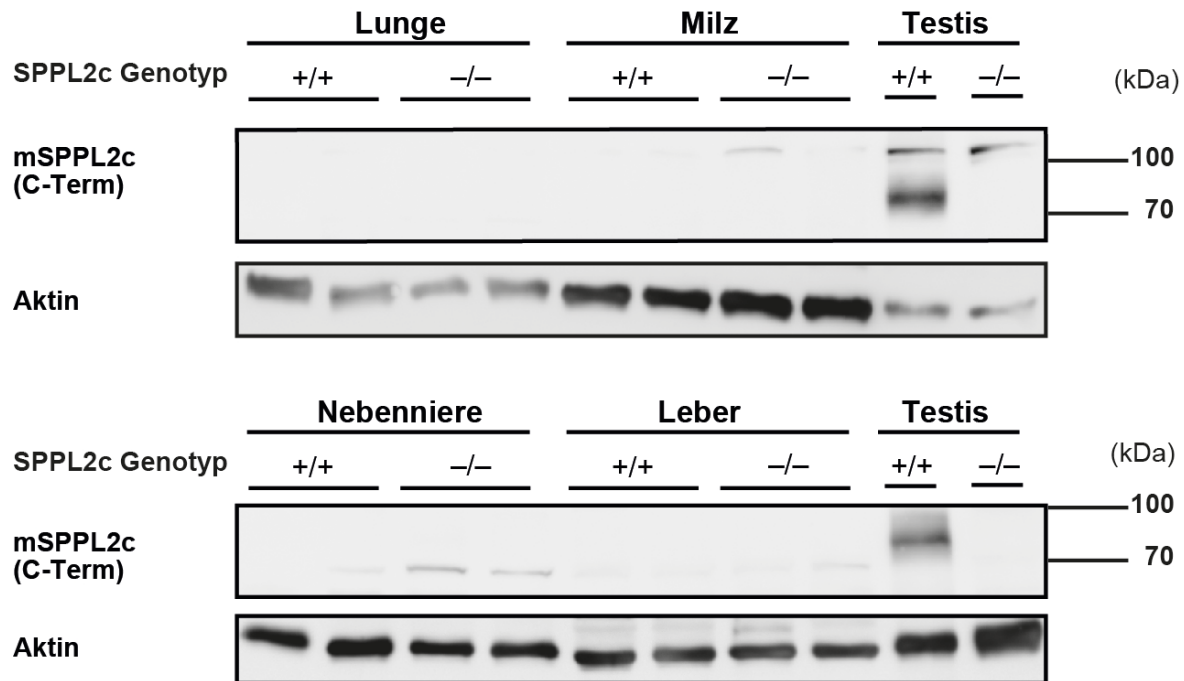


Abbildung 47: Expressionsanalyse von SPPL2c in Mausorganen. Aus den angegebenen Organen von Wildtyp- und SPPL2c-defizienten Mäusen wurden Totallysate gewonnen. Die in den Proben enthaltenen Proteine wurden mittels *Western Blotting* separiert. Anschließend erfolgte die Detektion des SPPL2c-Proteins mithilfe des C-Terminalen Antikörpers. Die Abbildung ist eine Ergänzung zu Abbildung 19. Sterne = unspezifische Antikörperbindungen.

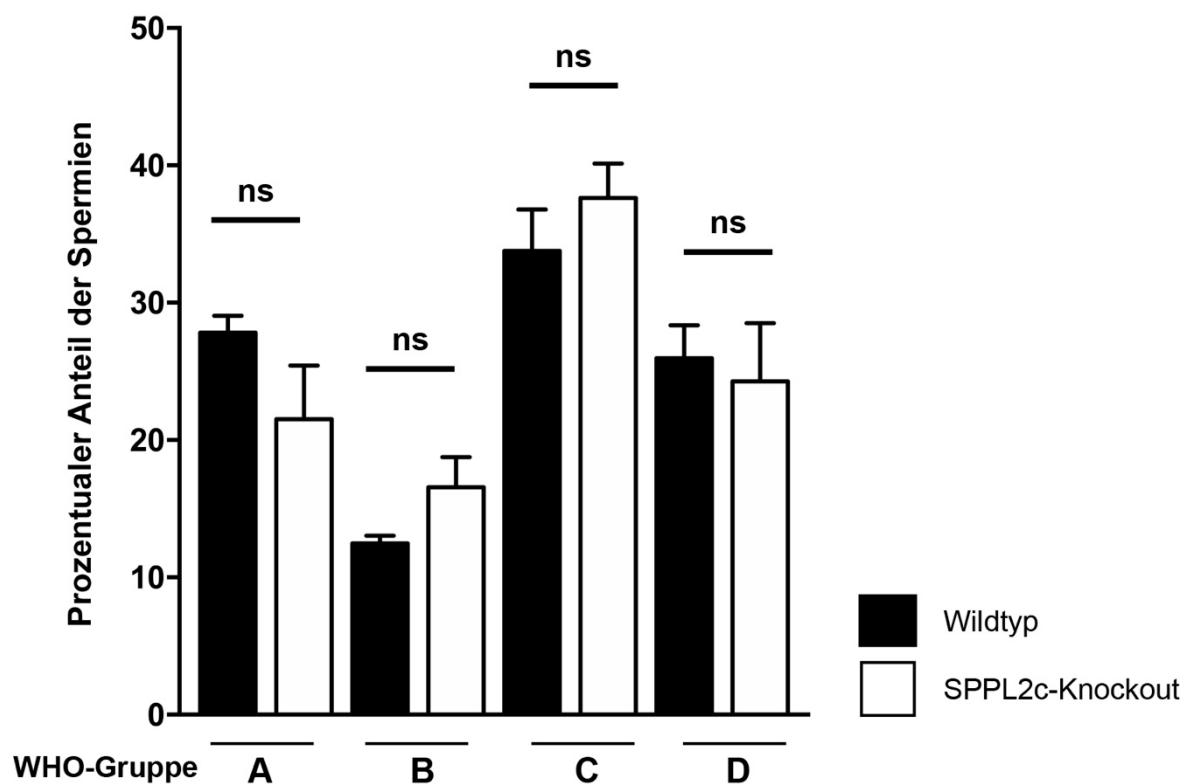


Abbildung 48: CASA-Messungen aus Wildtyp und mSPPL2c^{-/-}-Tieren. Pro Tier wurden mindestens 200 Spermien hinsichtlich ihrer Beweglichkeit analysiert. Zu den Definitionen der einzelnen WHO-Gruppen siehe Tabelle 28. Abkürzungen: wt = Wildtyp, ko = mSPPL2c-Knockout, n = 3, ns = statistisch nicht signifikant. Zur statistischen Analyse wurde ein *student's t-Test* durchgeführt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.

| Konstrukt | Sequenz der <i>Primer</i> |
|-------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| mSPPL2c-Iso-A-D457A | fw: CCCTTCTCCATCCTTGGCTTTGGGGCCATTGTTGTCCCTGGCTTCCTAGTGGC C rv: GGCCACTAGGAAGCCAGGGACAACAATGGCCCCAAAGCCAAGGATGGAGAAGG G |
| mSPPL2c-Iso-B-myc | fw: GATCGGATCCACGCCACCATGGCATGCCTGGGTTCCCTCCA rv: GATCTCTAGATCACAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTTCACAAAATCT TCCTCAGGCATCCTGTTGGTTGTACGGGAATC |
| mSPPL2c-Iso-B-N106A-myc | fw: CCCTTCTCCATCCTTGGCTTTGGGGCCATTGTTGTCCCTGGCTTCCTAGTGGC rv: GATCTCTAGATCACAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTTCACAAAATCT TCCTCAGGCATCCTGTTGGTTGTACGGGAATC |

7.2 Abbildungsverzeichnis

| Nummer | Titel |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Abbildung 1 | Regulierte Intramembranproteolyse. |
| Abbildung 2 | Schematische Darstellung des mSPPL2c-Gens auf dem langen Arm des Chromosom 11. |
| Abbildung 3 | Überblick über die Spermatogenese. |
| Abbildung 4 | Generierung der SPPL2c ^{-/-} -Maus. |
| Abbildung 5 | Überblick über die Geschwindigkeitsparameter der CASA-Messungen. |
| Abbildung 6 | Schematischer Überblick über Antigendetektierung mittels DAB. |
| Abbildung 7 | Schematische Darstellung der <i>site-directed mutagenesis</i> . |
| Abbildung 8 | Epitope der mSPPL2c-detektierenden Antikörper. |
| Abbildung 9 | Überexpression der mSPPL2c-Isoformen. |
| Abbildung 10 | Indirekte Immunofluoreszenz von mSPPL2c überexprimierenden Zellen. |
| Abbildung 11 | Kolokalisationsfärbung der mSPPL2c-Isoformen mit Antikörpern gegen das ER-Retentionsmotiv KDEL. |
| Abbildung 12 | Immunfluoreszenzfärbung von HeLa-Zellen mit mSPPL2c-Isoformen und ERGIC53. |

| Nummer | Titel |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Abbildung 13 | Vergleich der zellulären Lokalisation der murinen SPPL2c-Isoformen mit GM-130. |
| Abbildung 14 | Deglykosylierung beider mSPPL2c-Isoformen mit Endo H und PNGase F. |
| Abbildung 15 | Ergebnis der Analyse der Proteinsequenz von mSPPL2c Isoform A mittels NetNGlyc 1.0. |
| Abbildung 16 | Deglykosylierung der mSPPL2c-N106A-Mutante. |
| Abbildung 17 | Proteolyse-Assay von BBF2H7 bei Koexpression mit mSPPL2c und mSPP. |
| Abbildung 18 | Proteolyse-Assay von GnT1IP-L bei Koexpression mit mSPPL2c. |
| Abbildung 19 | Expressionsanalyse von SPPL2c in Mausorganen. |
| Abbildung 20 | <i>Western Blot</i> zur Detektion von SPPL2c im männlichen und weiblichen Reproduktionsgewebe. |
| Abbildung 21 | Vergleich der mSPPL2c-Konstrukte mit dem <i>in vivo</i> exprimierten Protein. |
| Abbildung 22 | mRNA-Expressionsanalyse aus murinen Organen. |
| Abbildung 23 | mRNA-Expressionanalyse aus murinem Reproduktionsgewebe und Herzen. |
| Abbildung 24 | Enzymatische Deglykosylierung von Hodentotallysaten. |
| Abbildung 25 | Dichtegradientenzentrifugation des postnukleären Überstandes eines Mäusehodens. |
| Abbildung 26 | Altersabhängigkeit der Expression von SPPL2c im Testis. |
| Abbildung 27 | Detektion der β -Galaktosidase aus Hodentotallysaten. |
| Abbildung 28 | Histochemische Darstellung der β -Galaktosidase-Aktivität in Wildtyp- und SPPL2c ^{-/-} -Mäusen. |
| Abbildung 29 | Immunhistochemische Detektion von mSPPL2c in murinem Hodengewebe. |
| Abbildung 30 | Übersichtsaufnahmen aus Hoden von Wildtyp- und SPPL2c-defizienten Mäusen. |
| Abbildung 31 | Hoden-/Körpergewicht-Quotient von Wildtyp- und mSPPL2c ^{-/-} -Mäusen. |
| Abbildung 32 | Durchflusszytometrische Analyse der Zellpopulationen im Hodengewebe. |
| Abbildung 33 | Anzahl der elongierten Spermatischen in Wildtyp- und mSPPL2c-defizienten Mäusen. |
| Abbildung 34 | Wurfgrößenanalyse der Verpaarungen von Mäusen mit verschiedenen SPPL2c-Genotypen. |

| Nummer | Titel |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| Abbildung 35 | Mikroskopische Aufnahme repräsentativer Spermien aus Wildtyp- und SPPL2c-Knockout-Tieren. |
| Abbildung 36 | Motilitätsmessungen von isolierten Spermien. |
| Abbildung 37 | Expression von mSPPL2a und mSPPL2b im Testis. |
| Abbildung 38 | Immunhistochemische Detektion der SPP-Protease im Hoden. |
| Abbildung 39 | Putative Transmembrandomänen der Isoform A des mSPPL2c-Proteins. |
| Abbildung 40 | Aminosäuresequenz der Isoform A des mSPPL2c-Proteins. |
| Abbildung 41 | Deglykosylierungs-Assay der mutierten mSPPL2c-Isoform B. |
| Abbildung 42 | Proteolyse-Assay von Luman mit mSPPL2c und SPP. |
| Abbildung 43 | Proteolyse-Assay von CREBH mit mSPPL2c und SPP. |
| Abbildung 44 | Proteolyse-Assay zu TISP40 mit mSPPL2c und SPP. |
| Abbildung 45 | Proteolyse-Assay zu OASIS mit mSPPL2c und SPP. |
| Abbildung 46 | Proteolyse-Assay zu GnT1IP-S mit mSPPL2c. |
| Abbildung 47 | Expressionsanalyse von SPPL2c in Mausorganen. |
| Abbildung 48 | CASA-Messungen aus Wildtyp und mSPPL2c ^{-/-} -Tieren. |

7.3 Tabellenverzeichnis

| Nummer | Titel |
|------------|------------------------------------------------------|
| Tabelle 1 | Vergleich der SPPL2-Proteasen. |
| Tabelle 2 | Überblick über die verwendeten Chemikalien. |
| Tabelle 3 | Überblick über die verwendeten Gerätschaften. |
| Tabelle 4 | Überblick über die verwendeten Labormaterialien. |
| Tabelle 5 | Überblick über die verwendeten Computerssoftwares. |
| Tabelle 6 | Überblick über die verwendeten Kits. |
| Tabelle 7 | Liste der verwendeten Zelllinien. |
| Tabelle 8 | Liste der verwendeten Konstrukte. |
| Tabelle 9 | Zusammensetzung des modifizierten Zellkulturmediums. |
| Tabelle 10 | Zusammensetzung des PBS-Puffers. |
| Tabelle 11 | Zusammensetzung des PBS / Complete. |
| Tabelle 12 | Zusammensetzung des Lysispuffers. |
| Tabelle 13 | Zusammensetzung des SDS-PAGE-Probenpuffers. |

| Nummer | Titel |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Tabelle 14 | Zusammensetzung der SDS-Gele. |
| Tabelle 15 | Zusammensetzung des Sammelgelpuffers. |
| Tabelle 16 | Zusammensetzung des Trenngelpuffers. |
| Tabelle 17 | Zusammensetzung des Elektrophoresepuffers. |
| Tabelle 18 | Zusammensetzung des Semidry-Transferpuffers. |
| Tabelle 19 | Zusammensetzung der für die Proteindetektion verwendeten Puffer. |
| Tabelle 20 | Liste der verwendeten Primärantikörper. |
| Tabelle 21 | Liste der verwendeten Sekundärantikörper |
| Tabelle 22 | Zusammensetzung der ECL-Lösungen. |
| Tabelle 23 | Zusammensetzung des <i>Amersham ECL Advance Western Blotting Detection Reagents</i> . |
| Tabelle 24 | Zusammensetzung des Glycin-Elutions-Puffers. |
| Tabelle 25 | Übersicht über die zur Deglykosylierung verwendeten Puffer. |
| Tabelle 26 | Zusammensetzung der zur Dichtegradientenzentrifugation eingesetzten Lösungen. |
| Tabelle 27 | Zusammensetzung des FACS-Puffers. |
| Tabelle 28 | Zusammensetzung des <i>Swim-Out</i> -Puffers. |
| Tabelle 29 | WHO-Referenzkriterien zur Spermienbeweglichkeit. |
| Tabelle 30 | Überblick über die zur Immunfluoreszenzfärbung verwendeten Lösungen. |
| Tabelle 31 | Zusammensetzung des Phosphatfixationspuffers. |
| Tabelle 32 | Überblick über die verwendeten Puffer zur DAB-Färbung. |
| Tabelle 33 | Überblick über die verwendeten X-Gal-Puffer. |
| Tabelle 34 | Zusammensetzung des TAE-Puffers. |
| Tabelle 35 | Zusammensetzung des Klonierungs-PCR-Ansatzes. |
| Tabelle 36 | Temperaturprofil des Klonierungs-PCR-Ansatzes. |
| Tabelle 37 | Zusammensetzung des PCR-Ansatzes für die Mutagenese. |
| Tabelle 38 | Temperaturprofil des PCR-Ansatzes für die Mutagenese. |
| Tabelle 39 | Temperaturprofil des RT-PCR-Ansatzes. |
| Tabelle 40 | Sequenzen der zur RT-PCR eingesetzten <i>Primer</i> . |
| Tabelle 41 | Pipettierschema des Restriktionsverdauansatzes. |
| Tabelle 42 | Pipettierschema des Ligationsansatzes. |
| Tabelle 43 | Zusammensetzung des LB-Mediums. |
| Tabelle 44 | Sequenzen der zur Klonierung verwendeten <i>Primer</i> . |

8 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Johannes Niemeyer, dass die vorliegende Arbeit selbstständig von mir verfasst wurde und keine weiteren als die darin angegebenen Quellen und Hilfsmittel Verwendung fanden. Die vorliegende Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln zur guten wissenschaftlichen Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden.

Diese Arbeit wurde bisher weder ganz noch in Auszügen an einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Ferner erkläre ich, dass ich noch keine früheren Promotionsversuche unternommen habe.

Leipzig, den

.....

(Johannes Niemeyer)

9 Danksagung

Im Laufe dieser Promotion habe ich mit so vielen helfenden Menschen zu tun gehabt, dass bei einer Aufzählung zwangsläufig nicht alle erwähnt werden können. Versuchen möchte ich es trotzdem:

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. Paul Saftig für die Möglichkeit der Durchführung des Promotionsvorhabens. Durch seine zahlreichen Vorschläge und Anregungen im Rahmen von wissenschaftlichen Diskussionen leistete er einen gewichten Beitrag, um das Projekt erfolgreich durchzuführen.

Ich möchte mich besonders bei Prof. Dr. Bernd Schröder bedanken, der es mir ermöglichte, mich wissenschaftlich mit diesem Thema auseinanderzusetzen. Mit seiner effektiven Betreuung, seiner Geduld und seinem Enthusiasmus war seine Betreuung in allen Phasen der Promotion eine wertvolle Unterstützung. Von seiner präzisen und gewissenhaften Arbeit konnte ich – nicht nur für das wissenschaftliche Arbeiten – viel lernen. Die Zeit im Labor der AG Schröder wird mir in guter Erinnerung bleiben.

Aus der AG Schröder möchte ich mich besonders bei Dr. rer. nat. Torben Mentrup bedanken. Seine Leidenschaft für das experimentelle Arbeiten im Labor war ansteckend. Auch für die großen und die kleinen Fragen eines Laborneulings hatte er immer ein offenes Ohr. Seine Passion für einen gewissen Verein aus dem Ruhrgebiet ist mir in bleibender Erinnerung geblieben.

Aber auch allen weiteren Mitgliedern der AG Schröder möchte ich danken, für ihre Hilfe, Vorschläge, Kritik, ihren Humor. Besonders möchte ich mich dabei bei Sebastian Held für die exzellente technische Betreuung bedanken.

Aus dem Anatomischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel bedanke ich mich bei Prof. Dr. Lüllmann-Rauch für ihre kompetente Hilfe bei histologischen Fragestellungen. Für die technische Unterstützung durch Frau Niemeier und Frau Facompré bin ich sehr dankbar. Ich bedanke mich zudem bei der AG Wennemuth von der Universität Duisburg-Essen sowie bei der AG Meinhardt von der Universität Gießen für die Durchführung bzw. Hilfestellung bei speziellen Untersuchungen.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und Freunden bedanken. Ohne diese wichtigste Unterstützung wäre nichts möglich gewesen.

10 Lebenslauf

Name: Johannes Christoph Matthias Niemeyer
Geburtsdatum: 29.11.1992
Geburtsort: Göttingen

STUDIUM UND SCHULAUSBILDUNG

| | |
|-------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| 10/2012 – 05/2020 | Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel |
| 05/2020 | Drittes Staatsexamen |
| 04/2019 | Zweites Staatsexamen |
| 09/2014 | Erstes Staatsexamen |
| 05/2012 | Abitur am Theodor-Heuss-Gymnasium Göttingen |

BERUFSERFAHRUNG

PRAKTISCHES JAHR

| | |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 01/2020 – 04/2020 | Klinik für Kinder- und Jugendmedizin I des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel (Pädiatrie) |
| 09/2019 – 12/2019 | Hadassah Medical Center der Hebrew University of Jerusalem, Campus Ein Kerem, Jerusalem (Chirurgie) |
| 05/2019 – 09/2019 | Imland Klinik Rendsburg (Innere Medizin) |

DISSERTATION

| | |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 10/2015 – 10/2016 | Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Institut für Biochemie Doktorvater: Prof. Dr. Paul Saftig Titel: „Funktionelle Charakterisierung der Intramembranprotease SPPL2c“ |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

PUBLIKATIONEN

04/2019 Niemeyer J*, Mentrup T*, Heidasch R*, Mueller S, Meyer R, Papadopoulou A, Dederer V, Haug-Kroeper M, Adamski V, Luellmann-Rauch R, Bergmann M, Mayerhofer A, Saftig P, Wennemuth G, Fluhrer R, Lichtenthaler SF, Lemberg MK, Schroeder B: The intramembrane protease SPPL2c promotes male germ cell development by cleaving phospholamban.
EMBO Rep (2019) 20: e46449 DOI: 10.15252/embr.201846449

* geteilte Erstautorenschaft

04/2019 Papadopoulou A, Mueller S, Mentrup T, Shmueli D, Niemeyer J, Haug-Kröper M, von Blume J, Mayerhofer A, Feederle R, Schroeder B, Lichtenthaler S, Fluhrer R: Signal Peptide-Peptidase-Like 2c (SPPL2c) impairs vesicular transport by cleavage of SNARE proteins.
EMBO Rep (2019) 20: e46451 DOI: 10.15252/embr.201846451

STIPENDIEN

09/2019 – 12/2019 Stipendium zur Förderung der Ableistung des Praktischen Jahres im Ausland der Medizinischen Fakultät zu Kiel

09/2015 – 09/2016 Promotionsstipendium des Graduiertenkollegs des Sonderforschungsbereichs 877

08/2009 – 08/2010 Rotary International Stipendium, Schuljahr in Medellín, Kolumbien