

Aus dem Biochemischen Institut
(Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Christoph Becker-Pauly)
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Proteolytische Spaltung des *Triggering
receptor expressed on myeloid cells 2*
(TREM2) durch die Metalloprotease
Meprin β

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Luisa Wessolowski

aus Hamburg

Kiel, 2023

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Christoph Becker-Pauly

2. Berichterstatterin: Prof. Dr. Franziska Theilig

Tag der mündlichen Prüfung: 14.06.2024

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 05.03.2024

gez.: Prof. Dr. Christoph Becker-Pauly
(Vorsitzende/r der Prüfungskommission)

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass meine Dissertation, abgesehen von Ratschlägen meines Betreuers und meiner sonstigen akademischen Lehrer, nach Form und Inhalt meine eigene Arbeit ist, dass ich keine anderen als die in der Arbeit aufgeführten Quellen und Hilfsmittel genutzt habe, und dass meine Arbeit bisher keiner anderen akademischen Stelle als Dissertation vorgelegen hat, weder ganz noch in Teilen.

Kiel, den 20.06.2024

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Morbus Alzheimer	1
1.2 <i>Triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2)</i>	3
1.3 Meprin β	6
1.4 Ziel der Arbeit.....	9
2 Material und Methoden.....	10
2.1 Material	10
2.1.1 Chemikalien	10
2.1.2 Puffer.....	10
2.1.3 Zelllinien	12
2.1.4 Plasmide	12
2.1.5 Antikörper	13
2.1.6 Inhibitoren	14
2.2 Methoden	14
2.2.1 Zellkultur.....	14
2.2.2 Transiente Transfektion	15
2.2.3 Zellyse und BCA (Bicinchoninsäure-Assay).....	15
2.2.4 Zellyse für die Membranfraktionierung	15
2.2.5 Fällung der Überstände mit Conavalin A.....	16
2.2.6 SDS-PAGE, <i>Western Blotting</i> und Coomassie-Färbung.....	16
2.2.7 Immunopräzipitation.....	17
2.2.8 <i>In vitro</i> -Verdau von rekombinantem TREM2.....	17
2.2.9 PNGase F-Verdau.....	18
2.2.10 Identifizierung proteolytischer Spaltstellen durch Massenspektrometrie	18
2.2.11 Präparation primärer muriner Makrophagen	19
2.2.12 ELISA	19
2.2.13 Hitzeschocktransformation und Midi-Präparation	19
3 Ergebnisse.....	21
3.1 Meprin β spaltet TREM2 <i>in vitro</i>	21
3.2 sMeprin β spaltet membrangebundenes TREM2.....	23

3.3	Einfluss von membrangebundenem Meprin β auf TREM2 ist nicht eindeutig zu bestimmen.....	24
3.4	sMeprin β spaltet TREM2 zwischen Arginin 136 und Asparaginsäure 137	27
3.5	Meprin β beeinflusst sTREM2 Level <i>in vivo</i>	31
3.6	Shedding von TREM2 H157Y wird durch Meprin β gesteigert.....	34
3.7	Das Shedding von TREM2 wird neben ADAM10, ADAM17 und Meprin β noch von weiteren Proteasen beeinflusst	35
4	Diskussion	38
4.1	Meprin β ist ein proteolytischer Regulator des TREM2.....	38
4.2	Beeinflusst Meprin β durch das TREM2-Cleavage die Pathogenese des Morbus Alzheimer?	41
4.3	Beeinflusst Meprin β durch das TREM2-Cleavage die Pathogenese anderer immunologischer Erkrankungen?.....	42
5	Zusammenfassung	45
6	Literaturverzeichnis	47
7	Anhänge.....	57
7.1	Publizierter Fachartikel.....	57
7.2	Danksagung	70

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Proteolytische Prozessierung von APP	2
Abbildung 2: Struktur und Interaktionspartner von TREM2	3
Abbildung 3: Shedding von TREM2 durch ADAM10	6
Abbildung 4: Domänenstruktur und präferierte Spaltstellen von Meprin β	7
Abbildung 5: Spaltung von rekombinatem TREM2 durch lösliches Meprin β	21
Abbildung 6: Zeitabhängige Spaltung des rekombinanten TREM2 durch sMeprin β	22
Abbildung 7: Deglykosylierung des rekombinanten TREM2	23
Abbildung 8: sMeprin β spaltet TREM2 in HEK293T ADAM10/17 ^{-/-} Zellen	24
Abbildung 9: Membrangebundenes Meprin β spaltet TREM2	25
Abbildung 10: Immunopräzipitation von Meprin β und TREM2	27
Abbildung 11: Darstellung der für die massenspektrometrische Analyse verwendeten Proben im Coomassie-Gel	28
Abbildung 12: Darstellung der mittels Massenspektrometrie detektierten Peptide	29
Abbildung 13: Die Hauptspaltstelle von Meprin β befindet sich zwischen Arginin 136 und Asparaginsäure 137	30
Abbildung 14: Signifikant weniger sTREM2 im Serum von Meprin β Knock-out Mäusen im Vergleich zu wildtypischen Mäusen	31
Abbildung 15: Charakterisierung der LysM-Cre Meprin β Knock-In Mäuse	32
Abbildung 16: Analyse des sTREM im Überstand von Meprin β überexprimierenden und wildtypischen <i>bone-marrow derived macrophages</i>	33
Abbildung 17: Co-Expression von wildtypischem TREM2, R47H TREM2 und H157Y TREM2 mit Meprin β	35
Abbildung 18: Identifizierung von zusätzlichen TREM2 Proteasen mittels Proteaseinhibitoren	37

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung der verwendeten Puffer	10
Tabelle 2: Verwendete Zelllinien	12
Tabelle 3: Plasmide für die transiente Transfektion	12
Tabelle 4: Primärantikörper	13
Tabelle 5: Sekundärantikörper	13
Tabelle 6: Verwendete Inhibitoren	14

Abkürzungsverzeichnis

ADAM	<i>A disintegrin and metalloprotease domain containing protein</i>
Amp	Ampicillin
BMDM	<i>bone-marrow derived macrophages</i>
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CTFs	C-terminale Fragmente
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
Da	Dalton
DAPT	N-(N-(3,5-Difluorphenacetyl)-L-alanyl)-S-phenylglycine t-butyl ester
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	<i>et alii</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell scanning</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
x g	<i>Units of times gravity</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunden
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-1-Ethansulfonsäure
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
m	Murin
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
rpm	Rounds per minute
TBS (-T)	<i>TRIS-buffered saline (+Tween)</i>
TREM2	<i>Triggering receptor expressed on myeloid cells 2</i>
qPCR	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

1 Einleitung

Seit einigen Jahren werden in genomweiten Assoziationsstudien (GWAS-Studien) immer neue Risikogene für neurodegenerative Erkrankungen gefunden. Im Jahre 2050 werden voraussichtlich über 100 Millionen Menschen und damit einer von 85 Menschen der Weltbevölkerung von Morbus Alzheimer betroffen sein (Brookmeyer et al., 2007). Für diese Erkrankung gehört neben dem *Amyloid Precursor Protein* (APP) (Goate et al., 1991) und dem ApoE ϵ 4-Allel (Strittmatter et al., 1993) auch das TREM2-Gen zu den Risikogenen (Guerreiro et al., 2013; Jonsson et al., 2013). In dieser Arbeit wird der Einfluss der Metalloprotease Meprin β auf das Protein TREM2 untersucht.

1.1 Morbus Alzheimer

Morbus Alzheimer zeichnet sich durch eine progrediente Verschlechterung der kognitiven Leistungsfähigkeit aus. Dazu zählen eine zunehmende Störung der Merkfähigkeit, Orientierungsschwierigkeiten, Wortfindungsstörungen sowie Schwierigkeiten beim Rechnen, Lesen und Schreiben. Neben den kognitiven Veränderungen können auch nicht kognitive Symptome auftreten. Diese umfassen unter anderem Antriebsmangel, psychomotorische Unruhe, Schlafstörungen, Ängstlichkeit und Depressivität. Die Persönlichkeit, äußere Haltung und das gemüthafte Erleben bleiben hingegen lange erhalten. Die Erkrankung nimmt meist einen raschen Verlauf und führt nach 4-5 Jahren zur schweren Demenz (Hacke, 2016). Als neuroanatomisches Korrelat lässt sich bei den Patienten makroskopisch eine Atrophie der Hirnrinde feststellen. Mikroskopisch finden sich zum einen intrazelluläre Neurofibrillen, welche aus dem Tau-Protein bestehen, zum anderen extrazelluläre Plaques im Hippocampus, im Cortex und in anderen Hirnregionen (Hacke, 2016).

Das Lebensalter ist einer der Hauptrisikofaktoren für die Alzheimer-Erkrankung. Für Menschen über 85 Jahren beträgt das Risiko an Morbus Alzheimer zu erkranken, nahezu 45% (Alzheimer's association, 2012). Da die Weltbevölkerung infolge von besserer medizinischer Versorgung, besseren Hygienestandards und besserer Ernährung immer älter wird, wird damit einhergehend auch die Prävalenz von Morbus Alzheimer weiter steigen. Neben dem Lebensalter gibt es auch genetische Risikofaktoren für die Entstehung der Alzheimer-Erkrankung. Das am besten charakterisierte Risikogen ist das ϵ 4 Allel des ApoE-Gens (Strittmatter et al., 1993). Träger dieses Allels haben eine dreifach erhöhte Wahrscheinlichkeit an Morbus Alzheimer zu erkranken. Die genaue Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung ist jedoch noch immer nicht bekannt. Hinweise darauf, welche biologischen Vorgänge betroffen sein könnten, geben jedoch die in den Risikogenen transkribierten Proteine. So gibt es vom *Amyloid Precursor Protein* (APP) mehrere Varianten, welche mit einem erhöhten Risiko für Morbus Alzheimer einhergehen (Citron et al., 1992). APP ist ein Transmembranprotein,

welches an der Zellmembran mehreren proteolytischen Prozessierungen unterliegt. Dabei gibt es zwei unterschiedliche Wege der Prozessierung. In dem amyloidogenen Weg wird das APP erst durch eine β -Sekretase (vor allem BACE1) innerhalb der Ektodomäne gespalten. In einem zweiten Schritt wird das verbleibende Fragment innerhalb der Membran durch die γ -Sekretase geschnitten, wodurch ein Amyloid β ($A\beta$)-Peptid entsteht, welches mit weiteren $A\beta$ -Peptiden aggregiert und dadurch die auffälligen extrazellulären Proteinablagerungen ($A\beta$ -Plaques) bilden kann, welche sich mikroskopisch in den Gehirnen von Morbus Alzheimer-Patienten finden lassen. In dem nicht-amyloidogenen Weg hingegen wird das APP zuerst von einer α -Sekretase (ADAM10) innerhalb der $A\beta$ Domäne gespalten, wodurch es trotz nachfolgender Prozessierung durch die γ -Sekretase nicht zu einer Generierung von $A\beta$ -Peptiden kommen kann (Andrew et al., 2016) (Abb. 1). Seit der Entdeckung der $A\beta$ -Plaques wurde an ihrer Entstehung und den damit verbundenen Konsequenzen sehr intensiv geforscht. Allerdings wurde infolgedessen auch ersichtlich, dass diese nicht die einzige Ursache der Alzheimer-Erkrankung sind. Vielmehr ist es ein komplexes Zusammenspiel vieler Faktoren, auf die sowohl Genetik als auch Umwelt einen Einfluss haben.

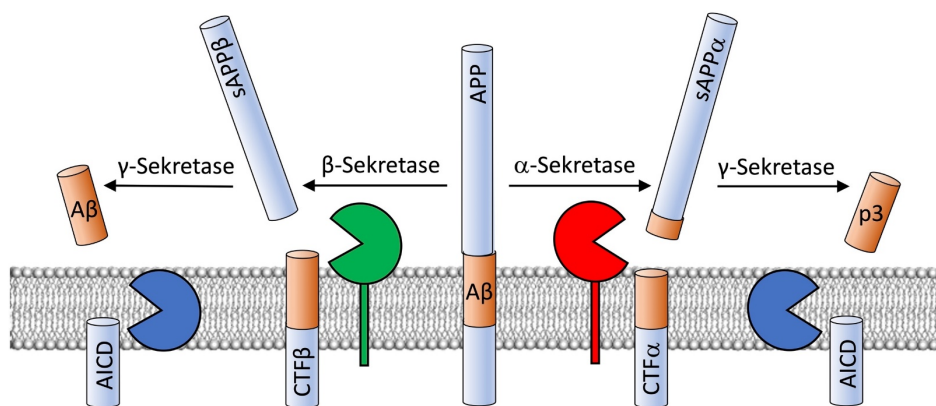


Abbildung 1: Proteolytische Prozessierung von APP. Das Transmembranprotein *Amyloid Precursor Protein* (APP) kann auf zwei unterschiedlichen Wegen prozessiert werden. In dem auf der linken Seite dargestellten amyloidogenen Weg wird es erst von der β -Sekretase (BACE-1) geschnitten. Das verbleibende C-terminale Fragment (CTF β) wird anschließend von der γ -Sekretase gespalten. Dadurch entstehen lösliches APP (sAPP β), das neurotoxische A β -Peptid und die verbleibende intrazelluläre Domäne (AICD). In dem nicht-amyloidogenen Weg, welcher auf der rechten Seite dargestellt ist, wird das APP zuerst durch eine α -Sekretase innerhalb der A β -Peptid Domäne geschnitten. Hierdurch wird sAPP α freigesetzt. Durch die anschließende Prozessierung des in der Membran verbleibenden Fragmentes (CTF α) durch die γ -Sekretase entsteht das p3-Fragment und die AICD. Das p3 Fragment ist im Gegensatz zum A β -Peptid kleiner und besitzt kein neurotoxisches Potenzial. (verändert nach Andrew et al., 2016)

Seitdem die Erkrankung 1907 zum ersten Mal von dem deutschen Neurologen Alois Alzheimer beschrieben wurde (Alzheimer, 1907), wird an ihr geforscht und versucht, ihre Pathogenese zu verstehen. Dennoch gibt es bis heute noch nicht einmal spezifische diagnostische Marker, anhand derer man zuverlässig das Vorliegen der Alzheimer-Erkrankung identifizieren kann. Obwohl es ständig neue Ideen für Therapiemöglichkeiten gibt, hat sich noch keine von ihnen als wirksam erwiesen, das Fortschreiten der Krankheit zu verlangsamen oder sogar ganz zu verhindern.

1.2 Triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2)

TREM2 ist ein Rezeptor des angeborenen Immunsystems, welcher auf myeloiden Zellen wie Makrophagen, dendritischen Zellen, Osteoklasten und vor allem Mikroglia exprimiert wird (Bouchon et al., 2001). Das Typ-I-Transmembranprotein besteht aus einer extrazellulären Immunglobulin-Domäne vom V-Typ, gefolgt von einer extrazellulären Stalk-Region und einer Transmembran-Helix. Intrazellulär schließt sich an die Transmembrandomäne ein kurzer zytosolischer Bereich an. TREM2 wird an zwei Asparagin-Resten (N20 und N79) glykosyliert und hat damit eine deutlich größere molekulare Masse als anhand der Aminosäuresequenz vorhergesagt (Abb. 2A).

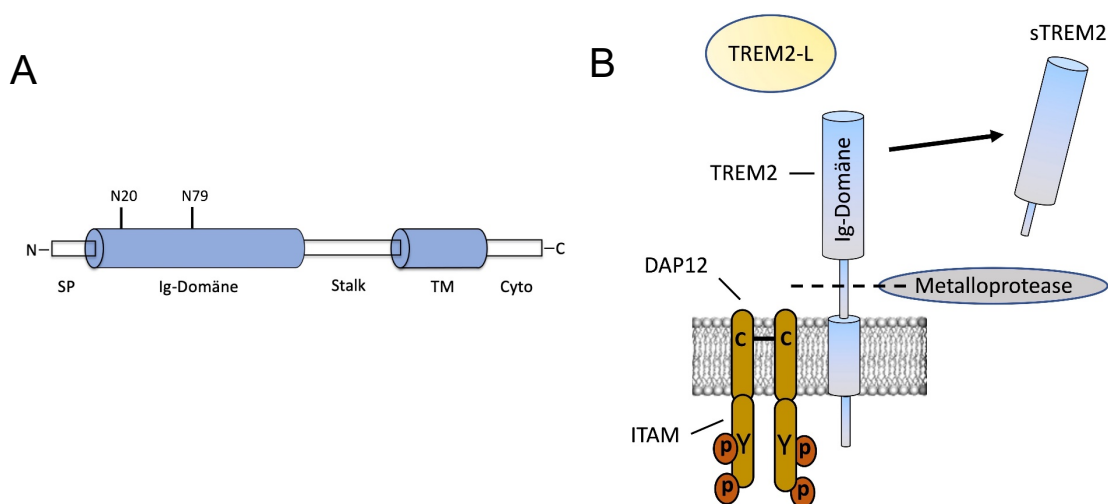


Abbildung 2: Struktur und Interaktionspartner von TREM2. (A) TREM2 besteht aus einer Ig-Domäne, einer Stalk-Region (Stalk), einer Transmembrandomäne (TM) und einem zytosolischen Schwanz (Cyto). Das Signalpeptid (SP) wird im ER abgespalten. TREM2 besitzt zwei Glykosylierungen, welche mit Asparaginen in der Ig Domäne verknüpft sind (N20 und N79). (B) Über seine Transmembrandomäne interagiert TREM2 mit DAP12, welches es für das *downstream-signalling* benötigt. Dieses liegt als Homodimer vor. Jedes Monomer enthält eine *Immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM)-Domäne. Die Ig-Domäne dient der Interaktion mit Liganden (TREM2-L). Durch Spaltung des TREM2 in der Stalk-Region wird lösliches TREM2 (sTREM2) generiert. (verändert nach Kober & Brett, 2017)

In vitro bindet TREM2 als Rezeptor unterschiedliche Liganden wie anionische Lipide (Wang et al., 2015), lipidhaltiges ApoE und ApoJ (Atagi et al., 2015; Bailey et al., 2015), *high-density* und *low-density* Lipoproteine (W. Song et al., 2017) und apoptotische Zellen (Hsieh et al., 2009). Interaktion von TREM2 mit diesen Liganden führt zur Phosphorylierung von *downstream signalling* Proteinen durch sein Adaptorprotein *DNAX-activating protein of 12 kDa* (DAP12) (Xing et al., 2015) (Abb. 2B). Die dadurch vermittelten Funktionen reichen von Proliferation, Zellüberleben (Otero et al., 2009), Migration und dem Ausschütten von Zytokinen (Colonna et al., 2016) bis hin zu Phagozytose (N'Diaye et al., 2009; Takahashi et al., 2005).

TREM2 spielt eine wichtige Rolle für die Funktionsfähigkeit von Mikroglia unter pathologischen Bedingungen. In einem Alzheimer-Mausmodell führt TREM2-Defizienz zu einem verminderten zellulären Metabolismus und vermehrter Autophagie in den Mikroglia (Ulland et al., 2017). Außerdem wird TREM2 benötigt, um die Mikroglia von ihrem homöostatischen Stadium in krankheitsassoziierte Mikroglia zu überführen (Keren-Shaul et al., 2017). Des Weiteren unterstützt TREM2 die frühe Ansammlung der Mikroglia um A β -Plaques (Wang et al., 2016). Hier bilden die Mikroglia eine Abschirmung um die Plaques und limitieren auf diese Weise ihre Diffusion. In einem weiteren Alzheimer-Mausmodell, in dem humanes TREM2 in Mikroglia transgen überexprimiert wurde, konnte gezeigt werden, dass durch die Erhöhung von TREM2 die Morphologie und Funktionalität der Mikroglia wiederhergestellt und dadurch Gedächtnisdefizite abgeschwächt werden konnten (Lee et al., 2018). Außerdem bindet TREM2 direkt an β -Amyloid (A β)-Oligomere (Zhao et al., 2018) und fördert deren Aufnahme in die Zelle (Yeh et al., 2016). Diese Funktionen lassen vermuten, dass TREM2 in der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung eine protektive Rolle spielt. Jedoch gibt es auch Befunde, die eine eher schädigende Rolle des Rezeptors nahelegen. So konnten Jay et al. zeigen, dass TREM2-Defizienz zu einer Verbesserung der Amyloid-Pathologie führte (Jay et al., 2015). Um diese gegensätzlichen Ergebnisse zusammenzuführen, schlagen die Autoren deshalb in einer späteren Veröffentlichung ein Modell vor, in dem sie einen von dem Stadium der Krankheit abhängigen Effekt von TREM2 postulieren. Dabei hat TREM2 in dem von ihnen angewandten Mausmodell zu Beginn der Erkrankung einen negativen Einfluss auf die Amyloid-Pathologie, in einem späteren Stadium der Krankheit jedoch einen positiven Effekt (Jay et al., 2017).

Die Verknüpfung der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung mit TREM2 wurde auch in einigen genetischen Studien bestätigt, in denen Polymorphismen für TREM2 gefunden wurden, welche mit der Alzheimer-Erkrankung assoziiert werden konnten. So haben Träger der R47H-Variante ein drei- bis vierfach erhöhtes Risiko, an Morbus Alzheimer zu erkranken (Guerreiro et al., 2013; Jonsson et al., 2013). Bei dieser Variante wird durch eine *Missense*-Mutation in der Ig-Domäne von TREM2 das Arginin an Position 47 gegen ein Histidin ausgetauscht. *In vitro*-Studien zeigen, dass es dadurch zu verminderter Ligandenbindung

(Atagi et al., 2015; Wang et al., 2015) und veränderter Glykosylierung (Park et al., 2017) kommt. Durch diese Resultate wird vermutet, dass die R47H-Mutation zu einem Verlust der Funktion von TREM2 führt. Damit übereinstimmend ist auch eine *in vivo*-Studie in einem Alzheimer-Mausmodell, in dem die Autoren das endogene TREM2 ausknockten. Durch die anschließende Expression der humanen R47H-Variante konnte die volle TREM2-Funktion nicht wiederhergestellt werden, durch die humane Wildtyp-Variante hingegen schon (W. M. Song et al., 2018).

Neben der R47H-Variante gibt es noch weitere mit neurodegenerativen Erkrankungen assoziierte Mutanten, wie die T66M- und die H157Y-Varianten. Die T66M-Variante, bei der innerhalb der Ig-Domäne von TREM2 ein Threonin gegen ein Methionin ausgetauscht ist, verursacht ein falsch gefaltetes TREM2, welches im endoplasmatischen Retikulum (ER) zurückgehalten wird (Kleinberger et al., 2014). Bei der H157Y-Variante ist in der Stalkregion von TREM2 ein Histidin gegen ein Tyrosin ausgetauscht. Beide Mutationen beeinflussen das sogenannte *ectodomain shedding* von TREM2. Als *ectodomain shedding* bezeichnet man eine besondere Form der limitierten Proteolyse, welche an der Plasmamembran aller Zellen stattfindet. Dabei wird die Ektodomäne des Proteins von einer Protease, die häufig ebenfalls in der Membran sitzt, jedoch auch als lösliches Protein vorliegen kann, nahe oder innerhalb der Transmembrandomäne proteolytisch gespalten und in den Extrazellulärraum entlassen. Das *ectodomain shedding* ist eine irreversible posttranslationale Modifikation, durch welche Menge und Funktion sehr vieler Transmembranproteine kontrolliert werden können (Lichtenthaler et al., 2018).

Dieser Prozess findet auch für TREM2 statt. Bisher wurden die Metalloprotease ADAM10 als die physiologisch wichtigste und ADAM17 als physiologisch weniger relevante Sheddase für TREM2 identifiziert. Diese spalten TREM2 in der Stalkregion zwischen Histidin 157 und Serin 158 (Schlepckow et al., 2017; Thornton et al., 2017). Damit befindet sich die Mutation in der H157Y-Variante direkt an der P1-Stelle der ADAM-Spaltstelle. Dies führt zu vermehrtem Shedding (Schlepckow et al., 2017). Die T66M-Mutation hingegen verringert das Shedding, da hier das TREM2 gar nicht erst an den Ort des Sheddings, nämlich die Zelloberfläche, kommt (Kleinberger et al., 2014).

Das nach dem Shedding verbleibende C-terminale Fragment wird innerhalb der Membran durch die γ -Sekretase weiter prozessiert (*regulated intramembrane proteolysis*) (Wunderlich et al., 2013) (Abb. 3).

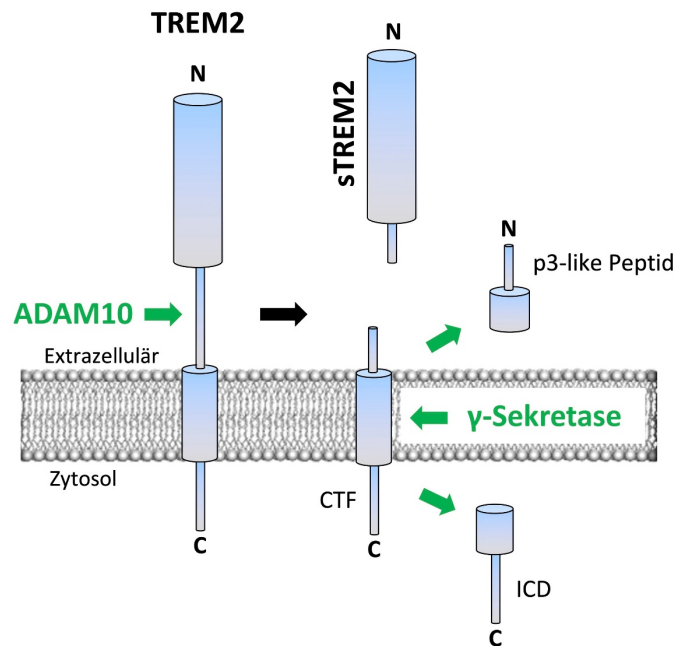


Abbildung 3: Shedding von TREM2 durch ADAM10. TREM2 wird durch ADAM10 innerhalb der Stalk-Region zwischen Histidin 157 und Serin 158 gespalten. Dabei wird die Ektodomäne als lösliches TREM2 (sTREM2) in den Extrazellulärraum entlassen. Das in der Membran verbleibende C-terminale Fragment (CTF) wird von der γ -Sekretase weiterprozessiert. Dadurch entstehen ein p3-like Peptid und eine intrazelluläre Domäne (ICD). (verändert nach Schlepckow et al., 2017)

Das entstehende lösliche TREM2 fördert das Überleben von Mikroglia und die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen (Zhong et al., 2017). Da die Konzentration an löslichem TREM2 im Liquor von Alzheimer-Patienten zunimmt, wird über eine potentielle Funktion als Biomarker für Morbus Alzheimer diskutiert (Suárez-Calvet et al., 2016).

Die Inhibition von ADAM10 und ADAM17 führt jedoch nicht zu einer vollständigen Hemmung der Generierung von löslichem TREM2 (Thornton et al., 2017). Folglich kann angenommen werden, dass es neben den beiden genannten Proteasen noch weitere gibt, die in der Lage sind, TREM2 von der Zelloberfläche abzuspalten.

1.3 Meprin β

Ebenso wie ADAM10 und ADAM17 konnte auch die Metalloprotease Meprin β in verschiedenen Studien mit der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung verknüpft werden (Bien et al., 2012; Schönherr et al., 2016).

Meprin β ist ein stark glykosyliertes Multidomänen-Protein, welches aus einem N-terminalen Propeptid, einer katalytischen Domäne, einer MAM (*meprin A5 protein tyrosine phosphatase*

μ) Domäne, einer TRAF (*tumour-necrosis-factor-receptor-associated-factor*) Domäne, einer EGF (*epidermal growth factor*)-like Domäne und einer Transmembrandomäne, gefolgt von einem kurzen zytosolischen Rest, besteht (Abb. 4A). Über eine Disulfidbrücke bildet das Typ-I-Transmembranprotein an der Zelloberfläche Homodimere (Bertenshaw et al., 2003). Durch ADAM10 und ADAM17 kann es N-terminal der EGF-like Domäne von der Zelloberfläche gespalten werden (Hahn et al., 2003; Jefferson et al., 2013).

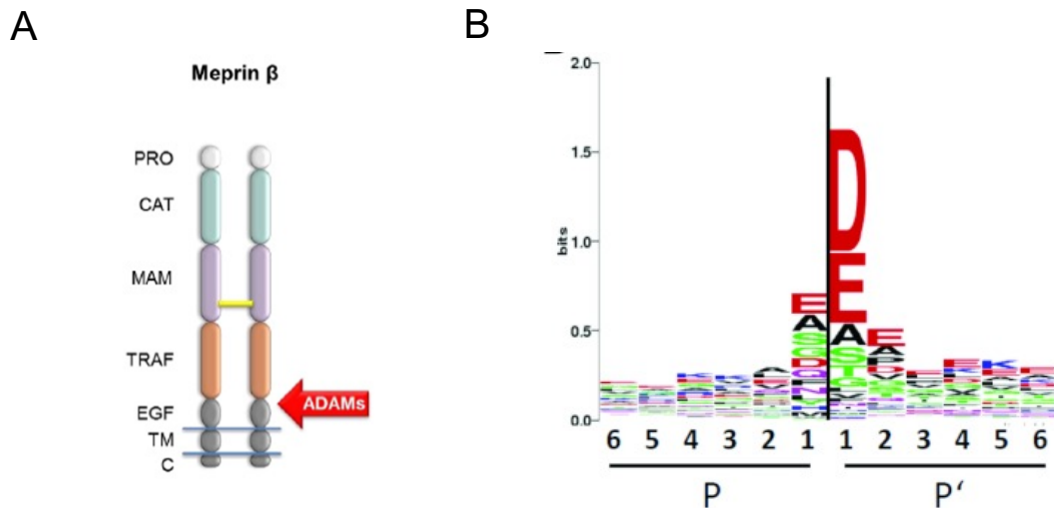


Abbildung 4: Domänenstruktur und präferierte Spaltstellen von Meprin β (A) Es ist die Domänenstruktur von Meprin β dargestellt. Meprin β liegt als Homodimer vor. Dieses wird über eine Disulfidbrücke zwischen den beiden MAM-Domänen gebildet. Meprin β kann durch ADAM10 und ADAM17 zwischen der TRAF-Domäne und der EGF-Domäne von der Zelloberfläche gesheddet werden. **(B)** Die von Meprin β präferierten Aminosäuren je sechs Positionen vor und hinter der Spaltstelle sind in einem WebLogo dargestellt. Auffällig ist die starke Präferenz für negativ geladene Aminosäuren an der P1- und P1'-Position (rot: negativ geladene Reste; schwarz: hydrophobe Reste; grün: polare Reste; blau: positiv geladene Reste). (verändert nach Broder & Becker-Pauly, 2013)

Meprin β ist neben ADAM10 und ADAM17 eine weitere Zink-abhängige Metalloprotease aus der Metzinkin-Superfamilie (Stöcker et al., 1995). Durch diese phylogenetische Verwandtschaft haben Meprin β und die ADAM-Proteasen einige gemeinsame Substrate. Zu diesen zählt zum Beispiel der IL-6 Rezeptor (Arnold et al., 2017). Dabei konnte mit Hilfe von TAILS- (*terminal amine isotopic labelling of substrates*) und PICS- (*proteomic identification of protease cleavage sites*) Analysen eine starke Präferenz von Meprin β für negativ-geladene Aminosäure an der P1'-Position festgestellt werden (Becker-Pauly et al., 2011) (Abb. 4B).

Durch die Identifizierung von Substraten konnte die Rolle von Meprin β in vielen biologischen Funktionen definiert werden. So ist die Metalloprotease an der Reifung von Kollagen I und III beteiligt (Broder et al., 2013; Kronenberg et al., 2010). Damit einhergehend konnten in fibrotischen Geweben eine erhöhte Expression von Meprin β nachgewiesen werden

(Kronenberg et al., 2010). Weitere Erkenntnisse über die Funktion von Meprin β konnten durch die Generation von Meprin β -Knockout-Mäusen gewonnen werden. Diese zeigten einen klaren immunologischen Phänotyp. Dieses konnte in weiteren Studien unter anderem dadurch erklärt werden, dass Meprin β den IL-6-Rezeptor spaltet und dadurch den biologisch aktiven, löslichen IL-6-Rezeptor generiert. Dieser wiederum stellt durch die Induktion des *Trans-Signalling* einen wichtigen pro-inflammatorischen Stimulus dar (Arnold et al., 2017). Außerdem ist Meprin β in der Lage, pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 β und IL-18 zu aktivieren (Banerjee et al., 2008; Herzog et al., 2005). Ein weiteres Substrat von Meprin β ist das Adhäsionsmolekül CD99. Dieses ist wichtig für die transendotheliale Migration von Zellen, welche eine Rolle in Prozessen wie Inflammation und der Metastasierung von Tumorzellen spielt (Bedau et al., 2017). Außerdem konnte das Meprin β -Gen mit der Entstehung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen assoziiert werden (Banerjee et al., 2011). Dabei ist Meprin β im Dünndarm verantwortlich für die Spaltung von Mucin 2, wodurch es die Ablösung des Mukus reguliert. Dieser Mechanismus ist wichtig für die Barrierefunktion des Darms (Schütte et al., 2014). Meprin β spielt also eine Rolle in Pathologien wie chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, fibrotischen Erkrankungen und der Metastasierung von Krebszellen (Banerjee et al., 2011; Bedau et al., 2017; Bülck et al., 2023; Kronenberg et al., 2010; Wichert et al., 2017).

Daneben konnte durch eine qPCR gezeigt werden, dass die mRNA-Level für Meprin β in den Gehirnen von Alzheimer-Patienten im Vergleich mit gleichaltrigen gesunden Kontrollpatienten erhöht sind (Bien et al., 2012). Dies spricht dafür, dass Meprin β auch eine Rolle in der Entstehung der Alzheimer-Erkrankung spielt. In der Tat konnte gezeigt werden, dass Meprin β in der Lage ist, APP zu shedden und dadurch ein N-terminal gekürztes A β -Peptid zu generieren, welches im Vergleich zu dem durch BACE1 erzeugte A β -Peptid sogar stärker aggregiert (Schönherr et al., 2016). Auf der anderen Seite ist Meprin β in der Lage, ADAM10 durch Abspaltung seines Propeptids zu aktivieren (Jefferson et al., 2013). Da durch ADAM10 als α -Sekretase der nicht-amyloidogene Weg in der Prozessierung des APP eingeschlagen wird (Andrew et al., 2016), würde dies zu weniger neurotoxischen A β -Plaques führen. Dies würde im Gegensatz zu den vorher beschriebenen Befunden eher für eine protektive Rolle vom Meprin β im Verlauf der Alzheimer-Erkrankung sprechen.

1.4 Ziel der Arbeit

In den letzten Jahren wurde deutlich, dass Meprin β eine mögliche Rolle in der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung spielt, jedoch ist noch nicht geklärt, ob dieser Einfluss die Pathogenese eher fördert oder verlangsamt. TREM2 ist ein weiterer bedeutender Faktor in der Entstehung von Morbus Alzheimer, welcher als Rezeptor auf Mikroglia unter anderem für die Phagozytose der A β -Peptide und A β -Plaques sorgt. ADAM10 und ADAM17 wurden bisher als die einzigen Sheddasen für TREM2 identifiziert, jedoch führt eine Inhibition dieser Proteasen nicht zu einer vollständigen Hemmung der Generierung von löslichem TREM2. Dies zeigt, dass es noch weitere Proteasen gibt, die an der Modulation der Funktion von TREM2 durch Abspaltung der Ektodomäne beteiligt sind. Durch das ähnliche Substratspektrum von ADAM10 und ADAM17 und Meprin β stellten wir die Hypothese auf, dass Meprin β eine dieser Proteasen sein könnte. Dies wurde ferner dadurch gestützt, dass sich in der Stalkregion von TREM2 viele negativ geladene Aminosäuren und somit mögliche Meprin β -Spaltstellen finden lassen. Diese Verknüpfung von Meprin β und TREM2 würde auch die Rolle der Metalloprotease in der Alzheimer-Erkrankung weiter definieren.

Die aufgestellte Hypothese wurde bereits in vorangegangenen Experimenten bestätigt (Berner & Wessolowski et al., 2020). Ziel dieser Arbeit war es daher, TREM2 als Substrat von Meprin β weiter zu charakterisieren, hierfür wurden proteinbiochemische Methoden genutzt. Außerdem war die exakte Spaltstelle in der Stalkregion von TREM2 von Interesse, die mit Hilfe von Massenspektrometrie bestimmt wurde. Des Weiteren wurden die Varianten von TREM2, welche mit der Alzheimer-Erkrankung assoziiert werden konnten, in Bezug auf das Shedding durch Meprin β näher untersucht. Dies lieferte ein besseres Verständnis der Rolle, die Meprin β durch das Shedding von TREM2 in der Alzheimer-Erkrankung spielen könnte. Um einen Eindruck von der physiologischen Relevanz *in vivo* zu gewinnen, wurden *bone-marrow derived macrophages* aus wildtypischen und Meprin β überexprimierenden Mäusen genutzt.

Diese Arbeit hatte also zum Ziel, das Zusammenspiel zweier bereits bekannter Faktoren in der Entstehung des Morbus Alzheimer zu untersuchen, um dadurch ein besseres Verständnis für dessen Pathogenese zu bekommen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Sämtliche für diese Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von der Carl Roth AG bezogen oder werden explizit genannt. Reinstwasser wurde mit dem *Milli-Q® Integral water purification system* produziert und trägt im weiteren Text die Abkürzung ddH₂O.

2.1.2 Puffer

Alle für diese Arbeit verwendeten Puffer finden sich in Tabelle 1.

Tabelle 1: Zusammensetzung der verwendeten Puffer

Puffer	Zusammensetzung
Blockierungspuffer	5% (w/v) Magermilchpulver in TBS
Coomassie-Entfärber	40% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure
EBC-Lysispuffer	120 mM NaCl 50 mM Tris, 0,5% (w/v) NP-40 Complete Protease inhibitor cocktail Tablette + EDTA (Roche) pH 7,4
HEPES	20 mM HEPES in ddH ₂ O, pH 7,5
Lysispuffer	1% (v/v) Triton X-100 Complete Protease inhibitor cocktail Tablette (Roche) in PBS pH 7,4
LB-Agar	LB-Medium 1,5% Agar-Agar
LB-Medium	1% Trypton 0,5% Hefeextrakt 1% NaCl in ddH ₂ O

Makrophagenmedium	DMEM 20% FCS 1 mM Natrium-Pyruvat 2 mM L-Glutamin 1% Penicillin/Streptomycin
Membranfraktionierungspuffer	1 mM EDTA 1 mM EGTA 10 mM TRIS pH 7,0
PBS	135 mM NaCl 2,7 mM KCl 9,2 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
Probenpuffer (5x)	für 10 ml: 2,5 ml Tris-HCl, pH 6,8 1 g SDS 2,5 ml ddH ₂ O 0,05 g Bromphenolblau 5 ml Glycerol, 0,154 g DTT
Puffer Sammelgel	0,5 M Tris 0,4% (w/v) SDS pH 6,8
Puffer Trenngel	1,5 M Tris 0,4% (w/v) SDS pH 8,8
SDS-PAGE-Laufpuffer	0,1% (w/v) SDS 1,92 M Glycin 0,25 M Tris pH 8,3
SOB-Medium	2% Trypton 0,5% Hefeextrakt 0,05% NaCl 980 ml ddH ₂ O
SOC-Medium	1 ml 2 M Glucose (steril filtriert, 0,2 µm) 1 ml 1 M MgCl ₂ (steril filtriert, 0,2 µm) 100 ml SOB-Medium

Tank Blot Puffer	25 mM Tris 200 mM Glycin 20% (v/v) Methanol pH 8.3
TBS	20 mM Tris 137 mM NaCl pH 7,5

2.1.3 Zelllinien

Sämtliche für diese Arbeit verwendeten Zelllinien finden sich in Tabelle 2.

Tabelle 2: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Charakteristik
HEK 293T (ADAM10/17 ^{-/-})	Humane embryonale Nierenzellen mit Knock-out der Proteasen ADAM10 und ADAM17 (Franke et al., 2016; Riethmueller et al., 2016)
BMDM (<i>bone-marrow derived macrophages</i>)	Primäre, aus dem Knochenmark isolierte, murine Makrophagen

2.1.4 Plasmide

Sämtliche für diese Arbeit verwendeten Plasmide finden sich in Tabelle 3.

Tabelle 3: Plasmide für die transiente Transfektion

Gen	Herkunft	N-Tags	C-Tags	Vektor	Resistenz
ADAM10	Murin	-	-	pcDNA3.1	Amp
Leervektor				pcDNA3.1	Amp
Meprin β	Human	-	-	psG5	Amp
Meprin β E153A	Human	-	-	psG5	Amp
TREM2	Human	HA	FLAG	pcDNA3.1	Amp

TREM2 H157Y	Human	HA	FLAG	pcDNA3.1	Amp
TREM2 R47H	Human	HA	FLAG	pcDNA3.1	Amp
TREM2 T66M	Human	HA	FLAG	pcDNA3.1	Amp

2.1.5 Antikörper

Sämtliche für diese Arbeit verwendeten Antikörper finden sich in Tabelle 4 und 5.

Tabelle 4: Primärantikörper

Antigen	Hersteller	Spezies	Verwendung
Anti-FLAG-tag, F1804	Sigma-Aldrich	Maus	1:1000
Anti-Meprin β (human), Tier2	Pineda	Kaninchen	1:1000
Anti-TREM2 (human), AF1828	Abcam	Ziege	1:1000
Anti-Myc-tag, 9B11	Cell Sig.	Maus	1:1000
Anti-GAPDH, 14C10	Cell Sig.	Kaninchen	1:1000
Anti-His, H-15	Santa Cruz	Kaninchen	1:1000
Anti-Meprin β , Hecto1	Pineda	Kaninchen	1:1000

Tabelle 5: Sekundärantikörper

Antigen	Hersteller	Verwendung
Anti-Kaninchen IgG	Jackson ImmunoResearch	1:10.000
Anti-Maus IgG	Jackson ImmunoResearch	1:10.000
Anti-Ziege IgG	Jackson ImmunoResearch	1:10.000

2.1.6 Inhibitoren

Alle in dieser Arbeit in der Zellkultur eingesetzten Protease-Inhibitoren finden sich in Tabelle 6.

Tabelle 6: Verwendete Protease-Inhibitoren

Inhibitor	eingesetzte Konzentration	Hersteller
Actinonin	10 μ M	Sigma-Aldrich, St. Louis
DAPT	2 μ M	Sigma-Aldrich, St. Louis
E-64	14 μ M	Sigma-Aldrich, St. Louis
GI254023X	3 μ M	Sigma-Aldrich, St. Louis
GW280264X	3 μ M	Iris Biotech, Marktredwitz
Marimastat	10 μ M	Sigma-Aldrich, St. Louis
Pefabloc	200 μ M	Merck, Darmstadt
Pepstatin A	10 μ M	Sigma-Aldrich, St. Louis

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Alle Zellen wurden unter sterilen Bedingungen in einem dafür qualifizierten S1 Labor kultiviert. Eingesetzte Geräte waren für den Gebrauch in der Zellkultivierung geeignet. Als Nährmedium wurde *Dulbeccos Modified Eagle Medium* (DMEM) verwendet, welches als Zusätze 10% hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (FCS, Gibco) und 1% Penicillin/Streptomycin enthielt. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ in einem befeuchteten Inkubator gelagert und alle 2-3 Tage passagiert. Dafür wurde das alte Medium abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 1,5 ml Trypsin versetzt, welches die Adhäsionsproteine spaltet, sodass die adhärenen Zellen vom Boden der Zellkulturschale gelöst wurden. Nach einer Inkubationszeit von 10 min im Inkubator wurde das Trypsin mit Medium inhibiert und anschließend wurden die Zellen 3 min bei 500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in Medium resuspendiert und auf neue Zellkultivierungsschalen (10 cm, Sarstedt) mit frischem Medium gegeben.

2.2.2 Transiente Transfektion

Bei einer Konfluenz von 70-80% erfolgte die transiente Transfektion der Zellen. Dafür wurden 300 µl serumfreies Medium mit 4 µg Plasmid-DNA bei Einzeltransfektionen beziehungsweise je 3 µg Plasmid-DNA bei Doppeltransfektionen mit Polyethylenimin (PEI) im Verhältnis 1:3 versetzt. Das Transfektionsreagenz wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das alte Medium von den Zellen abgenommen und 4 ml neues Medium (DMEM plus 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin) auf die Zellen gegeben. Nach 4-5 h wurde das Medium auf 10 ml aufgefüllt und nach 24 h auf 3 ml serumfreies Medium umgestellt. Bei den entsprechenden Versuchen wurde dem serumfreien Medium 2 µM DAPT zugesetzt. Nach 8 Stunden wurden zusätzliche 2 µM DAPT nachgelegt. Gleichermaßen wurde mit den in Tabelle 6 aufgelisteten Inhibitoren verfahren. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen geerntet.

2.2.3 Zellyse und BCA (Bicinchoninsäure-Assay)

Nach Abnahme der Überstände wurden die adhärenenten Zellen mit 5 ml PBS gewaschen und anschließend mit einem Zellschaber (25 cm, Sarstedt) bei 4°C geerntet. Die geernteten Zellen wurden bei 4°C und 500 x g für 10 min zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 150-200 µl Lysispuffer resuspendiert. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis wurden die Proben bei 4°C und 15.000 x g für 25 min zentrifugiert, um unlösliche Zellbestandteile zu entfernen.

Danach wurde die totale Proteinkonzentration im Lysat mit Hilfe des *BCA Protein Assay Kit* (ThermoFischer Scientific) ermittelt. Hierfür wurde eine Albumin-Standardreihe nach Anleitung des Herstellers angesetzt. In eine 96-well Platte wurden jeweils 10 µl des Standards beziehungsweise 2 µl der Probe mit 8 µl ddH₂O pipettiert. Des Weiteren wurden 200 µl des Substrats bestehend aus Reagenz A und B im Verhältnis (50:1) zu jedem well hinzugegeben. Die Platte wurde für 20 min bei 37°C inkubiert und anschließend die Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen. Mit Hilfe der Standardreihe konnten so die Proteinkonzentrationen der Proben berechnet werden.

Um die Proteine zu lösen und zu denaturieren, wurden die Proben nach erfolgtem BCA-Assay mit Probenpuffer versetzt und 10 min bei 95°C erhitzt.

2.2.4 Zellyse für die Membranfraktionierung

Für die Membranfraktionierung wurden die adhärenenten Zellen nach Abnahme der Überstände mit einem Zellschaber geerntet, für 10 min bei 500 x g und 4°C zentrifugiert und dreimal in eiskaltem PBS gewaschen. Dann wurde das Zellpellet in Membranfraktionierungspuffer resuspendiert, welcher frisch mit Proteaseinhibitor versetzt wurde, und für 30 min bei 4°C

inkubiert. Damit die Zellen die Integrität ihrer Membran verlieren, wurde anschließend ein *Snap freezing* in flüssigem Stickstoff durchgeführt. Nach dem Auftauen bei 37°C wurden die Zellen für 30 min bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 150-200 µl Lysispuffer resuspendiert, 30 min bei 4°C inkubiert und für 20-30 min bei 15.000 x g und 4°C zentrifugiert. Das Lysat wurde abgenommen und nach Bestimmung der Proteinkonzentration mit Probenpuffer versetzt und 10 min bei 95°C erhitzt oder für die Immunopräzipitation verwendet.

2.2.5 Fällung der Überstände mit Concavalin A

Überstände aus Zellkulturexperimenten wurden von der Zellkulturschale abgenommen und 5 min bei 500 x g zentrifugiert, um sie von freien Zellen und Zelldebris zu säubern. 50 µl Concavalin A *Beads* (C9017, Sigma) wurden dreimal in sterilem PBS gewaschen und anschließend auf jeweils 1 ml der Überstände gegeben. Die Proben wurden über Nacht bei 4°C auf einem Rotationsrad inkubiert. Nachfolgend wurden die *Beads* erneut dreimal in PBS gewaschen und mit jeweils 50 µl Probenpuffer versetzt. Zur Denaturierung und zum Lösen der Proteine von den *Beads* wurden diese für 10 min bei 95°C erhitzt. Zur Verwertung der Proben für das *Western Blot* Verfahren wurden die Überstände an die Proteinkonzentrationen der Lysate angepasst.

2.2.6 SDS-PAGE, Western Blotting und Coomassie-Färbung

Um die lysierten Proben und gefällten Überstände weiter zu analysieren, wurden SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) und *Western Blotting* oder eine Coomassie-Färbung eingesetzt.

Die SDS-PAGE wurde verwendet, um die Proteine nach ihrer Molekülmasse aufzutrennen. Hierfür wurden die Proteinproben und ein Marker (*Page Ruler Prestained Protein Ladder Plus*, Thermo Fisher Scientific) auf ein Polyacrylamidgel (1,5 mm) aufgetragen. Das Gel bestand aus einem Sammelgel, in welchem die Proteine zunächst konzentriert wurden und einem Trenngel, in welchem die Proteine dann aufgetrennt wurden. Durch Anlegen einer konstanten Spannung von 150 V wurden die in den Proben befindlichen Proteine im elektrischen Feld getrennt. Das anionische Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat) bindet unspezifisch an die Proteine und maskiert deren Eigenladung mit negativer Ladung. Auf diese Weise wurden die Proteine nur nach ihrer Molekülmasse und unabhängig von ihrer Eigenladung getrennt.

Anschließend wurden die Proteine mit dem *Tank Blot*-Verfahren durch ein elektrisches Feld von dem Gel auf eine PVDF-Membran (Merck Millipore) übertragen, um die nach ihrer Größe aufgetrennten Proteine mittels Immundetektion visualisieren zu können. Nach der Proteinübertragung wurde die Membran für eine Stunde im Blockierungspuffer inkubiert, um

unspezifische Bindungsstellen mit Proteinen aus der Pufferlösung zu besetzen. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit der Primärantikörperlösung, bestehend aus dem Primärantikörper und 5% Magermilchpulver in TBS, inkubiert. Am Folgetag wurde die Primärantikörperlösung abgenommen und die Membran viermal für jeweils 5 bis 10 min in TBS gewaschen, um überschüssige, nicht an die Membran gebundenen Antikörper zu entfernen. Es folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur. Der *Horseradish*-peroxidase (HRP)-gekoppelte Sekundärantikörper wurde in einer Konzentration von 1:10.000 in 10 ml TBS verwendet. Nach der Inkubation wurde die Membran wieder viermal in TBS gewaschen um überschüssigen, nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Zur Darstellung der Signale wurde ein Lumineszenzsubstrat (*Super Signal West Femto Kit*, ThermoFisher Scientific) auf die Membran gegeben und das durch die Reaktion der Peroxidase emittierte Licht mit Hilfe eines Chemilumineszenzdetektionsgerätes (*LAS-3000 mini*, Fujifilm) aufgenommen. Mittels Coomassie-Färbung können Proteine direkt im Polyacrylamid-Gel dargestellt werden. Die Färbung beruht auf der Einlagerung von Coomassie-Farbstoff in basische Seitenketten von Aminosäuren. Dafür wurden die Gele nach der SDS-PAGE für eine Stunde in *Coomassie Brilliant Blue R-250 Dye* (Thermo Fischer Scientific) inkubiert und anschließend mittels Coomassie-Entfärbter wieder entfärbt, bis die Hintergrundfärbung verschwand und nur noch die Proteine angefärbt waren.

2.2.7 Immunopräzipitation

Für die Immunopräzipitation wurden HEK293T ADAM10/17^{-/-} Zellen transfiziert und nach 48 h geerntet. Anschließend wurden die Zellen nach dem *Snap freezing* in flüssigem Stickstoff (s. Kapitel 2.2.4) in 450 µl EBC-Lysispuffer für eine Stunde lysiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (13.000 rpm, 10 min, 4°C) wurden von dem Überstand 50 µl für die Lysatkontrolle entnommen. Das übrige Lysat wurde mit je 2 µl Flag-Antikörper bzw. 5 µl Hecto1-Antikörper (anti-Meprin β) und 50 µl *Pierce Protein G Agarose Beads* (Thermo Fisher Scientific) versetzt. Die *Beads* wurden vorher dreimal in EBC-Lysispuffer gewaschen. Anschließend wurden die Ansätze über Nacht bei 4°C rollend inkubiert. Am Folgetag wurden die *Beads*, an welchen nun über den Antikörper die gewünschten Proteine gebunden hatten, dreimal in EBC-Lysispuffer gewaschen und in 20 µl EBC-Lysispuffer plus 20 µl 5xPP für 10 min bei 95°C erhitzt. Die Proben aus der Immunopräzipitation sowie die Lysatkontrollen wurden mittels SDS-PAGE und *Western Blot* analysiert.

2.2.8 *In vitro*-Verdau von rekombinantem TREM2

Es wurde humanes, rekombinantes TREM2 (Sino Biological) verwendet. Das Konstrukt besteht aus der Ig-like Domäne und Stalkregion (His19 – Ser174) und ist am C-Terminus mit einem His-Tag verbunden. Für die Konzentrationsreihe wurden je 3 µg TREM2 mit

rekombinantes Meprin β (sMeprin β) in HEPES-Puffer für 60 min bei 37°C inkubiert. Für die Zeitreihe wurden je 3 μg TREM2 mit 5 nM sMeprin β in HEPES-Puffer inkubiert. Die Reaktion wurde gestoppt, indem die Ansätze mit Probenpuffer versetzt und bei 95°C für 10 min erhitzt wurden. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mittels *Western Blot* analysiert.

2.2.9 PNGase F-Verdau

Für den PNGase F-Verdau wurden je 4,5 μg rekombinantes TREM2 mit 5 nM sMeprin β in HEPES-Puffer für 2 h bei 37°C und 350 rpm inkubiert. Anschließend wurde das TREM2 mit dem PNGase F-Kit von New England Biolabs deglykosyliert. Dafür wurden die Proben mit Glykoprotein Denaturierungspuffer versetzt und bei 100°C für 10 min aufgekocht. In einem zweiten Schritt wurden die Ansätze mit *GlycoBuffer 2*, NP-40, *MilliQ* und der PNGase F versetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde gestoppt, indem die Proben mit Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 95°C erhitzt wurden. Nach der Auftrennung in der SDS-PAGE wurden die Proteine mit Hilfe einer Coomassie-Färbung sichtbar gemacht.

2.2.10 Identifizierung proteolytischer Spaltstellen durch Massenspektrometrie

Für die Identifizierung der genauen Spaltstelle von Meprin β in der Ektodomäne von TREM2 wurde erneut 10 μg rekombinantes TREM2 mit 5 nM sMeprin β für 2 h bei 37°C inkubiert und anschließend in Probenpuffer für 10 min bei 95°C erhitzt. Nach der Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE und Visualisierung mittels Coomassie-Färbung wurden die Banden ausgeschnitten und in zwei Teile geteilt, welche wiederum zerkleinert wurden. Nach Entfärbung der Proben wurden die Disulfidbrücken mit 10 mM DTT reduziert und anschließend mit 55 mM Iodacetamid alkyliert. Dann wurden sie mit Ammoniumbicarbonat und Acetonitril gewaschen und einer Vakuum-Zentrifuge getrocknet. Die Proben wurden über Nacht mit entweder mit 100 ng Chymotrypsin oder LysargiNase in schwerem Wasser (H_2^{18}O) bei 37°C verdaut. Dadurch wurden die Proteine in kleinere Peptide geschnitten und die neuen Enden gleichzeitig mit dem schweren Wasser markiert, sodass man sie von den ursprünglichen, durch Meprin β entstandenen C-termini unterscheiden kann. Am Folgetag wurden die Peptide aus dem Gel extrahiert und in Laufpuffer resuspendiert. Anschließend wurde eine LC/MS-Messung mit Hilfe eines *Dionex Ultimate 3000 nano-UHPLC*, welches mit einem *Q Exactive Massenspektrometer* (Thermo Scientific, Bremen) verbunden war, durchgeführt. Die Rohdaten wurden mit *Proteome Discover 2.2* (Thermo, Version 2.2.0.388) verarbeitet und mit Hilfe des *Sequest HT* Algorithmus mit einer humanen Datenbank abgeglichen. Dabei wurde die MS1 Toleranz auf 10 ppm und die MS2 Toleranz auf 0,02 Da implementiert und die Oxidation von Methionin-Resten sowie in C-Termini integriertes schweres Wasser als variable

Modifikationen eingestellt. Carbamidomethylierung von Cystein-Resten wurde als konstante Modifikation eingestellt. Die *peptide false discovery rate* wurde auf 1% gesetzt.

2.2.11 Präparation primärer muriner Makrophagen

Für die Betäubung der Versuchstiere wurde eine Mischung aus 800 µl PBS, 120 µl Ketamin und 80 µl Rompun genutzt. Es wurden jeweils 100 µl dieser Mischung pro 10 g Körpergewicht der Mäuse verwendet. Anschließend wurden die Versuchstiere durch einen Genickbruch getötet. Danach wurden sie mittels eines Peritonealschnittes eröffnet und Femur und Tibia entnommen. Diese wurden von Geweberesten gesäubert und in steriles PBS überführt. Die weitere Präparation erfolgte endotoxinfrei unter der Zellkultur. Dabei wurden die Knochen an der Diaphyse eröffnet. Mit Hilfe einer Kanüle (0.4 x 20 mm, Sterican, Braun) wurde das Knochenmark herausgespült. Dafür wurden als Spülmedium 2-3 ml Makrophagenmedium verwendet. Anschließend wurden die Zellen des Knochenmarks mittels eines Zellsiebes (Falcon, A Corning Brand, 100 µm) isoliert. Die Zellen wurden herunterzentrifugiert (300 g, 4°C, 10 min) und nachfolgend gezählt. Je 1×10^7 Zellen wurden in 10 ml Makrophagenmedium in eine sterile unbeschichtete Schale ausgesät. Dabei wurde dem Medium 5 ng/ml *macrophage colony stimulating factor* (M-CSF) hinzugefügt. Nach drei Tagen wurde 5 ml Makrophagenmedium mit 5 ng/ml M-CSF nachgelegt. Insgesamt wurden die Zellen 5 Tage bei 37°C kultiviert. Dann wurden die adhärenz gewachsenen Makrophagen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit Accutase abgelöst. Die Zellen wurden neu ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium auf serumfreies Medium umgestellt und die Zellen erneut für 24 h inkubiert. Die Überstände wurden für einen ELISA verwendet und die Zellen wie oben beschrieben zu Lysaten verarbeitet und mittels *Western Blot* weiter untersucht.

2.2.12 ELISA

Die Menge an sTREM2, welche von den BMDMs in das Serum entlassen wurde, wurde mittels eines TREM2 ELISA Kit für Maus (Aviva System Biology, OKEH03623) gemessen. Dieses wurde nach der Anleitung des Herstellers verwendet.

2.2.13 Hitzeschocktransformation und Midi-Präparation

Um große Mengen an Plasmiden für die transiente Transfektion zu gewinnen, wurden chemisch kompetente *E. coli* XL 1 blue durch einen Hitzeschock mit dem jeweiligen Plasmid transformiert. Hierzu wurden 30 µl Bakterien mit 2 µl der Plasmidlösung versetzt und anschließend 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 45 sec bei 42°C, welcher die Bakterien permeabel machte, wodurch sie die Plasmid-DNA aufnahmen. Nach einer Abkühlung auf Eis für 2 min wurden 900 µl vorher aufgewärmtes SOC-Medium zu den

Bakterien gegeben und die Bakterien für 30 min bei 37°C und 600 rpm inkubiert. Anschließend wurden 50 µl der Suspension an der Flamme auf LB-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. In dem transformierten Plasmid befand sich eine Resistenz gegen ein Antibiotikum, welches auch dem LB-Agar als Selektionsantibiotikum beigesetzt war, sodass sichergestellt war, dass nur transformierte Bakterien wachsen konnten. Am Folgetag wurde eine Bakterienkolonie von der Platte gepickt und erneut über Nacht in 100 ml LB-Medium inkubiert. Die Kultur wurde anschließend bei 4°C und 3.500 rpm für 10 min abzentrifugiert. Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte mit dem *Kit Macherey-Nagel Nucleo Bond® Xtra Midi Prep* laut Anweisung des Herstellers. Das getrocknete DNA-Pellet wurde in 20 µl DEPC-Wasser (RNase-freies Wasser) für 10 min bei 37°C und 500 rpm im Schüttler gelöst und danach die Konzentration bei einer Wellenlänge von 280 nm photometrisch mit dem *NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer* (Pepqlab) bestimmt.

3 Ergebnisse

Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse wurden zum Teil in Berner & Wessolowski et al., 2020 im FASEB Journal veröffentlicht.

3.1 Meprin β spaltet TREM2 *in vitro*

Um in einem *in vitro*-Experiment zu überprüfen, ob Meprin β in der Lage ist, TREM2 zu spalten, wurde die humane, rekombinante Ektodomäne von TREM2 mit der rekombinanten Ektodomäne von Meprin β (sMeprin β) inkubiert. Das verwendete TREM2-Konstrukt bestand aus der Ig-like Domäne und der Stalkregion und war C-terminal mit einem His-Tag verbunden.

Zuerst wurde in einer Konzentrationsreihe die rekombinante Ektodomäne von TREM2 mit sMeprin β in steigender Konzentration inkubiert. TREM2 wurde sowohl über einen Antikörper gegen den C-terminalen His-Tag als auch über einen polyklonalen Antikörper (AF1828, Abcam) detektiert. Die Konzentrationsreihe zeigte, dass bereits eine Konzentration von 5 nM sMeprin β ausreicht, um den His-getaggten C-Terminus abzuspalten und ein stabiles Fragment zu generieren, welches auch durch höhere Konzentrationen der Protease nicht weiter prozessiert wurde (Abb. 5).

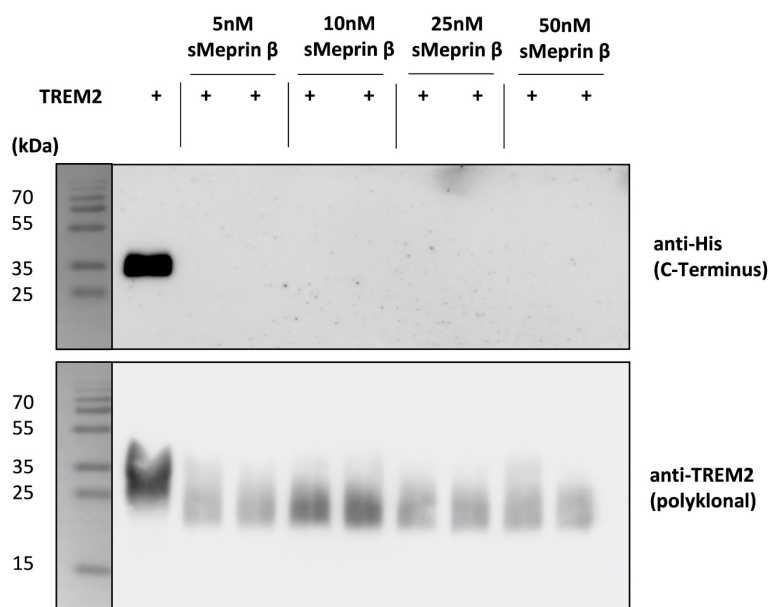


Abbildung 5: Spaltung von rekombinantem TREM2 durch lösliches Meprin β . Rekombinantes TREM2 wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen von löslichem Meprin β (sMeprin β) inkubiert. Bereits ab einer Konzentration von 5nM sMeprin β war kein Signal für den His-Tag mehr detektierbar, da das TREM2 C-terminal durch Meprin β gespalten wurde. Parallel dazu zeigt das durch den polyklonalen Antikörper nachgewiesene TREM2 eine Bandenverschiebung von etwa 35 kDa zu etwa 25 kDa.

Um beurteilen zu können, wie viel Zeit sMeprin β benötigt, um TREM2 zu spalten, wurde in einer Zeitreihe eine gleichbleibende Konzentration von 5 nM sMeprin β mit der rekombinanten Ektodomäne von TREM2 inkubiert. Hierdurch wurde ersichtlich, dass nach 30 min der Großteil des TREM2 durch sMeprin β proteolytisch prozessiert worden war (Abb. 6).

Zusammengenommen lässt sich durch diese beiden Experimente sagen, dass sMeprin β rekombinantes TREM2 sehr effektiv spaltet, da schon geringe Konzentrationen des Enzyms ausreichend sind und nur wenig Zeit benötigt wird.

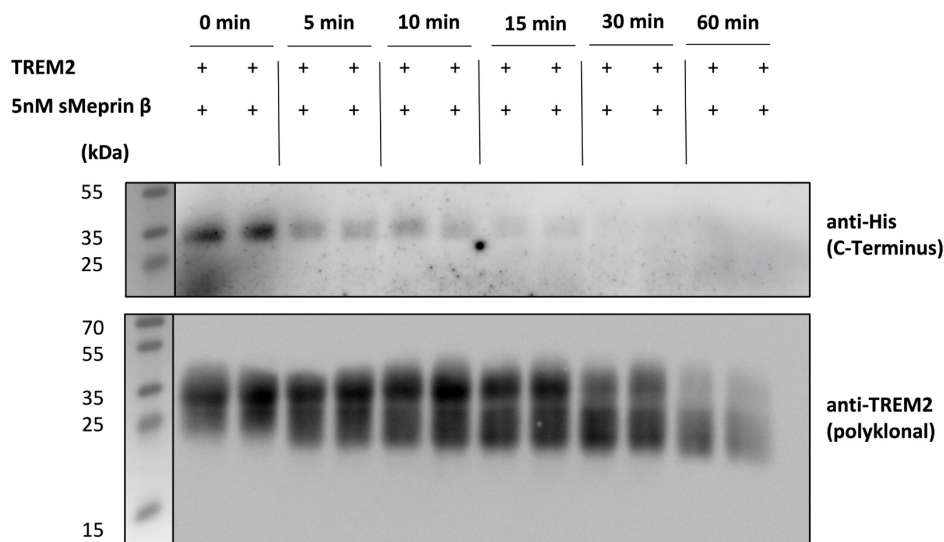


Abbildung 6: Zeitabhängige Spaltung des rekombinanten TREM2 durch sMeprin β . Rekombinantes TREM2 wurde mit 5 nM sMeprin β verdaut. Die Inkubation wurde nach unterschiedlichen Zeitpunkten beendet. Nach 30 min war kaum noch ein Signal für den His-Tag zu detektieren. Gleichzeitig war zu diesem Zeitpunkt für den Großteil des durch den polyklonalen Antikörper nachgewiesenen TREM2 eine Bandenverschiebung von etwa 35 kDa zu etwa 25 kDa erkennbar, welche die Spaltung beweist.

TREM2 liegt als glykosyliertes Protein vor. Dadurch ist es schwierig, seine exakte molekulare Masse zu bestimmen. Um dennoch die genaue Größe des durch den Verdau mit Meprin β entstandenen Fragmentes bestimmen zu können, wurde TREM2 mit Hilfe der Peptid-N-Glykosidase F (PNGase F) deglykosyliert. PNGase F ist ein Enzym, welches in der Lage ist, an Asparagin-Reste gebundene Oligosaccharide von Glykoproteinen abzuspalten (Tarentino et al., 1985). Da beide Glykosylierungen des TREM2 jeweils an einen Asparaginrest gebunden sind, stellt die PNGase F das optimale Enzym dar, um TREM2 zu deglykosylieren. Hierfür wurde erneut rekombinantes TREM2, welches in HEK293 Zellen exprimiert wurde, zusammen mit sMeprin β inkubiert. Anschließend wurde das verdaute TREM2 mit Hilfe der PNGase F deglykosyliert. Als Kontrolle wurden zusätzlich auch die Zuckerketten von proteolytisch

unverdaulichem TREM2 entfernt. Dies zeigte, dass durch sMeprin β verdautes TREM2 im Vergleich zu dem unverdaulichem TREM2 etwa 8 kDa kleiner ist (Abb. 7).

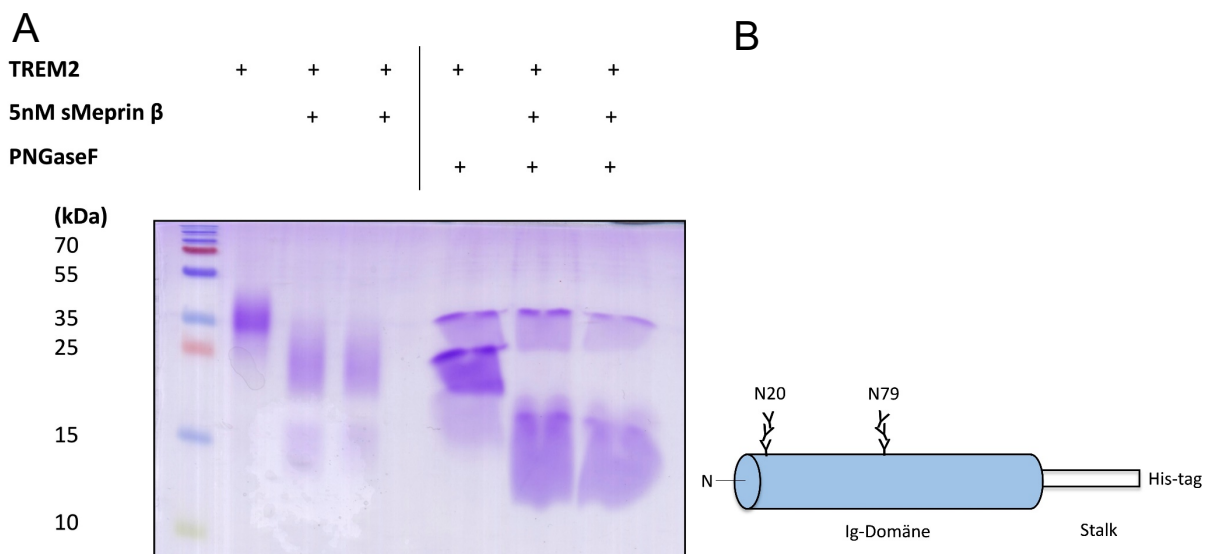


Abbildung 7: Deglykosylierung des rekombinanten TREM2. (A) Rekombinantes TREM2 wurde mit 5 nM sMeprin β für 2 h verdaut. Als Kontrolle diente unverdautes TREM2. Im Anschluss wurden die Proben mit Hilfe der PNGase F deglykosyliert. Das durch sMeprin β gesplittene TREM2 ist etwa 8 kDa kleiner als das unverdaute TREM2. **(B)** Schematische Darstellung des verwendeten TREM2-Konstrukts mit den N-glykosidischen Resten (N20, N79).

3.2 sMeprin β spaltet membrangebundenes TREM2

Für die nachfolgenden Versuche wurden HEK293T ADAM10/17^{-/-} Zellen benutzt. Da ADAM10 und ADAM17 bereits als Sheddasen für TREM2 identifiziert wurden (Kleinberger et al., 2014), stellte dies ein optimales System für die Untersuchung der Interaktion zwischen TREM2 und Meprin β dar. Denn auf diese Weise konnte eine „Verschleierung“ des Effektes von Meprin β durch die Aktivität der beiden anderen Proteasen ausgeschlossen werden.

Um zu untersuchen, ob sMeprin β ebenso in der Lage ist, TREM2 von der Zelloberfläche abzuspalten, wurde den mit TREM2 transfizierten HEK293T ADAM10/17^{-/-} Zellen sMeprin β hinzugefügt. Zur Beurteilung der Shedding-Aktivität von Meprin β wurden sowohl das in den Überstand entlassene lösliche TREM2 als auch das in der Membran verbleibende C-terminale Fragment (CTF) beurteilt. Dieses wird jedoch unter physiologischen Bedingungen innerhalb der Membran von der γ -Sekretase abgebaut (Wunderlich et al., 2013). Aus diesem Grund wurden die Zellen zusätzlich mit DAPT, einem Inhibitor der γ -Sekretase, behandelt.

Durch die Inkubation mit sMeprin β konnte eine deutliche Abnahme des membrangebundenen *full-length* TREM2 und eine Zunahme der CTFs beobachtet werden. Dies zeigt, dass sMeprin β auch im Zellsystem in der Lage ist, TREM2 zu spalten. Im Überstand hingegen wurde weniger sTREM2 detektiert (Abb. 8). Dies stimmt mit den Ergebnissen von bereits vorher erfolgten Experimenten überein (Berner & Wessolowski et al., 2020).

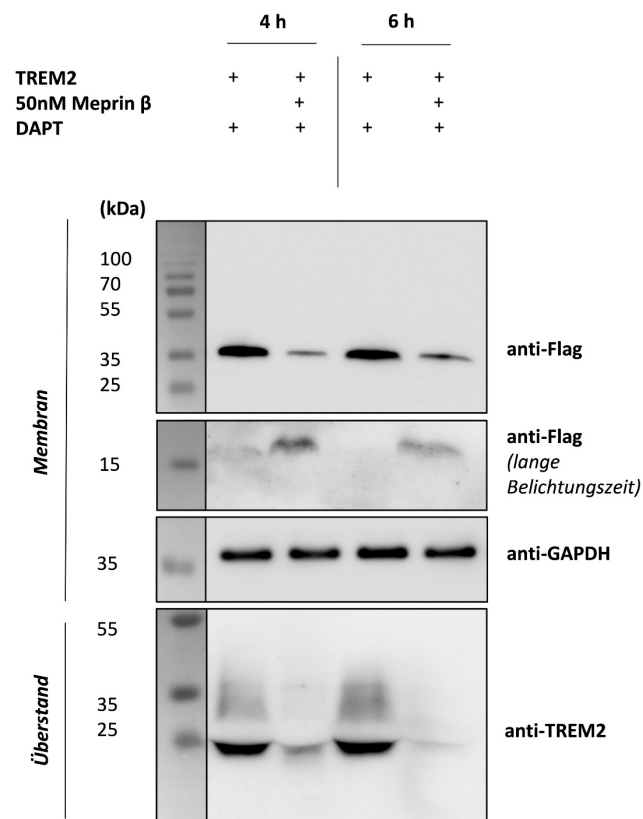


Abbildung 8: sMeprin β spaltet TREM2 in HEK293T ADAM10/17^{-/-} Zellen. TREM2 wurde in HEK293T ADAM10/17^{-/-} Zellen exprimiert. Anschließend wurde dem serumfreien Zellkulturmedium 50 nM sMeprin β und DAPT für 4 h oder 6 h hinzugefügt. TREM2 wurde mit Hilfe eines Flag-Tags detektiert, welcher mit dem C-Terminus verbunden war. Als Ladekontrolle diente GAPDH.

3.3 Einfluss von membrangebundenem Meprin β auf TREM2 ist nicht eindeutig zu bestimmen

Meprin β kann von ADAM10 und ADAM17 an der Zelloberfläche gespalten und als lösliches Meprin β (sMeprin β) in den Überstand entlassen werden. Dieses lösliche Meprin β ist, wie oben gezeigt, in der Lage, TREM2 an der Oberfläche von Zellen zu spalten. In einem weiteren Schritt sollte nun evaluiert werden, ob membrangebundenes Meprin β dazu ebenso fähig ist. Das in Berner et al., 2020 veröffentlichte Experiment (Figure 1B) legte dies nahe (Abb. 9). Es

ließ sich daraus schließen, dass Meprin β auch in der Co-Expression in der Lage ist, TREM2 zu spalten. Das Shedding war jedoch nicht so ausgeprägt wie in der Co-Expression mit ADAM10. Sowohl die durch ADAM10 als auch durch Meprin β generierten CTFs konnten durch die Inhibierung der γ -Sekretase angereichert werden.

Es ließ sich auch in dem Ansatz mit dem einzeln transfiziertem TREM2 bereits eine Zunahme der CTFs durch DAPT erkennen. Einerseits exprimieren die HEK-Zellen geringe Mengen endogenes Meprin β . Die Beobachtung könnte aber auch daraufhin deuten, dass es neben ADAM10, ADAM17 und löslichem Meprin β noch weitere Proteasen gibt, welche in der Lage sind, TREM2 zu spalten.

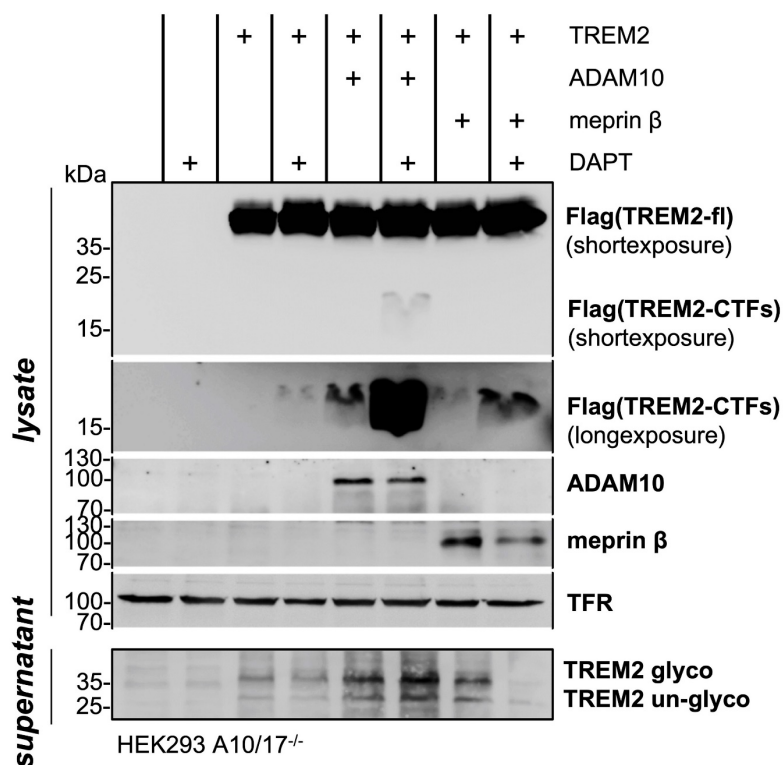


Abbildung 9: Membrangebundenes Meprin β spaltet TREM2. Co-Expression von TREM2 mit Meprin β oder ADAM10 in HEK293T ADAM10/17^{-/-} Zellen und Western Blot Analyse von *full-length* TREM2 (TREM2-fl) und C-terminalen Fragmenten (TREM2-CTFs) sowie vom Überstand. Als Ladekontrolle diente der Transferrin-Rezeptor (TFR). (aus Berner et al., 2020)

Die Fragestellung, ob membrangebundenes Meprin β fähig ist, TREM2 an der Oberfläche von Zellen zu spalten, lässt sich aus dem vorangegangenen Experiment nicht eindeutig beantworten. Für weitere Experimente wurden ebenso HEK293T ADAM10/17^{-/-} Zellen genutzt, in welchen durch die Abwesenheit der beiden ADAM Proteasen kein sMeprin β generiert werden konnte. TREM2 und Meprin β wurden zusammen exprimiert. Als Kontrolle wurde in einem zweiten Ansatz TREM2 zusammen mit ADAM10 transfiziert. Alle Zellen wurden mit

DAPT behandelt, um den Abbau der CTFs zu inhibieren. In der Co-Expression mit ADAM10 zeigte sich eine Reduktion der maturen *full-length* Form des TREM2 und eine Zunahme der CTFs und des sTREM2 im Überstand. Für die Ansätze, in denen Meprin β mit TREM2 exprimiert wurde, ließen sich diese Effekte jedoch nicht beobachten (Abb. 10A). Dies lässt also eher vermuten, dass membrangebundenes Meprin β nicht in der Lage ist, membrangebundenes TREM2 zu spalten.

Um diese Ergebnisse in einem weiteren Experiment zu überprüfen, wurde eine Co-Immunopräzipitation durchgeführt. Diese dient zur Beurteilung, ob eine Interaktion zwischen zwei Proteinen stattfindet. Dafür wird mittels eines spezifischen Antikörpers ein bestimmtes Protein aus dem Lysat präzipitiert. Wird indirekt ein weiteres Protein zusammen mit dem immunopräzipitierten Protein aus dem Lysat gefällt, so müssen diese beiden über Protein-Protein-Interaktionen miteinander verbunden sein. Um eine Interaktion zwischen Meprin β und TREM2 zu überprüfen, wurden die beiden Proteine in HEK293T ADAM10/17^{-/-} Zellen sowohl jeweils einzeln als auch zusammen überexprimiert. In einem Ansatz wurde TREM2 über den C-terminalen Flag-Tag präzipitiert. In einem zweiten Ansatz wurde Meprin β mittels des Hecto1-Antikörpers aus dem Lysat gefällt. Beide Ansätze wurden nach der Präzipitation mittels *Western Blot* Analyse jeweils auf TREM2 und Meprin β untersucht. Das Ergebnis zeigte, dass beide Proteine mittels ihres jeweiligen Antikörpers präzipitiert werden konnten. Jedoch zeigte sich auch, dass in beiden Ansätzen das jeweils andere, nicht präzipitierte Protein nicht detektierbar war (Abb. 10B). Diese Ergebnisse lassen eher darauf schließen, dass zwischen TREM2 und membrangebundenen Meprin β keine Interaktionen stattfinden.

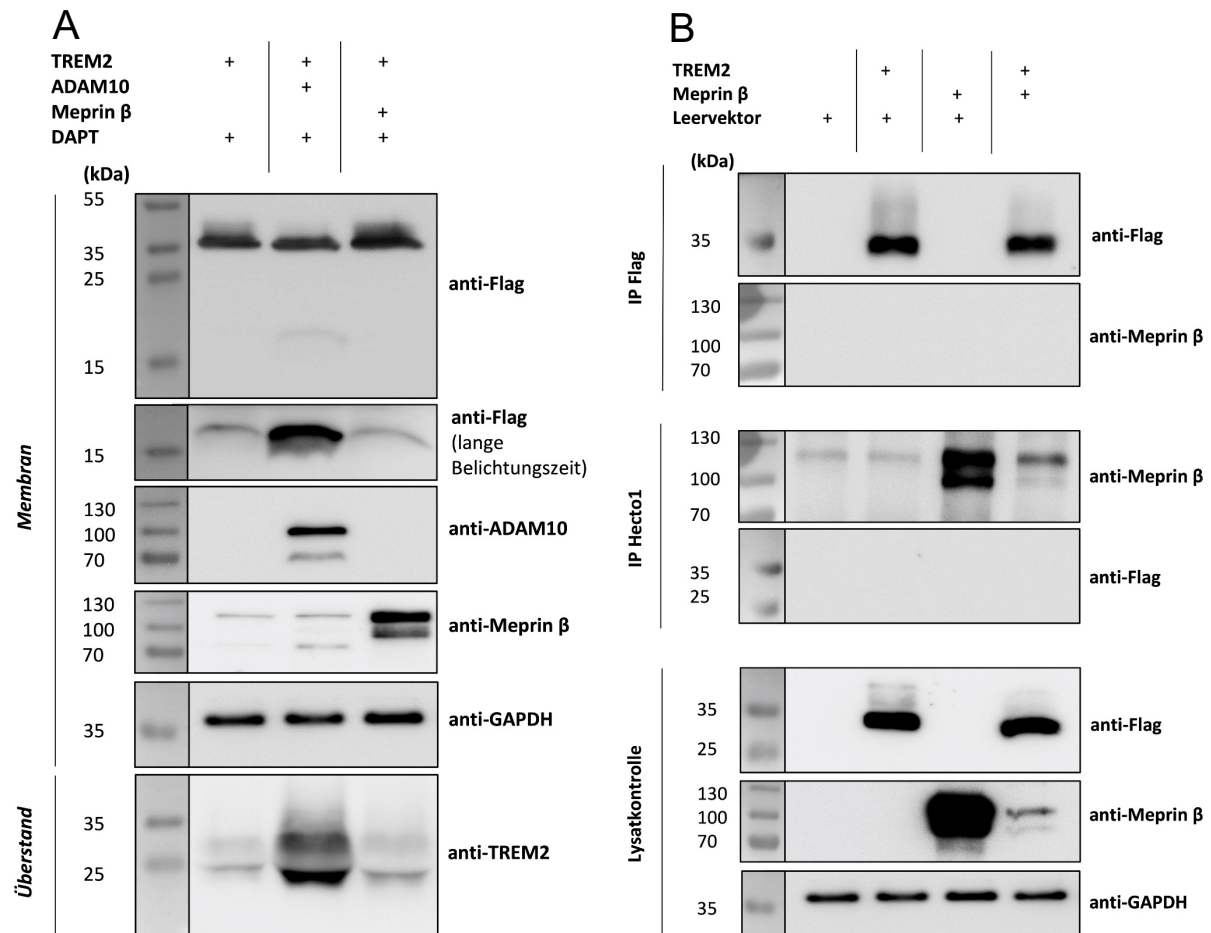


Abbildung 10: Immunopräzipitation von Meprin β und TREM2. (A) TREM2 wurde in HEK293T ADAM10/17^{-/-} Zellen mit Meprin β oder ADAM10 co-exprimiert. Als Kontrolle diente einzeln exprimiertes TREM2. Die Zellen wurden für 24 h mit DAPT behandelt. In der Co-Expression mit ADAM10 ließ sich eine Zunahme der C-terminalen Fragmente und des sTREM2 im Überstand beobachten. In der Co-Expression mit Meprin β zeigte sich dies nicht. (B) Es wurden TREM2 und Meprin β jeweils einzeln und zusammen in HEK293T ADAM10/17^{-/-} Zellen exprimiert. Nach der Zellyse wurde in einem Ansatz TREM2 mit Hilfe eines Antikörpers gegen den C-terminalen Flag-Tag und in einem zweiten Ansatz Meprin β mit Hilfe des Hecto1-Antikörpers immunopräzipitiert (IP). In beiden Ansätzen war das jeweils andere, nicht präzipitierte Protein nicht nachweisbar. Als Ladekontrolle diente GAPDH.

3.4 sMeprin β spaltet TREM2 zwischen Arginin 136 und Asparaginsäure 137

Um die genaue Spaltstelle für Meprin β in TREM2 zu identifizieren, wurde eine massenspektrometrische Analyse durchgeführt. Dafür wurde auf das *in vitro*-System zurückgegriffen (Abb. 11).

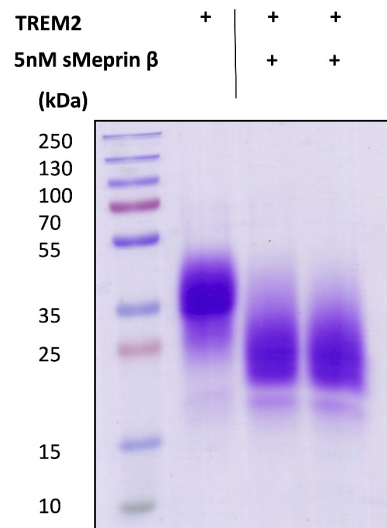


Abbildung 11: Darstellung der für die massenspektrometrische Analyse verwendeten Proben im Coomassie-Gel. 10 μ g des rekombinanten TREM2 wurden mit 5 nM sMeprin β für 2 h inkubiert. Als Kontrolle diente unverdautes TREM2. Anschließend wurden die Proteine mittels Coomassie-Färbung sichtbar gemacht.

Die LC/MS-Messung wurde von Dr. Tomas Koudelka (Institut für experimentelle Medizin, Arbeitsgruppe Systematische Proteomics und Bioanalytik, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel) durchgeführt. Hierfür wurden die angefärbten Banden in zwei Hälften geteilt, von denen jeweils eine mit Chymotrypsin und die andere mit LysargiNase verdaut wurde. Die Reaktion fand in einem Milieu mit schwerem Wasser (H_2^{18}O) statt (etwa 90%). Dadurch integrierten die Enzyme ^{18}O in die neuen C-Termini. Auf diese Weise war es möglich, die neuen C-Termini von den ursprünglichen, durch Meprin β generierten C-Termini, zu unterscheiden.

Combined TREM2 Control

10	20	30	40	50	60	70	80
MEPLRLLILL	FVTELSGAH	TTVFQGVAGQ	SLQVSCPYS	MKHWGRRKAW	CRQLGEKGPC	QRVVSTHNLW	LLSFLRRWNG
90	100	110	120	130	140	150	160
STAITDDTLG	GTLTITLRNL	QPHDAGLYQC	QSLHGSEADT	LRKVLVEVLA	DPLDHRDAGD	LWFPGESESF	EDAHVEHSIS
170	180	190	200	210	220	230	
RSLLEGEIPF	PPTSILLLLA	CIFLIKILAA	SALWAAAWHG	QKPGTHPPSE	LDCGHDPGYQ	LQTLPGLRDT	

Sequence Coverage of TREM2 incubated with meprin β

10	20	30	40	50	60	70	80
MEPLRLLILL	FVTELSGAH	TTVFQGVAGQ	SLQVSCPYS	MKHWGRRKAW	CRQLGEKGPC	QRVVSTHNLW	LLSFLRRWNG
90	100	110	120	130	140	150	160
STAITDDTLG	GTLTITLRNL	QPHDAGLYQC	QSLHGSEADT	LRKVLVEVLA	DPLDHRDAGD	LWFPGESESF	EDAHVEHSIS
170	180	190	200	210	220	230	
RSLLEGEIPF	PPTSILLLLA	CIFLIKILAA	SALWAAAWHG	QKPGTHPPSE	LDCGHDPGYQ	LQTLPGLRDT	

Abbildung 12: Darstellung der mittels Massenspektrometrie detektierten Peptide. Die mittels Massenspektrometrie identifizierten Peptide sind in der Aminosäuresequenz von TREM2 grün markiert. Rot markiert sind in der Analyse gefundene potentielle Glykosylierungsstellen. Diese stimmen mit den bereits beschriebenen Stellen überein. Grau markiert sind die in dem Konstrukt nicht enthaltenen Teile von TREM2 (Signalpeptid, Transmembrandomäne und zytosolischer Schwanz).

Die Analyse der gefundenen Peptide ergab eine dominante Spaltstelle zwischen Arginin 136 und Asparaginsäure 137 (Abb. 12+13). Dieses galt sowohl für die durch Chymotrypsin als auch für die durch LysargiNase verdauten Proben. Das Ergebnis wurde also in zwei unabhängigen Experimenten bestätigt. Die gefundene Spaltstelle passt genau zu der Präferenz von Meprin β für negativ geladene Aminosäuren an der P1'-Stelle.

Neben der Hauptsaltstelle wurden noch weitere, weniger dominante Spaltstellen gefunden. Diese befanden sich vor und nach negativ-geladenen Aminosäuren in dem Bereich zwischen den Aminosäuren 131 bis 147.

A

Annotated Sequence	Position in Protein	# PSMs	Theo. MH+ [Da]
[L].HGSEADTLRKVLVEVLADPL.[D]	[114-133]	1	2162.18156
[L].RKVLVEVLADPLDHRDA.[G]	[122-138]	4	1946.08178
[L].RKVLVEVLADPLDHR.[D]	[122-136]	51	1760.01773
[L].RKVLVEVLADPLDH.[R]	[122-135]	2	1603.91662
[L].RKVLVEVLADPLD.[H]	[122-134]	1	1466.85771
[L].RKVLVEVLADPL.[D]	[122-133]	3	1351.83076
[L].RKVLVEVLAD.[P]	[122-131]	2	1141.69393
[L].VEVLADPLDHRDAG.[D]	[126-139]	1	1506.7547
[L].VEVLADPLDHR.[D]	[126-136]	6	1263.66918
[L].VEVLADPLDH.[R]	[126-135]	1	1107.56807
[L].DHRDAGDLWFPGES.[E]	[134-147]	2	1601.69791
[L].DHRDAGDLWFPG.[S]	[134-146]	1	1514.66588
[L].DHRDAGDLWFPG.[E]	[134-145]	1	1385.62329

B

Annotated Sequence	Position in Protein	# PSMs	Theo. MH+ [Da]
[L].RKVLVEVLADPLDHRDAG.[D]	[122-139]	1	2003.10325
[L].RKVLVEVLADPLDHRDA.[G]	[122-138]	2	1946.08178
[L].RKVLVEVLADPLDHR.[D]	[122-136]	8	1760.01773
[L].RKVLVEVLADPL.[D]	[122-133]	1	1351.83076
[R].KVLVEVLADPLDHR.[D]	[123-136]	2	1603.91662

C

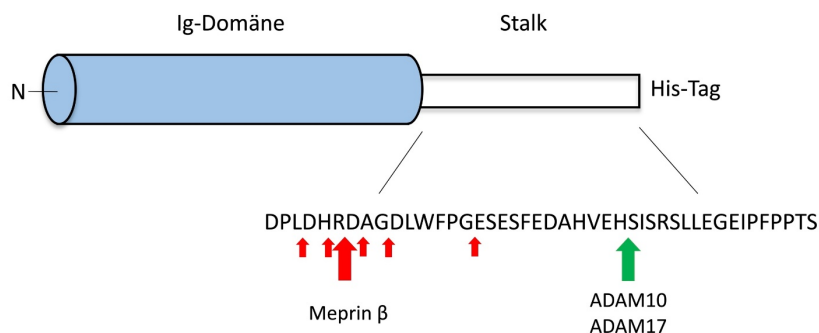


Abbildung 13: Die Hauptsplattstelle von Meprin β befindet sich zwischen Arginin 136 und Asparaginsäure 137. Diese wurde bestimmt durch die Anzahl an *Peptid Spektrum Matches* (PSMs). Peptide wurden dann als originale C-Termini angesehen, wenn sie weder ^{18}O enthielten noch in der Kontrolle vorhanden waren. In **(A)** wurden die Proben für die massenspektrometrische Analyse mit Chymotrypsin verdaut, welches Proteine typischerweise hinter hydrophoben und aromatischen Aminosäuren spaltet. In **(B)** wurde hierfür LysArgiNase verwendet, welches Proteine N-terminal von Lysin und Arginin schneidet. **(C)** zeigt ein Modell mit den Haupt- und Nebensplattstellen von Meprin β . Zusätzlich ist die Splattstelle von ADAM10/ADAM17 eingezeichnet.

3.5 Meprin β beeinflusst sTREM2 Level *in vivo*

Um zu überprüfen, ob Meprin β auch *in vivo* eine Rolle in der Prozessierung von TREM2 spielt, wurden, wie in Berner & Wessolowski et al., 2020 beschrieben, mit Hilfe eines ELISA die Level an sTREM2 im Serum von Meprin β Knock-out Mäusen (Norman et al., 2003) gemessen. Bei diesen wurde im Vergleich zu wildtypischen Mäusen signifikant weniger sTREM2 im Serum detektiert (Abb. 14).

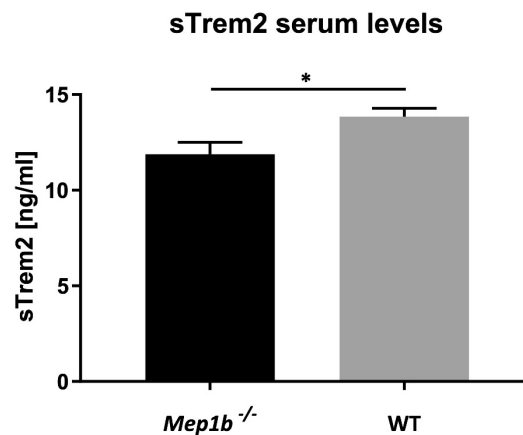


Abbildung 14: Signifikant weniger sTREM2 im Serum von Meprin β Knock-out Mäusen (*Mep1b*^{-/-}) im Vergleich zu wildtypischen Mäusen (WT). ELISA zur spezifischen Detektion von murinem TREM2 im Serum. (aus Berner & Wessolowski et al., 2020)

Um dies zu überprüfen, wurden in einem weiteren Experiment primäre Makrophagen aus LysM-Cre Meprin β Knock-In Mäusen verwendet. Meprin β wird auf Makrophagen exprimiert und spielt dort eine Rolle in der Zellmigration und der Produktion von pro-inflammatorischen Stimuli (Crisman et al., 2004; Li et al., 2014).

Die Meprin β Knock-In Mäuse wurden von Dr. Florian Peters generiert (Abb. 15). Es wurde das Meprin β -Gen zusammen mit einem Stoppcodon in den Rosa26-Locus inseriert. Das Stoppcodon kann durch eine Cre-Rekombinase herausgeschnitten werden, sodass das Meprin β -Gen transkribiert werden kann. Die Cre-Rekombinase steht unter der Kontrolle des Promoters des Lysozym 2-Gens, welches nur in Zellen der myeloischen Reihe exprimiert wird. Somit wird Meprin β nur in Zellen der angeborenen Immunabwehr überexprimiert.

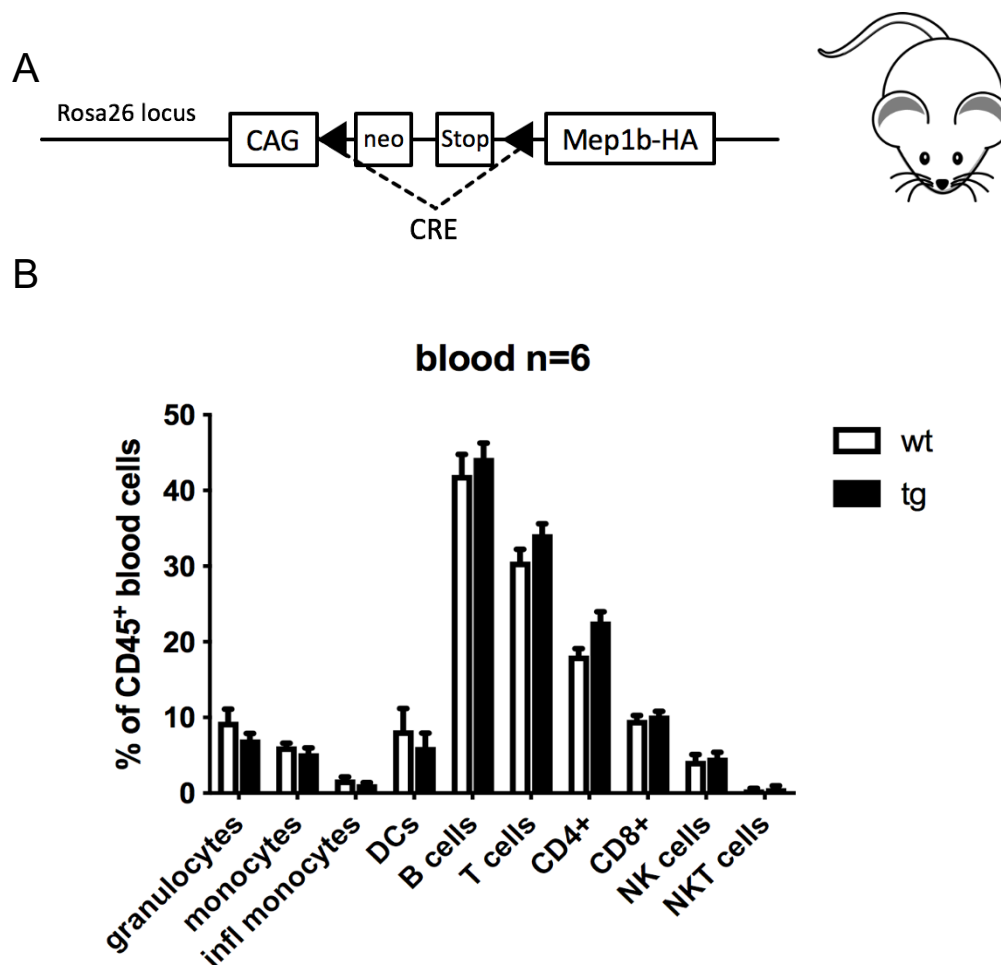


Abbildung 15: Charakterisierung der LysM-Cre Meprin β Knock-In Mäuse. (A) Expressionskassette des Meprin β -Gens (Mep1b-HA) im Rosa26 Locus. Das Stoppcodon kann durch eine Cre-Rekombinase herausgeschnitten werden. (B) FACS-Analyse von CD45-positiven Zellen und Darstellung in prozentualen Anteilen. Es sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den LysM-Cre Meprin β Knock-In Mäusen (tg) und wildtypischen Mäusen (wt) zu erkennen. Die Daten wurden freundlicherweise von Dr. Florian Peters zur Verfügung gestellt. Die FACS-Analyse wurde von ihm und Dr. Neele Schumacher durchgeführt.

Aus den Mäusen wurden primäre Makrophagen präpariert, um die sTREM2 Level im Überstand der Makrophagen aus Meprin β überexprimierenden Mäusen mit denen aus Wildtyp-Kontrolltieren zu vergleichen (Abb. 16). Dafür wurden die Überstände der differenzierten *bone-marrow derived macrophages* (BMDMs) für 24 h gesammelt und anschließend mit Hilfe eines sTREM2-ELISA analysiert. Die Zellen wurden zu Lysaten verarbeitet und mittels *Western Blot* Verfahren untersucht. Im Überstand ließ sich eine Reduktion des sTREM2 der Meprin β überexprimierenden BMDMs im Vergleich zu den wildtypischen BMDMs erkennen. In den Lysatkontrollen ließ sich Meprin β nur in den

überexprimierenden BMDMs identifizieren, während in den wildtypischen BMDMs nicht ausreichend endogenes Meprin β für eine Detektion im *Western Blot* exprimiert wurde. TREM2 war in allen BMDMs etwa gleich viel vorhanden.

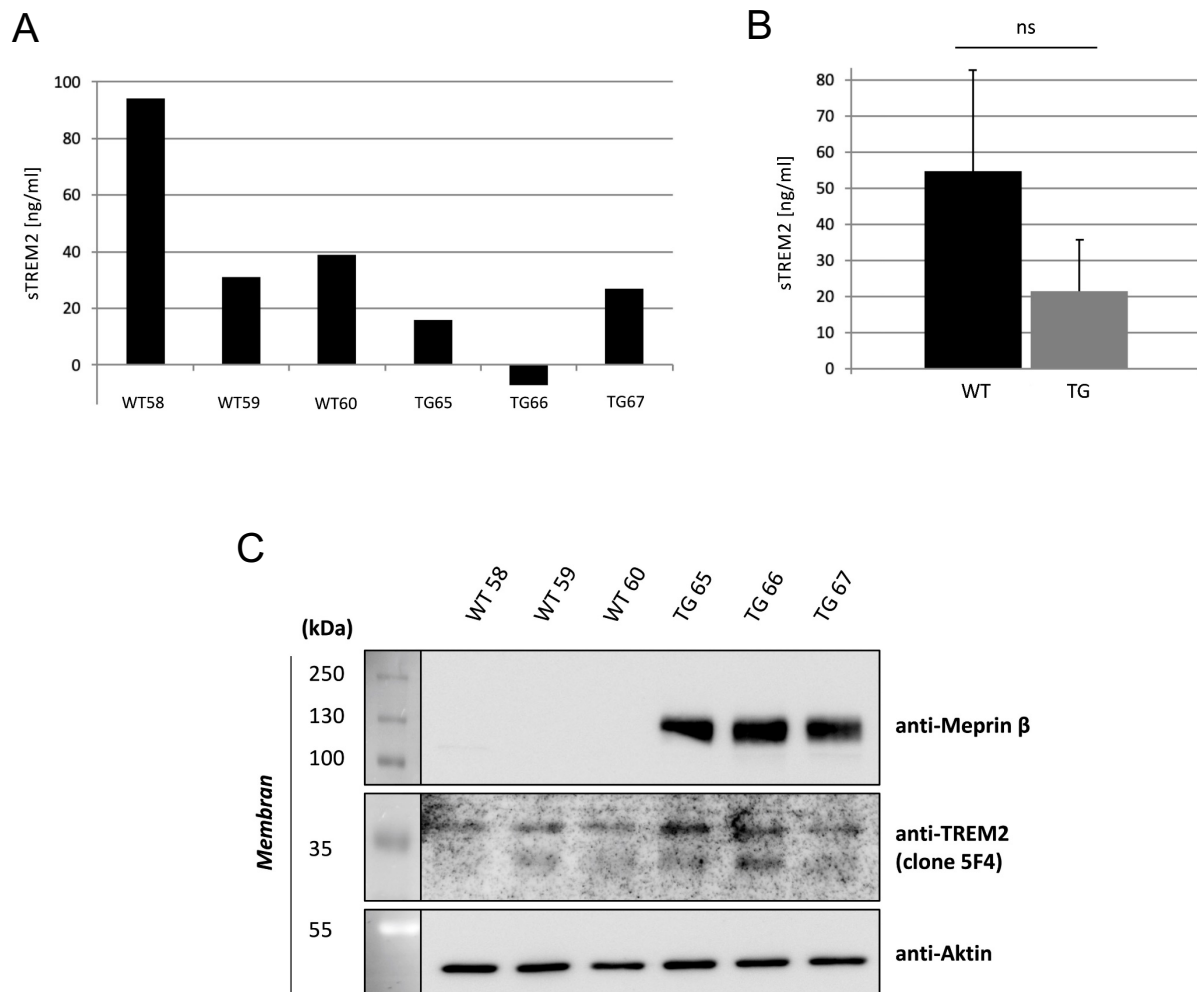


Abbildung 16: Analyse des sTREM im Überstand von Meprin β überexprimierenden und wildtypischen *bone-marrow derived macrophages*. (A) sTREM2 Level in den wildtypischen Mäusen (WT58, WT59, WT60) und den überexprimierenden (transgenen) Mäusen (TG65, TG66, TG67). Der für TG66 detektierte Wert lag unterhalb des durch den Standard erfassten Bereichs und wird daher in (B) nicht berücksichtigt. (B) Zusammenfassende Darstellung der Daten. Es wurde ein unabhängiger, zweiseitiger t-Test durchgeführt. Der Unterschied ist nicht statistisch signifikant ($P = 0,2319$). (C) Lysatkontrollen für Meprin β und TREM2 mittels *Western Blot*. Als Ladekontrolle diente Aktin.

3.6 Shedding von TREM2 H157Y wird durch Meprin β gesteigert

Mutationen im TREM2-Gen können neurodegenerative Pathologien verursachen (Guerreiro et al., 2013; Jonsson et al., 2013). Deswegen ist es von Interesse, diese Mutationen in Bezug auf das Shedding durch Meprin β zu untersuchen. Hierfür wurde der TREM2 Wildtyp, die R47H-Variante und die H157Y-Variante zusammen mit Meprin β in HEK293T ADAM10/17^{-/-} Zellen überexprimiert. Zur Inhibition der γ -Sekretase und Darstellung der CTFs wurden die Zellen mit DAPT behandelt. Die Lysate und Überstände wurden mit Hilfe des *Western Blot* Verfahrens analysiert. Auch hier waren bereits in den Ansätzen ohne Meprin β CTFs erkennbar. Diese traten im Vergleich zum Wildtyp und der R47H-Variante vermehrt bei der H157Y-Variante auf. In der Co-Transfektion der H157Y-Variante mit Meprin β wurde die Menge an CTFs im Vergleich zu der Einzeltransfektion der H157Y-Variante noch einmal zusätzlich gesteigert. Dieser Effekt zeigte sich jedoch nicht für die wildtypische und die R47H-Variante. Hier hatte die Co-Expression mit Meprin β kaum einen Einfluss auf die Level an CTFs. Interessanterweise waren die sTREM Level im Überstand trotzdem in allen drei Ansätzen mit Meprin β vermindert (Abb. 17).

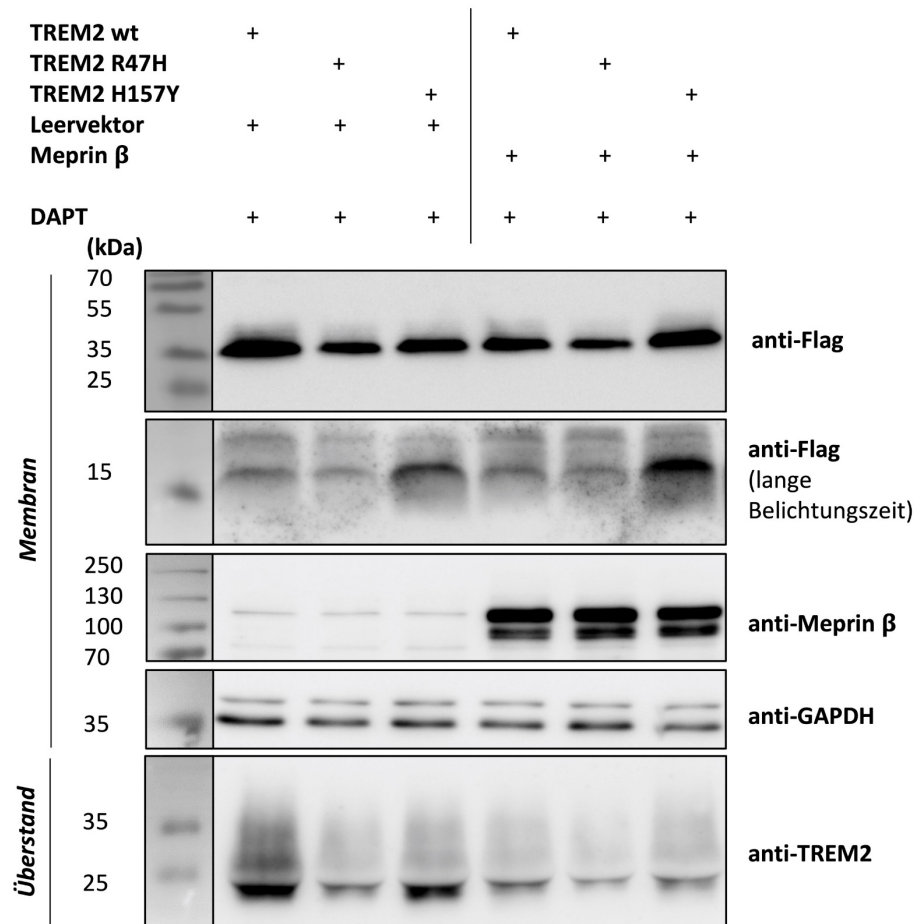


Abbildung 17: Co-Expression von wildtypischem TREM2 (TREM2 wt), R47H TREM2 und H157Y TREM2 mit Meprin β . HEK293T ADAM10/17^{-/-} Zellen wurden entweder mit den TREM2-Varianten einzeln oder zusammen mit Meprin β transfiziert. Allen Ansätzen wurde DAPT zugefügt. Die Überstände wurden für 24 h gesammelt und anschließend gefällt. Die Lysate und Überstände wurden mittels *Western Blot* analysiert. In der Co-Expression von H157Y TREM2 mit Meprin β zeigten sich vermehrt C-terminale Fragmente. Als Ladekontrolle diente GAPDH.

3.7 Das Shedding von TREM2 wird neben ADAM10, ADAM17 und Meprin β noch von weiteren Proteasen beeinflusst

In den vorherigen Experimenten mit den HEK293T ADAM10/17^{-/-} Zellen wurde deutlich, dass es neben ADAM10, ADAM17 und sMeprin β noch weitere Proteasen geben könnte, welche in der Lage sind, TREM2 zu spalten. Um näher eingrenzen zu können, um welche Klasse von Proteasen es sich dabei handelt, wurden diese systematisch inhibiert (Abb. 18). Es wurden Inhibitoren verwendet, welche zusammen ein breites Spektrum an Proteasen abdecken. So inhibiert Pepstatin A Aspartatproteasen, E-64 hemmt Cysteinproteasen, Pefabloc Serinproteasen, Marimastat Matrix-Metalloproteasen (MMPs) und EDTA Metalloproteasen. Während Actinonin am stärksten Meprin β inhibiert, hemmt GI254023X vor allem ADAM10,

und GW280264X sowohl ADAM10 als auch ADAM17. Die Inhibitoren wurden dem serumfreien Medium von TREM2 überexprimierenden HEK293T ADAM10/17^{-/-} Zellen für 24 h hinzugefügt und dabei nach der Hälfte der Zeit einmal nachgelegt. Als Kontrolle dienten TREM2 überexprimierende Zellen, denen kein Inhibitor zugesetzt wurde. Die Lysate wurden mittels *Western Blot* Verfahren analysiert. Es konnte keine klare Aussage aus dem Experiment gezogen werden, da die Ergebnisse in allen Wiederholungen sehr variabel ausfielen. Pepstatin A zeigte als einziger Inhibitor eine konstante Wirkung, die sich in einer Zunahme an CTFs äußerte. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die γ -Sekretase eine Aspartatprotease ist (Wolfe et al., 1999). Dadurch ist Pepstatin A neben DAPT ein weiterer Inhibitor der γ -Sekretase und inhibiert zusätzlich den Abbau der CTFs. Für Marimastat und Pefabloc ließ sich in einigen Experimenten eine Reduktion der CTFs erkennen, jedoch war dieser Effekt nicht immer reproduzierbar. Gleiches gilt auch für Actinonin und GW. E-64 hingegen schien keinen oder nur einen sehr geringen Effekt auf das Shedding von TREM2 zu haben. Somit wird TREM2 wahrscheinlich nicht zusätzlich durch eine Cysteinprotease gespalten.

Zusammenfassend ließ sich aus diesen Experimenten schließen, dass es neben ADAM10, ADAM17 und löslichem Meprin β noch weitere Proteasen gibt, welche einen Einfluss auf das Shedding von TREM2 haben. Diese stammen vermutlich aus mehreren unterschiedlichen Klassen von Proteasen.

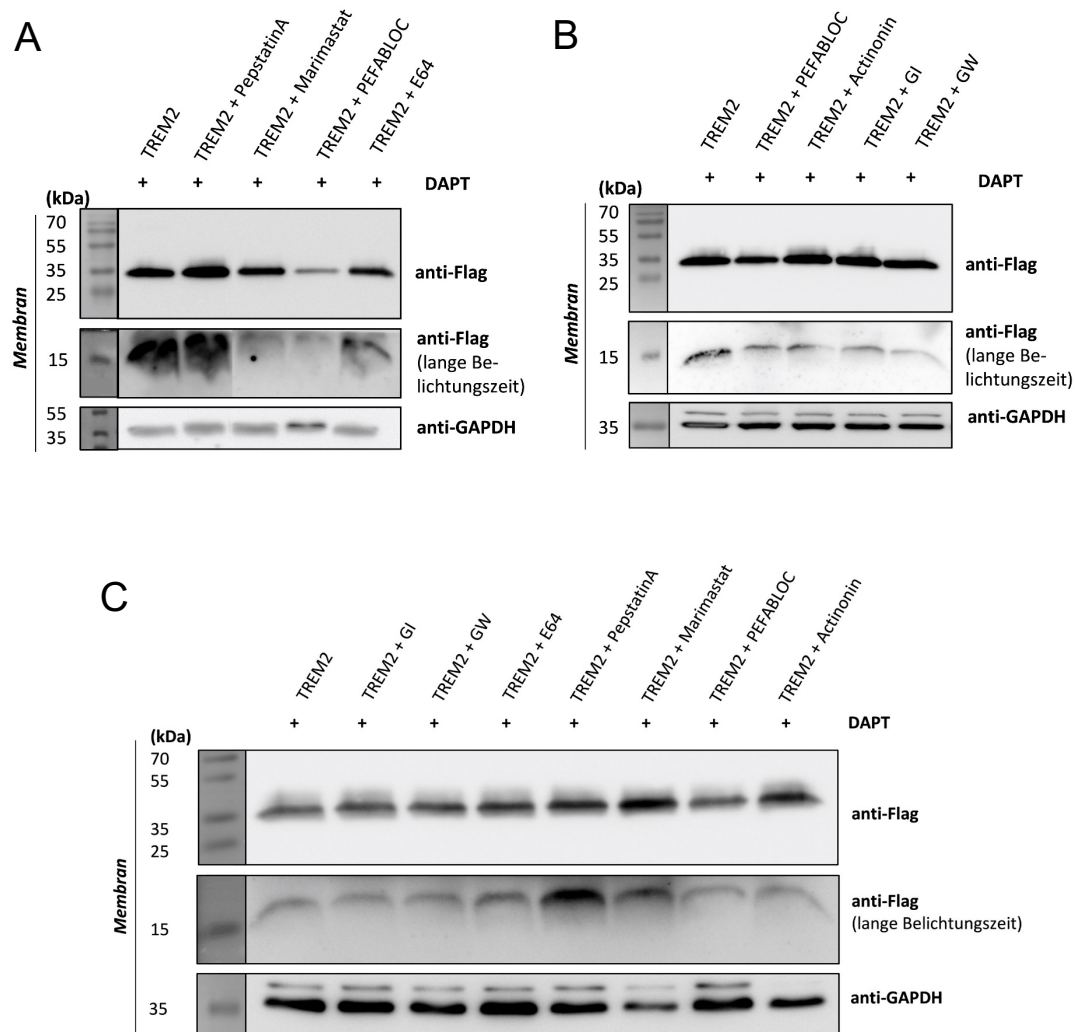


Abbildung 18: Identifizierung von zusätzlichen TREM2 Proteasen mittels Proteaseinhibitoren. HEK293T ADAM10/17^{-/-} Zellen wurden mit TREM2 transfiziert und anschließend mit unterschiedlichen Inhibitoren, welche verschiedene Proteaseklassen hemmen, versetzt. Zusätzlich wurden die Zellen in allen Ansätzen mit DAPT behandelt. Als Ladekontrolle diente GAPDH.

4 Diskussion

4.1 Meprin β ist ein proteolytischer Regulator des TREM2

TREM2 ist ein Rezeptor, welcher auf Zellen der myeloischen Reihe exprimiert wird. Es kommt sowohl auf peripheren Immunzellen als auch auf Mikroglia, den Repräsentanten des mononukleären Phagozytose-Systems im Zentralnervensystem, vor. Es konnte nachgewiesen werden, dass TREM2 eine Rolle in der Pathogenese verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen spielt, von denen Morbus Alzheimer die bekannteste und prävalenteste ist. Dabei ist TREM2 wichtig für die Aktivierung der Mikroglia (Keren-Shaul et al., 2017), sowie für die Ansammlung der Mikroglia um neurotoxische A β Plaques und die Aufnahme der A β -Peptide in die Zelle (Wang et al., 2016; Yeh et al., 2016).

Auch im peripheren Immunsystem ist TREM2 beteiligt an der Modulation der Immunantwort, wo es für die Aktivierung der Makrophagen mit M2 Phänotyp verantwortlich ist. Dadurch hat es einen Einfluss auf verschiedene Erkrankungen, wie zum Beispiel COPD (Byers et al., 2018) oder Pathologien der enteralen Mukosa (Seno et al., 2009).

Der Turnover von TREM2 an der Zelloberfläche von Makrophagen ist mit einer Halbwertszeit von <1h bemerkenswert schnell. Dabei wird der Großteil des TREM2 durch Shedding in das Medium entlassen und nur ein geringer Teil wieder in die Zelle aufgenommen (Thornton et al., 2017). So lässt sich schlussfolgern, dass die Verfügbarkeit des Rezeptors an der Zelloberfläche und damit die funktionelle Kapazität von Makrophagen und Mikroglia durch Änderungen der proteolytischen Prozessierung der Ektodomäne reguliert werden kann (Kleinberger et al., 2014; Schlepckow et al., 2017). Aus diesem Grund ist es sehr wichtig, die Prozessierung des TREM2 zu untersuchen.

In vielen Studien wurden bereits ADAM10 und ADAM17 als Sheddasen für TREM2 identifiziert und näher charakterisiert (Kleinberger et al., 2014; Schlepckow et al., 2017; Thornton et al., 2017; Wunderlich et al., 2013). Jedoch wiesen Inhibitionsversuche in diesen Studien darauf hin, dass es neben den beiden bereits beschriebenen Proteasen noch weitere Sheddasen geben muss. In der Dissertation von Dennis Berner (UKSH, Kiel) wurde daraufhin Meprin β als eine dieser zusätzlichen Proteasen identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass Meprin β in der Lage ist, TREM2 an der Zelloberfläche zu spalten. Dabei waren sowohl das membrangebundene Meprin β als auch die lösliche Ektodomäne (sMeprin β) dazu fähig (Berner, 2021). In der hier vorliegenden Arbeit konnte dies für lösliches Meprin β unter Verwendung eines HEK293T-Zellsystems, welches defizient für die Proteasen ADAM10 und ADAM17 war, ebenso nachgewiesen werden. Jedoch galt dies nicht für membranständiges Meprin β . So ließ sich in dieser Arbeit mittels Co-Immunopräzipitation keine Interaktion

zwischen TREM2 und Meprin β detektieren. Des Weiteren konnte durch die Expression von membranständigem Meprin β im Zellsystem kein Shedding von TREM2 nachgewiesen werden. Ob dieser Unterschied jedoch eine physiologische Relevanz hat, lässt sich nur schwer sagen.

Des Weiteren konnte in der Arbeit von Dennis Berner gezeigt werden, dass sTREM2 in der Gegenwart von Meprin β nach dem Shedding von der Zelloberfläche weiter proteolytisch degradiert wird (Berner, 2021). Es wurde vermutet, dass dies durch Meprin β , sowohl in membranständiger als auch löslicher Form, erfolgt. Auch die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse bestätigen den zuvor beschriebenen Effekt, dass sich in der Anwesenheit von Meprin β weniger sTREM2 im Überstand der HEK293T ADAM10/17^{-/-} Zellen findet. Jedoch war dies nicht der Fall, sobald man die Interaktion von sMeprin β und sTREM2 isoliert von zellulären Strukturen betrachtet. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass Meprin β zwar selbst nicht in der Lage ist, sTREM2 weiter zu degradieren, jedoch das durch sMeprin β generierte TREM2 Fragment ein Substrat für andere Proteasen darstellt, welche in dem Zellsystem ebenfalls exprimiert werden. Meprin β präferiert eine andere TREM2 Spaltstelle als ADAM10 und ADAM17, wodurch das dadurch entstehende sTREM2 für andere Proteasen zugänglich ist. Dies ist ein interessanter Befund, da die Abspaltung der Ektodomäne von TREM2 nicht nur eine regulatorische Funktion im Sinne der Kontrolle von verfügbarem TREM2 an der Zelloberfläche hat, sondern das entstandene sTREM2 auch eine Rolle im *Signalling* spielt. So ist es in der Lage, das Überleben von Mikroglia und die Produktion von pro-inflammatorischen Stimuli zu fördern (Zhong et al., 2017).

Unterschiede im Shedding von TREM2 durch ADAM10 und ADAM17 gegenüber Meprin β finden sich nicht nur in der Lokalisation der Spaltstelle, sondern auch auf funktioneller Ebene. Es scheint, als hätte das Shedding durch Meprin β vor allem die Funktion, das verfügbare TREM2 an der Zelloberfläche zu regulieren. Damit hat es einen Einfluss auf die Funktionalität des Immunsystems. Da in der Pathogenese von Alzheimer der Inflammation eine immer größere Rolle zugeordnet wird (Heppner et al., 2015; Newcombe et al., 2018), ist dies auch dahingehend von Interesse. Des Weiteren wurde sTREM2 als potentieller Biomarker im Liquor cerebrospinalis zur Früherkennung und Risikoabwägung von neurodegenerativen Erkrankungen postuliert (Suárez-Calvet et al., 2016). Dabei wurde davon ausgegangen, dass eine dysregulierte Expression von TREM2 an der Zelloberfläche mit einer geringen Menge an sTREM2 im Liquor korreliert. Eine weitere proteolytische Prozessierung von sTREM2 wurde nicht in Betracht gezogen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass dies in der Gegenwart von Meprin β durchaus der Fall ist. Unter diesen neu gewonnen Erkenntnissen ist die Verwendbarkeit des sTREM2 als Biomarker für neurodegenerative Erkrankungen noch einmal kritisch zu überdenken.

Die in dieser Arbeit mittels Massenspektrometrie identifizierte Hauptsplattstelle von Meprin β im TREM2-Protein liegt zwischen Arginin 136 und Asparaginsäure 137. Dies passt perfekt zu der Präferenz von Meprin β für negativ geladene Aminosäuren an der P1' Position (Becker-Pauly et al., 2011). In Thornton et al. wurde der konditionierte Überstand von primären humanen Makrophagen und primären murinen Mikroglia auf sTREM2 untersucht (Thornton et al., 2017). In beiden Überständen wurde nach Deglykosylierung ein vorherrschendes 17 kDa und ein kleineres 15 kDa TREM2 Fragment detektiert. Das durch Meprin β generierte sTREM2 ist etwa 2 kDa kleiner als das durch ADAM10/ADAM17 generierte sTREM2, da die Splattstelle weiter N-terminal gelegen ist. Somit passt das 15 kDa Fragment gut zu dem sTREM2, welches von Meprin β an der von uns detektierten Splattstelle hydrolysiert wird, während das größere 17 kDa Fragment dem durch ADAM10/ADAM17 an der weiter C-terminal gelegenen Splattstelle generierten sTREM2 entspricht. Interessanterweise befindet sich in der Nähe der Meprin β Hauptsplattstelle eine TREM2 Mutation (D134G), welche im Zusammenhang mit Frontotemporaler Demenz steht (Sirkis et al., 2017). Es ist möglich, dass diese Mutation unter bestimmten Bedingungen das Shedding von TREM2 durch Meprin β beeinflusst. Diese Fragestellung sollte in weiterführenden Studien näher untersucht werden. Die neben der Hauptsplattstelle gefundenen, weniger dominanten Splattstellen befinden sich in dem Bereich zwischen den Aminosäuren 131 bis 147. Hierbei muss beachtet werden, dass durch den *in vitro*-Ansatz des Experimentes eventuell Splattstellen verfügbar waren, die es in einem zellulären System so nicht gegeben hätte.

In dieser Arbeit konnte außerdem durch Inhibitionsversuche gezeigt werden, dass es neben ADAM10, ADAM17 und Meprin β noch weitere Proteasen gibt, die in der Lage sind, das Shedding von TREM2 zu beeinflussen. Dabei konnte festgestellt werden, dass diese Proteasen aus unterschiedlichen Klassen von Proteasen stammen. Jedoch waren die Ergebnisse nicht in allen Replikaten des Experiments reproduzierbar. Eine mögliche Erklärung für die Variabilität der Ergebnisse ist, dass ein durch Inhibitoren moduliertes, endogenes Shedding untersucht wurde. Dieses System ist im Vergleich zu einem System, in welchem zelluläre Prozesse mittels Überexpression untersucht werden, deutlich anfälliger für exogene Störungen. Des Weiteren unterliegt es größeren Schwankungen, da die Zelle die Expression der Proteine in einem homöostatischen Gleichgewicht reguliert und nicht durch Plasmidvektoren zu einer Überexpression von bestimmten Proteinen gebracht wird. Außerdem muss beachtet werden, dass auch die Möglichkeit besteht, dass TREM2 bereits auf dem sekretorischen Weg geschnitten wird. Jedoch sind nicht alle der genutzten Inhibitoren membrangängig, haben also Zugang zum Zellinneren. Welche Proteasen konkret in welchem Rahmen einen Einfluss auf das Shedding von TREM2 nehmen und ob dies physiologisch relevant ist, muss in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden.

4.2 Beeinflusst Meprin β durch das TREM2-Cleavage die Pathogenese des Morbus Alzheimer?

In verschiedenen Studien konnte eine Verbindung zwischen Meprin β und der Entstehung von Morbus Alzheimer nachgewiesen werden. Meprin β wird in Gehirnen von Morbus Alzheimer Patienten im Vergleich mit gleichaltrigen gesunden Kontrollpatienten verstärkt exprimiert (Bien et al., 2012). Ob Meprin β dabei den Verlauf der Erkrankung eher positiv oder negativ beeinflusst, lässt sich jedoch nicht sagen. Auf der einen Seite ist es in der Lage, das *Amyloid Precursor Protein* (APP) zu spalten. Dieses kann auf zwei grundlegend unterschiedlichen Wegen prozessiert werden. Im amyloidogenen Weg wird das APP zunächst durch ein β -Sekretase (vornehmlich BACE1) und anschließend durch die γ -Sekretase gespalten. Dabei entstehen A β -Peptide. Diese können aggregieren und so die typischen A β -Plaques bilden, welche in den Gehirnen von Alzheimer-Patienten zu finden sind. Bei der Spaltung des APP durch Meprin β entstehen N-terminal gekürzte A β -Peptide, welche im Vergleich zu den durch BACE1 generierten A β -Peptiden sogar stärker aggregieren (Schönherr et al., 2016). Diese A β -Peptide konnten bereits in humanem Liquor cerebrospinalis nachgewiesen werden (Bibl et al., 2012; Wiltfang et al., 2001). Hier scheint Meprin β also das Fortschreiten der Erkrankung zu fördern.

Auf der anderen Seite ist Meprin β in der Lage, die Aktivität von ADAM10 durch die Spaltung seines inhibitorischen Propeptids zu fördern (Jefferson et al., 2013). ADAM10 ist als α -Sekretase für die nicht-amyloidogene Spaltung des APP verantwortlich (Andrew et al., 2016). Bei diesem Weg der Prozessierung entstehen keine neurotoxischen A β -Peptide. Dies würde für eine eher protektive Rolle des Meprin β im Kontext des Morbus Alzheimer sprechen.

Ein weiterer Teil der Pathologie des Morbus Alzheimer besteht in einer inflammatorischen Reaktion auf die A β -Plaques im Gehirn, welche durch Mikroglia, den Repräsentanten des Mononukleär-Phagozytären Systems im ZNS, hervorgerufen wird. Mikroglia haben eine hohe Expression an TREM2 (Butovsky et al., 2013). Die Menge an TREM2 auf der Zelloberfläche kann unter anderem durch ADAM10 und ADAM17 vermitteltes Shedding vermindert werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch Meprin β an der Prozessierung des TREM2 beteiligt ist. Ebenso wie bei dem Shedding durch ADAM10 und ADAM17 führt die Spaltung durch Meprin β zu einer Reduktion des verfügbaren *full-length* TREM2. Mikroglia sind für die Phagozytose der A β -Peptide und A β -Plaques verantwortlich. Für diese Aufgabe ist das TREM2 essentiell (Keren-Shaul et al., 2017; Mazaheri et al., 2017; Ulland et al., 2017). So führt ein Verlust des TREM2 zu einer verminderten Beseitigung der A β -Plaques. Auf der anderen Seite modulieren die Mikroglia mit Hilfe des TREM2 jedoch auch die neuroinflammatorische Reaktion auf die A β -Plaques, welche den Progress der Alzheimer-

Erkrankung vorantreibt (Jay et al., 2015). An dieser Stelle wäre Meprin β durch die Reduktion des *full-length* TREM2 protektiv.

Zu einem Funktionsverlust des *full-length* TREM2 kann es einerseits durch Shedding, andererseits auch durch *Missense* oder *Loss-of-function* Mutationen im TREM2 Gen kommen. In genetischen Studien konnten verschiedene TREM2 Polymorphismen mit der Entstehung von Morbus Alzheimer korreliert werden (Guerreiro et al., 2013; Jonsson et al., 2013). Die durch eine Punktmutation veränderte T66M-Variante des TREM2 wird durch eine fehlerhafte Faltung im endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten und gelangt gar nicht erst an die Zelloberfläche (Kleinberger et al., 2014). Die R47H Variante weist eine verminderte Ligandenbindung auf, was ebenfalls zu einem Funktionsverlust des TREM2 führt (Atagi et al., 2015; Wang et al., 2015). Die H157Y-Mutation hingegen befindet sich genau an der Spaltstelle von ADAM10 und ADAM17. Durch den Austausch der Aminosäure wird die Variante durch die beiden Proteasen vermehrt von der Zelloberfläche gesheddet (Schlepckow et al., 2017; Thornton et al., 2017). Die Ergebnisse in dieser Arbeit weisen darauf hin, dass auch durch die Gegenwart von Meprin β das Shedding der H157Y-Variante gesteigert ist, obwohl die Mutation nicht direkt die von Meprin β präferierte Spaltstelle beeinflusst. Daher ist es wahrscheinlich, dass das *full-length* TREM2 durch die Mutation zugänglicher für Shedding durch Meprin β wird, in dem die Mutation zum Beispiel die Lokalisation oder die Proteinstabilität beeinflusst.

4.3 Beeinflusst Meprin β durch das TREM2-Cleavage die Pathogenese anderer immunologischer Erkrankungen?

Meprin β und TREM2 spielen nicht nur im ZNS eine Rolle. So ist für Meprin β eine Expression auf peripheren monozytären Zellen nachgewiesen (Sun et al., 2009). Dabei hat Meprin β einen wichtigen Einfluss auf die Migration der Zellen und auf die Produktion von proinflammatorischen Stimuli (Crisman et al., 2004; Li et al., 2014).

Ebenso wird TREM2 auf myeloiden Zellen des peripheren angeborenen Immunsystems exprimiert. Dazu zählen unter anderem dendritische Zellen sowie alveoläre, peritoneale und intestinale Makrophagen (Turnbull et al., 2006; Seno et al., 2009; Wu et al., 2015). Gleichmaßen wie im ZNS ist TREM2 auch im peripheren Immunsystem wichtig für das Überleben und die Proliferation der Makrophagen (Otero et al., 2012; Wu et al., 2015). Hier ist TREM2 vor allem mit der Differenzierung von Makrophagen zum M2 Phänotyp assoziiert (Turnbull et al., 2006). Der antiinflammatorische M2 Phänotyp vermindert die entzündliche Antwort und fördert die Gewebsregeneration (Gordon et al., 2010; Sica et al., 2012). Neben membrangebundenem TREM2 ist besonders auch sTREM2 in der Lage, die Apoptose von M2 Makrophagen zu verhindern (Wu et al., 2015). Die Autoren sehen darin einen Mechanismus, wie eine akute Infektion der Atemwege in eine chronische Entzündung übergehen kann. In

einer nachfolgenden Studie konnten die Autoren darlegen, dass neben viralen Infektionen auch eine Exposition mit Zigarettenrauch zu einer Aktivierung von M2 Makrophagen führen kann. Die Aktivierung ist dabei gekennzeichnet durch die Expression von TREM2 und spielt eine Rolle in der Pathogenese der schweren COPD (Byers et al., 2018). In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Menge an sTREM2 im Überstand von Makrophagen (BMDMs), welche aus Meprin β überexprimierenden Mäusen gewonnen wurden, im Vergleich zu der Menge an sTREM2 aus dem Überstand wildtypischer Makrophagen tendenziell vermindert ist. Diese Reduktion lässt sich damit erklären, dass durch die Überexpression im Verhältnis mehr Meprin β als ADAM10 und ADAM17 vorhanden ist. Infolgedessen wird ein großer Teil des TREM2 durch Meprin β gespalten. Dieses durch Meprin β generierte sTREM2 wird dann von anderen, auf der Oberfläche der BMDMs oder im Überstand befindlichen Proteasen weiter degradiert und ist dadurch im ELISA nicht mehr detektierbar. Der Befund entspricht damit den vorher in der Zellkultur gewonnenen Erkenntnissen bezüglich einer weiteren Degradation des sTREM2. Dies ist eine Besonderheit im Vergleich zu dem Shedding des TREM2 durch die ADAM-Proteasen. Die Degradation führt zu weniger sTREM2, welches dadurch das Überleben der M2 Makrophagen nicht weiter fördern kann. Welche Konsequenzen und möglichen Therapieansätze daraus resultieren, sollte in weiterführenden Studien näher untersucht werden. Die detektierte Menge an membrangebundenem *full-length* TREM2 in den wildtypischen und den Meprin β überexprimierenden BMDMs war in etwa vergleichbar. Jedoch ließ sich dies aufgrund der Qualität des *Western Blots* und der insgesamt niedrigen Menge an TREM2 in den Makrophagen nicht eindeutig bestimmen. Für eine weiterführende Untersuchung wäre zum Beispiel eine Analyse mittels quantitativer Echtzeit-PCR sinnvoll.

TREM2 ist im Darm ein wichtiger Regulator inflammatorischer Zytokine, welche die Effizienz der Regeneration der Mukosa beeinflussen (Seno et al., 2009). Ebenso wie in den Alveolen fördert TREM2 auch in diesem Rahmen die Differenzierung der im Wundbett befindlichen Makrophagen zum M2 Phänotyp. Auch Meprin β ist mit der Entstehung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen, sowie dem Verlauf akuter Kolitiden assoziiert (Müller et al., 2011; Vazeille et al., 2011). Dabei ist Meprin β ein protektiver Faktor. Durch seine Funktion als Sheddase von TREM2 könnte die Rolle von Meprin β in diesem Kontext jedoch komplexer sein als bisher angenommen.

Zusammengefasst konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Meprin β als ein Regulator des verfügbaren TREM2 auf der Zelloberfläche und des löslichen TREM2 fungiert. Dies könnte einen Einfluss auf verschiedene Pathologien haben, in welchen TREM2 eine Rolle spielt. Die dargestellte Interaktion zwischen TREM2 und Meprin β stellt einen möglichen Angriffspunkt für medizinische Interventionen dar, um die angeborene Immunantwort im Kontext des Morbus

Alzheimer und anderer neurodegenerativen Erkrankungen ebenso wie peripherer Pathologien zu modulieren.

5 Zusammenfassung

TREM2 ist ein Oberflächenrezeptor, welcher auf Monozyten und Makrophagen exprimiert wird. Mikroglia sind die Gewebsmakrophagen des Zentralnervensystems, für welche eine besonders hohe Expression von TREM2 nachgewiesen ist. Mikroglia sind unter anderem dafür verantwortlich, neurotoxische A β -Peptide und A β -Plaques zu phagozytieren. Diese Aufgabe erfüllen sie vor allem mit Hilfe des TREM2. So wurde der Rezeptor im Kontext neurodegenerativer Erkrankungen bekannt, von welchen Morbus Alzheimer die prominenteste ist. Auch in der Peripherie konnte ein Einfluss von TREM2 auf verschiedene Erkrankungen, unter anderem COPD und intestinale Pathologien nachgewiesen werden. Dabei spielt nicht nur das membrangebundene *full-length* TREM2 eine Rolle, sondern ebenso die lösliche Ektodomäne des TREM2 (sTREM2), welche das Überleben der Makrophagen fördert. sTREM2 kann durch proteolytische Spaltung des *full-length* Rezeptors von der Zelloberfläche generiert werden. Bisher wurden ADAM10 und ADAM17 als Sheddasen des TREM2 identifiziert. In dieser Arbeit konnte mit Hilfe der rekombinanten Ektodomänen von Meprin β (sMeprin β) und TREM2 (sTREM2) gezeigt werden, dass neben ADAM10 und ADAM17 auch Meprin β in der Lage ist, TREM2 proteolytisch zu spalten. Anschließend wurde diese Interaktion mit Hilfe eines HEK293T ADAM10/17^{-/-} Zellsystems näher charakterisiert. Dabei wurde gezeigt, dass im Vergleich mit membrangebundenem Meprin β vor allem das lösliche Meprin β in der Lage ist, TREM2 von der Zelloberfläche zu schneiden. Außerdem konnte eine weitere Degradation des durch Meprin β generierten sTREM2 nachgewiesen werden. Dies ist eine Besonderheit im Vergleich zur TREM2 Spaltung durch ADAM10 und ADAM17. Das Shedding durch Meprin β führt zu einem vollständigem Funktionsverlust sowohl des *full-length* TREM2 als auch des sTREM2. Für die Morbus Alzheimer-assoziierte H157Y Variante konnte analog zur ADAM10- und ADAM17-abhängigen Spaltung ein vermehrtes Shedding durch Meprin β nachgewiesen werden. Zudem wurde die von Meprin β präferierte TREM2 Spaltstelle mittels Massenspektrometrie identifiziert. Die Hauptspaltstelle liegt zwischen Arginin 136 und Asparaginsäure 137. Diese passt perfekt zu der Präferenz von Meprin β für negativ geladene Aminosäuren an der P1' Position. Um einen Eindruck davon zu erhalten, ob die gefundene Interaktion auch *in vivo* relevant ist, wurde der Überstand von Makrophagen aus dem Knochenmark von wildtypischen und Meprin β überexprimierenden Mäusen auf sTREM2 untersucht. Hier wurde eine Tendenz zur Reduktion des sTREM2 in dem Überstand von Meprin β überexprimierenden Makrophagen gesehen. Auch dieser Befund legt eine weitere Degradation des Rezeptors nahe. Schließlich gelang mit Hilfe von Inhibitionsversuchen der Nachweis, dass es neben ADAM10, ADAM17 und Meprin β noch weitere Proteasen geben muss, welche das Shedding des TREM2 beeinflussen. Somit konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Prozessierung des TREM2 um einiges komplexer ist als bisher angenommen. Dies hat auch eine Bedeutung für die verschiedenen Pathologien in welche

TREM2 involviert ist und sollte bei weiteren Studien und möglichen Therapieansätzen mitbedacht werden.

6 Literaturverzeichnis

- Alzheimer's association. (2012). 2012 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2012.02.001>
- Alzheimer, A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg Zeitschr f Psychiatrie u Psych-Gerichtl Med*. <https://doi.org/10.1002/ca.980080612>
- Andrew, R. J., Kellett, K. A. B., Thinakaran, G., & Hooper, N. M. (2016). A Greek tragedy: The growing complexity of Alzheimer amyloid precursor protein proteolysis. In *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.R116.746032>
- Arnold, P., Boll, I., Rothaug, M., Schumacher, N., Schmidt, F., Wichert, R., Schneppenheim, J., Lokau, J., Pickhinke, U., Koudelka, T., Tholey, A., Rabe, B., Scheller, J., Lucius, R., Garbers, C., Rose-John, S., & Becker-Pauly, C. (2017). Meprin metalloproteases generate biologically active soluble interleukin-6 receptor to induce trans-signaling. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep44053>
- Atagi, Y., Liu, C.-C., Painter, M. M., Chen, X.-F., Verbeeck, C., Zheng, H., Li, X., Rademakers, R., Kang, S. S., Xu, H., Yoonkin, S., Das, P., Fryer, J. D., & Bu, G. (2015). Apolipoprotein E Is a Ligand for Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2 (TREM2). *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.679043>
- Bailey, C. C., Devaux, L. B., & Farzan, M. (2015). The triggering receptor expressed on myeloid cells 2 binds apolipoprotein E. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.677286>
- Banerjee, S., & Bond, J. S. (2008). Prointerleukin-18 is activated by meprin ?? in vitro and in vivo in intestinal inflammation. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802814200>
- Banerjee, S., Jin, G., Bradley, S. G., Matters, G. L., Gailey, R. D., Crisman, J. M., & Bond, J. S. (2011). Balance of meprin A and B in mice affects the progression of experimental inflammatory bowel disease. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00504.2009>
- Becker-Pauly, C., Barré, O., Schilling, O., auf dem Keller, U., Ohler, A., Broder, C., Schütte, A., Kappelhoff, R., Stöcker, W., & Overall, C. M. (2011). Proteomic Analyses Reveal an Acidic Prime Side Specificity for the Astacin Metalloprotease Family Reflected by Physiological Substrates. *Molecular & Cellular Proteomics*. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.009233>
- Bedau, T., Peters, F., Prox, J., Arnold, P., Schmidt, F., Finkernagel, M., Köllmann, S., Wichert, R., Otte, A., Ohler, A., Stirnberg, M., Lucius, R., Koudelka, T., Tholey, A., Biasin, V., Pietrzik, C. U., Kwapiszewska, G., & Becker-Pauly, C. (2017). Ectodomain shedding of CD99 within highly conserved regions is mediated by the metalloprotease meprin β and

- promotes transendothelial cell migration. *FASEB Journal*.
<https://doi.org/10.1096/fj.201601113R>
- Berner, D.K. (2021): Die Metalloprotease Meprin beta ist eine Sheddase des triggering receptor expresses on myeloid cells type 2 (TREM2). Med. Diss., Kiel
- Berner, D. K., Wessolowski, L., Armbrust, F., Schneppenheim, J., Schlepckow, K., Koudelka, T., Scharfenberg, F., Lucius, R., Tholey, A., Kleinberger, G., Haass, C., Arnold, P., & Becker-Pauly, C. (2020). Meprin β cleaves TREM2 and controls its phagocytic activity on macrophages. *FASEB Journal*, 34(5), 6675–6687. <https://doi.org/10.1096/fj.201902183R>
- Bertenshaw, G. P., Norcum, M. T., & Bond, J. S. (2003). Structure of homo- and hetero-oligomeric meprin metalloproteases: Dimers, tetramers, and high molecular mass multimers. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208808200>
- Bibl, M., Gallus, M., Welge, V., Lehmann, S., Sparbier, K., Esselmann, H., & Wiltfang, J. (2012). Characterization of cerebrospinal fluid aminoterminaly truncated and oxidized amyloid- β peptides. *Proteomics - Clinical Applications*.
<https://doi.org/10.1002/prca.201100082>
- Bien, J., Jefferson, T., Čaušević, M., Jumpertz, T., Munter, L., Multhaup, G., Weggen, S., Becker-Pauly, C., & Pietrzik, C. U. (2012). The metalloprotease meprin β generates amino terminal-truncated amyloid β peptide species. *Journal of Biological Chemistry*.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.395608>
- Bouchon, A., Hernández-Munain, C., Cella, M., & Colonna, M. (2001). A DAP12-mediated pathway regulates expression of CC chemokine receptor 7 and maturation of human dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*.
<https://doi.org/10.1084/jem.194.8.1111>
- Broder, C., Arnold, P., Vadon-Le Goff, S., Kondering, M. A., Bahr, K., Muller, S., Overall, C. M., Bond, J. S., Koudelka, T., Tholey, A., Hulmes, D. J. S., Moali, C., & Becker-Pauly, C. (2013). Metalloproteases meprin α and meprin β are C- and N-procollagen proteinases important for collagen assembly and tensile strength. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305464110>
- Broder, C., & Becker-Pauly, C. (2013). The metalloproteases meprin α and meprin β : unique enzymes in inflammation, neurodegeneration, cancer and fibrosis. *Biochemical Journal*.
<https://doi.org/10.1042/BJ20121751>
- Brookmeyer, R., Johnson, E., Ziegler-Graham, K., & Arrighi, H. M. (2007). Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia*.
<https://doi.org/10.1016/j.jalz.2007.04.381>
- Bülck, C., Nyström, E. E. L., Koudelka, T., Mannbar-Frahm, M., Andresen, G., Radhouani, M., Tran, F., Scharfenberg, F., Schrell, F., Armbrust, F., Dahlke, E., Zhao, B., Vervaeke, A., Theilig, F., Rosenstiel, P., Starkl, P., Rosshart, S. P., Fickenscher, H., Tholey, A.,

- Hansson, G. C., & Becker-Pauly, C. (2023). Proteolytic processing of galectin-3 by meprin metalloproteases is crucial for host-microbiome homeostasis. *Science Advances*, 9(13), eadf4055. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adf4055>
- Butovsky, O., Jedrychowski, M. P., Moore, C. S., Cialic, R., Lanser, A. J., Gabriely, G., Koeglsperger, T., Dake, B., Wu, P. M., Doykan, C. E., Fanek, Z., Liu, L., Chen, Z., Rothstein, J. D., Ransohoff, R. M., Gygi, S. P., Antel, J. P., & Weiner, H. L. (2013). Identification of a unique TGF- β -dependent molecular and functional signature in microglia. *Nature Neuroscience*, 17(1), 131–143. <https://doi.org/10.1038/nn.3599>
- Byers, D. E., Wu, K., Dang-Vu, G., Jin, X., Agapov, E., Zhang, X., Battaile, J. T., Schechtman, K., Yusen, R., Pierce, R. A., & Holtzman, M. J. (2018). Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-2 Expression Tracks With M2-Like Macrophage Activity and Disease Severity in COPD. *Chest*. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2017.09.044>
- Citron, M., Oltersdorf, T., Haass, C., McConlogue, L., Hung, A. Y., Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Lieberburg, I., & Selkoe, D. J. (1992). Mutation of the β -amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases β -protein production. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/360672a0>
- Colonna, M., & Wang, Y. (2016). TREM2 variants: New keys to decipher Alzheimer disease pathogenesis. *Nature Reviews Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.7>
- Crisman, J. M., Zhang, B., Norman, L. P., & Bond, J. S. (2004a). Deletion of the mouse meprin beta metalloprotease gene diminishes the ability of leukocytes to disseminate through extracellular matrix. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.7.4510>
- Crisman, J. M., Zhang, B., Norman, L. P., & Bond, J. S. (2004b). Deletion of the Mouse Meprin β Metalloprotease Gene Diminishes the Ability of Leukocytes to Disseminate through Extracellular Matrix. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.7.4510>
- Franke, M., Schröder, J., Monhasery, N., Ackfeld, T., Hummel, T. M., Rabe, B., Garbers, C., Becker-Pauly, C., Floss, D. M., & Scheller, J. (2016). Human and murine interleukin 23 receptors are novel substrates for a disintegrin and metalloproteases ADAM10 and ADAM17. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.710541>
- Goate, A., Chartier-Harlin, M. C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., & James, L. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/349704a0>
- Gordon, S., & Martinez, F. O. (2010). Alternative activation of macrophages: Mechanism and functions. In *Immunity*. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.05.007>
- Guerreiro, R., Wojtas, A., Bras, J., Carrasquillo, M., Rogaeva, E., Majounie, E., Cruchaga, C.,

- Sassi, C., Kauwe, J. S. K., Younkin, S., Hazrati, L., Collinge, J., Pocock, J., Lashley, T., Williams, J., Lambert, J.-C., Amouyel, P., Goate, A., Rademakers, R., Morgan, K., Powell, J., St. George-Hyslop, P., Singleton, A., & Hardy, J. (2013). *TREM2 Variants in Alzheimer's Disease. New England Journal of Medicine.* <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1211851>
- Guerreiro, R., Wojtas, A., Bras, J., Carrasquillo, M., Rogaeva, E., Majounie, E., Cruchaga, C., Sassi, C., Kauwe, J. S. K., Younkin, S., Hazrati, L., Collinge, J., Pocock, J., Lashley, T., Williams, J., Lambert, J.-C., Amouyel, P., Goate, A., Rademakers, R., Morgan, K., Powell, J., St George-Hyslop, P., Singleton, A., Hardy, J., & Alzheimer Genetic Analysis Group. (2013). *TREM2 variants in Alzheimer's disease. The New England Journal of Medicine.* <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1211851>
- Hahn, D., Pischitzis, A., Roesmann, S., Hansen, M. K., Leuenberger, B., Luginbuehl, U., & Sterchi, E. E. (2003). Phorbol 12-Myristate 13-Acetate-induced Ectodomain Shedding and Phosphorylation of the Human Meprin β Metalloprotease. *Journal of Biological Chemistry.* <https://doi.org/10.1074/jbc.M211169200>
- Heppner, F. L., Ransohoff, R. M., & Becher, B. (2015). Immune attack: The role of inflammation in Alzheimer disease. In *Nature Reviews Neuroscience.* <https://doi.org/10.1038/nrn3880>
- Herzog, C., Kaushal, G. P., & Haun, R. S. (2005). Generation of biologically active interleukin-1 β by meprin B. *Cytokine.* <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2005.06.012>
- Hsieh, C. L., Koike, M., Spusta, S. C., Niemi, E. C., Yenari, M., Nakamura, M. C., & Seaman, W. E. (2009). A role for TREM2 ligands in the phagocytosis of apoptotic neuronal cells by microglia. *Journal of Neurochemistry.* <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06042.x>
- Humphrey, M. B., Daws, M. R., Spusta, S. C., Niemi, E. C., Torchia, J. A., Lanier, L. L., Seaman, W. E., & Nakamura, M. C. (2006). TREM2, a DAP12-associated receptor, regulates osteoclast differentiation and function. *Journal of Bone and Mineral Research.* <https://doi.org/10.1359/JBMR.051016>
- Jay, T. R., Hirsch, A. M., Broihier, M. L., Miller, C. M., Neilson, L. E., Ransohoff, R. M., Lamb, B. T., & Landreth, G. E. (2017). Disease Progression-Dependent Effects of TREM2 Deficiency in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *The Journal of Neuroscience.* <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2110-16.2017>
- Jay, T. R., Miller, C. M., Cheng, P. J., Graham, L. C., Bemiller, S., Broihier, M. L., Xu, G., Margevicius, D., Karlo, J. C., Sousa, G. L., Coteleur, A. C., Butovsky, O., Bekris, L., Staugaitis, S. M., Leverenz, J. B., Pimplikar, S. W., Landreth, G. E., Howell, G. R., Ransohoff, R. M., & Lamb, B. T. (2015). TREM2 deficiency eliminates TREM2⁺ inflammatory macrophages and ameliorates pathology in Alzheimer's disease mouse models. *The Journal of Experimental Medicine.* <https://doi.org/10.1084/jem.20142322>
- Jefferson, T., Auf Dem Keller, U., Bellac, C., Metz, V. V., Broder, C., Hedrich, J., Ohler, A.,

- Maier, W., Magdolen, V., Sterchi, E., Bond, J. S., Jayakumar, A., Traupe, H., Chalaris, A., Rose-John, S., Pietrzik, C. U., Postina, R., Overall, C. M., & Becker-Pauly, C. (2013). The substrate degradome of meprin metalloproteases reveals an unexpected proteolytic link between meprin β and ADAM10. *Cellular and Molecular Life Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1106-2>
- Jonsson, T., Stefansson, H., Steinberg, S., Jonsdottir, I., Jonsson, P. V., Snaedal, J., Bjornsson, S., Huttenlocher, J., Levey, A. I., Lah, J. J., Rujescu, D., Hampel, H., Giegling, I., Andreassen, O. A., Engedal, K., Ulstein, I., Djurovic, S., Ibrahim-Verbaas, C., Hofman, A., Ikram, M. A., van Duijn, C. M., Thorsteinsdottir, U., Kong, A., & Stefansson, K. (2013). Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1211103>
- Keren-Shaul, H., Spinrad, A., Weiner, A., Matcovitch-Natan, O., Dvir-Szternfeld, R., Ulland, T. K., David, E., Baruch, K., Lara-Astaiso, D., Toth, B., Itzkovitz, S., Colonna, M., Schwartz, M., & Amit, I. (2017). A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.018>
- Kleinberger, G., Yamanishi, Y., Suárez-Calvet, M., Czirr, E., Lohmann, E., Cuyvers, E., Struyfs, H., Pettkus, N., Wenninger-Weinzierl, A., Mazaheri, F., Tahirovic, S., Lleó, A., Alcolea, D., Fortea, J., Willem, M., Lammich, S., Molinuevo, J. L., Sánchez-Valle, R., Antonell, A., Ramirez, A., Heneka, M. T., Sleegers, K., Van Der Zee, J., Martin, J. J., Engelborghs, S., Demirtas-Tatlıdede, A., Zetterberg, H., Van Broeckhoven, C., Gurvit, H., Wyss-Coray, T., Hardy, J., Colonna, M., & Haass, C. (2014). TREM2 mutations implicated in neurodegeneration impair cell surface transport and phagocytosis. *Science Translational Medicine*. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009093>
- Kober, D. L., & Brett, T. J. (2017). TREM2-Ligand Interactions in Health and Disease. In *Journal of Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.04.004>
- Kronenberg, D., Bruns, B. C., Moali, C., Vadon-Le Goff, S., Sterchi, E. E., Traupe, H., Böhm, M., Hulmes, D. J. S., Stöcker, W., & Becker-Pauly, C. (2010). Processing of procollagen III by meprins: New players in extracellular matrix assembly. *Journal of Investigative Dermatology*. <https://doi.org/10.1038/jid.2010.202>
- Lee, C. Y. D., Daggett, A., Gu, X., Jiang, L. L., Langfelder, P., Li, X., Wang, N., Zhao, Y., Park, C. S., Cooper, Y., Ferando, I., Mody, I., Coppola, G., Xu, H., & Yang, X. W. (2018). Elevated TREM2 Gene Dosage Reprograms Microglia Responsivity and Ameliorates Pathological Phenotypes in Alzheimer's Disease Models. *Neuron*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.02.002>
- Li, Y. J., Fan, Y. H., Tang, J., Li, J. B., & Yu, C. H. (2014). Meprin- β regulates production of pro-inflammatory factors via a disintegrin and metalloproteinase-10 (ADAM-10) dependent pathway in macrophages. *International Immunopharmacology*.

- <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2013.11.004>
- Lichtenthaler, S. F., Lemberg, M. K., & Fluhrer, R. (2018). Proteolytic ectodomain shedding of membrane proteins in mammals—hardware, concepts, and recent developments. *The EMBO Journal*. <https://doi.org/10.15252/embj.201899456>
- Mazaheri, F., Snaidero, N., Kleinberger, G., Madore, C., Daria, A., Werner, G., Krasemann, S., Capell, A., Trümbach, D., Wurst, W., Brunner, B., Bultmann, S., Tahirovic, S., Kerschensteiner, M., Misgeld, T., Butovsky, O., & Haass, C. (2017). TREM 2 deficiency impairs chemotaxis and microglial responses to neuronal injury . *EMBO Reports*. <https://doi.org/10.15252/embr.201743922>
- Müller, S., Vazeille, E., Bayha, E., Johansson, M. E., Schaffer, T., Mendes, C., Sterchi, E. E., Hansson, G. C., Seibold, F., Darfeuille-Michaud, A., & Lottaz, D. (2011). Deficiency for the Metalloproteinase Meprin 1-Beta Enhances Severity of, and Delays Recovery From Acute DSS Colitis. *Gastroenterology*. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(11\)62058-1](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(11)62058-1)
- N'Diaye, E. N., Branda, C. S., Branda, S. S., Nevarez, L., Colonna, M., Lowell, C., Hamerman, J. A., & Seaman, W. E. (2009). TREM-2 (triggering receptor expressed on myeloid cells 2) is a phagocytic receptor for bacteria. *Journal of Cell Biology*. <https://doi.org/10.1083/jcb.200808080>
- Newcombe, E. A., Camats-Perna, J., Silva, M. L., Valmas, N., Huat, T. J., & Medeiros, R. (2018). Inflammation: the link between comorbidities, genetics, and Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation*. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1313-3>
- Norman, L. P., Jiang, W., Han, X., Saunders, T. L., & Bond, J. S. (2003). Targeted Disruption of the Meprin Gene in Mice Leads to Underrepresentation of Knockout Mice and Changes in Renal Gene Expression Profiles. *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/mcb.23.4.1221-1230.2003>
- Otero, K., Shinohara, M., Zhao, H., Cella, M., Gilfillan, S., Colucci, A., Faccio, R., Ross, F. P., Teitelbaum, S. L., Takayanagi, H., & Colonna, M. (2012). TREM2 and β -Catenin Regulate Bone Homeostasis by Controlling the Rate of Osteoclastogenesis. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102836>
- Otero, K., Turnbull, I. R., Poliani, P. L., Vermi, W., Cerutti, E., Aoshi, T., Tassi, I., Takai, T., Stanley, S. L., Miller, M., Shaw, A. S., & Colonna, M. (2009). Macrophage colony-stimulating factor induces the proliferation and survival of macrophages via a pathway involving DAP12 and β -catenin. *Nature Immunology*. <https://doi.org/10.1038/ni.1744>
- Park, J. S., Ji, I. J., Kim, D. H., An, H. J., & Yoon, S. Y. (2017). The Alzheimer's disease-associated R47H variant of TREM2 has an altered glycosylation pattern and protein stability. *Frontiers in Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00618>
- Riethmueller, S., Ehlers, J. C., Lokau, J., Düsterhöft, S., Knittler, K., Dombrowsky, G., Grötzinger, J., Rabe, B., Rose-John, S., & Garbers, C. (2016). Cleavage Site Localization

- Differentially Controls Interleukin-6 Receptor Proteolysis by ADAM10 and ADAM17. *Scientific Reports*, 6(May), 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep25550>
- Schlepckow, K., Kleinberger, G., Fukumori, A., Feederle, R., Lichtenthaler, S. F., Steiner, H., & Haass, C. (2017). An Alzheimer-associated TREM2 variant occurs at the ADAM cleavage site and affects shedding and phagocytic function. *EMBO Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.15252/emmm.201707672>
- Schönherr, C., Bien, J., Isbert, S., Wichert, R., Prox, J., Altmeyen, H., Kumar, S., Walter, J., Lichtenthaler, S. F., Weggen, S., Glatzel, M., Becker-Pauly, C., & Pietrzik, C. U. (2016). Generation of aggregation prone N-terminally truncated amyloid β peptides by meprin β depends on the sequence specificity at the cleavage site. *Molecular Neurodegeneration*. <https://doi.org/10.1186/s13024-016-0084-5>
- Schütte, A., Ermund, A., Becker-Pauly, C., Johansson, M. E. V., Rodriguez-Pineiro, A. M., Bäckhed, F., Müller, S., Lottaz, D., Bond, J. S., & Hansson, G. C. (2014). Microbial-induced meprin β cleavage in MUC2 mucin and a functional CFTR channel are required to release anchored small intestinal mucus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(34), 12396–12401. <https://doi.org/10.1073/pnas.1407597111>
- Seno, H., Miyoshi, H., Brown, S. L., Geske, M. J., Colonna, M., & Stappenbeck, T. S. (2009). Efficient colonic mucosal wound repair requires Trem2 signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803343106>
- Sica, A., & Mantovani, A. (2012). Macrophage plasticity and polarization: In vivo veritas. In *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI59643>
- Sirkis, D. W., Aparicio, R. E., & Schekman, R. (2017). Neurodegeneration-associated mutant TREM2 proteins abortively cycle between the ER and ER-Golgi intermediate compartment. *Molecular Biology of the Cell*. <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-06-0423>
- Song, W., Hooli, B., Mullin, K., Jin, S. C., Cella, M., Ulland, T. K., Wang, Y., Tanzi, R. E., & Colonna, M. (2017). Alzheimer's disease-associated TREM2 variants exhibit either decreased or increased ligand-dependent activation. *Alzheimer's and Dementia*. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.07.004>
- Song, W. M., Joshita, S., Zhou, Y., Ulland, T. K., Gilfillan, S., & Colonna, M. (2018). Humanized TREM2 mice reveal microglia-intrinsic and -extrinsic effects of R47H polymorphism. *The Journal of Experimental Medicine*, jem.20171529. <https://doi.org/10.1084/jem.20171529>
- Stöcker, W., & Zwilling, R. (1995). Astacin. *Methods in Enzymology*. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(95\)48021-8](https://doi.org/10.1016/0076-6879(95)48021-8)
- Strittmatter, W. J., Saunders, A. M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G. S., & Roses, A. D. (1993). Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and

- increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.5.1977>
- Suárez-Calvet, M., Kleinberger, G., Araque Caballero, M. Á., Brendel, M., Rominger, A., Alcolea, D., Fortea, J., Lleó, A., Blesa, R., Gispert, J. D., Sánchez-Valle, R., Antonell, A., Rami, L., Molinuevo, J. L., Brosseron, F., Trschütz, A., Heneka, M. T., Struyfs, H., Engelborghs, S., Sleegers, K., Van Broeckhoven, C., Zetterberg, H., Nellgård, B., Blennow, K., Crispin, A., Ewers, M., & Haass, C. (2016). sTREM2 cerebrospinal fluid levels are a potential biomarker for microglia activity in early-stage Alzheimer's disease and associate with neuronal injury markers. *EMBO Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.15252/emmm.201506123>
- Sun, Q., Jin, H. J., & Bond, J. S. (2009). Disruption of the meprin α and β genes in mice alters homeostasis of monocytes and natural killer cells. *Experimental Hematology*. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2008.10.016>
- Takahashi, K., Rochford, C. D. P., & Neumann, H. (2005). Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2. *The Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20041611>
- Tarentino, A. L., Gomez, C. M., & Plummer, T. H. (1985). Deglycosylation of Asparagine-Linked Glycans by Peptide: N-Glycosidase F. *Biochemistry*. <https://doi.org/10.1021/bi00338a028>
- Thornton, P., Sevalle, J., Deery, M. J., Fraser, G., Zhou, Y., Ståhl, S., Franssen, E. H., Dodd, R. B., Qamar, S., Gomez Perez-Nievas, B., Nicol, L. S., Eketjäll, S., Revell, J., Jones, C., Billinton, A., St George-Hyslop, P. H., Chessell, I., & Crowther, D. C. (2017). TREM2 shedding by cleavage at the H157-S158 bond is accelerated for the Alzheimer's disease-associated H157Y variant. *EMBO Molecular Medicine*, 9(10), 1366–1378. <https://doi.org/10.15252/emmm.201707673>
- Turnbull, I. R., Gilfillan, S., Cella, M., Aoshi, T., Miller, M., Piccio, L., Hernandez, M., & Colonna, M. (2006). Cutting Edge: TREM-2 Attenuates Macrophage Activation. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.6.3520>
- Ulland, T. K., Song, W. M., Huang, S. C. C., Ulrich, J. D., Sergushichev, A., Beatty, W. L., Loboda, A. A., Zhou, Y., Cairns, N. J., Kambal, A., Loginicheva, E., Gilfillan, S., Cella, M., Virgin, H. W., Unanue, E. R., Wang, Y., Artyomov, M. N., Holtzman, D. M., & Colonna, M. (2017). TREM2 Maintains Microglial Metabolic Fitness in Alzheimer's Disease. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.023>
- Vazeille, E., Bringer, M. A., Gardarin, A., Chambon, C., Becker-Pauly, C., Pender, S. L. F., Jakob, C., Müller, S., Lottaz, D., & Darfeuille-Michaud, A. (2011). Role of meprins to protect ileal Mucosa of Crohn's disease patients from colonization by adherent-invasive e. coli. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021199>

- Wang, Y., Cella, M., Mallinson, K., Ulrich, J. D., Young, K. L., Robinette, M. L., Gilfillan, S., Krishnan, G. M., Sudhakar, S., Zinselmeyer, B. H., Holtzman, D. M., Cirrito, J. R., & Colonna, M. (2015). TREM2 lipid sensing sustains the microglial response in an Alzheimer's disease model. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.049>
- Wang, Y., Ulland, T. K., Ulrich, J. D., Song, W., Tzaferis, J. A., Hole, J. T., Yuan, P., Mahan, T. E., Shi, Y., Gilfillan, S., Cella, M., Grutzendler, J., DeMattos, R. B., Cirrito, J. R., Holtzman, D. M., & Colonna, M. (2016). TREM2-mediated early microglial response limits diffusion and toxicity of amyloid plaques. *The Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20151948>
- Wichert, R., Ermund, A., Schmidt, S., Schweinlin, M., Ksiazek, M., Arnold, P., Knittler, K., Wilkens, F., Potempa, B., Rabe, B., Stirnberg, M., Lucius, R., Bartsch, J. W., Nikolaus, S., Falk-Paulsen, M., Rosenstiel, P., Metzger, M., Rose-John, S., Potempa, J., Hansson, G. C., Dempsey, P. J., & Becker-Pauly, C. (2017). Mucus Detachment by Host Metalloprotease Meprin β Requires Shedding of Its Inactive Pro-form, which Is Abrogated by the Pathogenic Protease RgpB. *Cell Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.087>
- Wiltfang, J., Esselmann, H., Cupers, P., Neumann, M., Kretzschmar, H., Beyermann, M., Schleuder, D., Jahn, H., R  ther, E., Kornhuber, J., Annaert, W., De Strooper, B., & Saftig, P. (2001). Elevation of β -Amyloid Peptide 2-42 in Sporadic and Familial Alzheimer's Disease and Its Generation in PS1 Knockout Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 276(46), 42645–42657. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102790200>
- Wolfe, M. S., Xia, W., Moore, C. L., Leatherwood, D. D., Ostaszewski, B., Rahmati, T., Donkor, I. O., & Selkoe, D. J. (1999). Peptidomimetic probes and molecular modeling suggest that Alzheimer's γ -secretase is an intramembrane-cleaving aspartyl protease. *Biochemistry*. <https://doi.org/10.1021/bi982562p>
- Wu, K., Byers, D. E., Jin, X., Agapov, E., Alexander-Brett, J., Patel, A. C., Cella, M., Gilfillan, S., Colonna, M., Kober, D. L., Brett, T. J., & Holtzman, M. J. (2015). TREM-2 promotes macrophage survival and lung disease after respiratory viral infection. *Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20141732>
- Wunderlich, P., Glebov, K., Kemmerling, N., Tien, N. T., Neumann, H., & Walter, J. (2013). Sequential proteolytic processing of the triggering receptor expressed on myeloid cells-2 (TREM2) protein by ectodomain shedding and γ -secretase- dependent intramembraneous cleavage. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.517540>
- Xing, J., Titus, A. R., & Humphrey, M. B. (2015). The TREM2-DAP12 signaling pathway in Nasu-Hakola disease: a molecular genetics perspective. *Research and Reports in Biochemistry*. <https://doi.org/10.2147/RRBC.S58057>
- Yeh, F. L., Wang, Y., Tom, I., Gonzalez, L. C., & Sheng, M. (2016). TREM2 Binds to

- Apolipoproteins, Including APOE and CLU/APOJ, and Thereby Facilitates Uptake of Amyloid-Beta by Microglia. *Neuron*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.06.015>
- Zhao, Y., Wu, X., Li, X., Jiang, L. L., Gui, X., Liu, Y., Sun, Y., Zhu, B., Piña-Crespo, J. C., Zhang, M., Zhang, N., Chen, X., Bu, G., An, Z., Huang, T. Y., & Xu, H. (2018). TREM2 Is a Receptor for β -Amyloid that Mediates Microglial Function. *Neuron*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.01.031>
- Zhong, L., Chen, X.-F., Wang, T., Wang, Z., Liao, C., Wang, Z., Huang, R., Wang, D., Li, X., Wu, L., Jia, L., Zheng, H., Painter, M., Atagi, Y., Liu, C.-C., Zhang, Y.-W., Fryer, J. D., Xu, H., & Bu, G. (2017). Soluble TREM2 induces inflammatory responses and enhances microglial survival. *The Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20160844>

7 Anhänge

7.1 Publizierter Fachartikel

Received: 26 August 2019 | Revised: 3 December 2019 | Accepted: 12 March 2020

DOI: 10.1096/fj.201902183R

RESEARCH ARTICLE



Meprin β cleaves TREM2 and controls its phagocytic activity on macrophages

Dennis Kristopher Berner¹ | Luisa Wessolowski¹ | Fred Armbrust¹ | Janna Schneppenheim² | Kai Schlepckow³ | Tomas Koudelka⁴ | Franka Scharfenberg¹ | Ralph Lucius² | Andreas Tholey⁴ | Gernot Kleinberger^{5,6} | Christian Haass^{3,5,6} | Philipp Arnold² | Christoph Becker-Pauly¹

¹Unit for Degradomics of the Protease Web, Biochemical Institute, University of Kiel, Kiel, Germany

²Anatomical Institute, University of Kiel, Kiel, Germany

³German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE), Munich, Germany

⁴Systematic Proteomics & Bioanalytics, Institute for Experimental Medicine, University of Kiel, Kiel, Germany

⁵Biomedical Center, Biochemistry, Ludwig-Maximilians-Universität Munich, Munich, Germany

⁶Munich Cluster for Systems Neurology, Munich, Germany

Correspondence

Christoph Becker-Pauly, Unit for Degradomics of the Protease Web, Biochemical Institute, Christian-Albrechts-University Kiel, Otto-Hahn-Platz 9, 24118 Kiel, Germany.
Email: cbeckerpauly@biochem.uni-kiel.de

Present address

Gernot Kleinberger, ISAR Bioscience GmbH, Semmelweisstrasse 5, D-82152, Planegg, Germany

Funding information

Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), Grant/Award Number: 125440785 SFB877 A9/A15, 125440785 SFB877 Z2, 125440785 SFB877 A13, BE 4086/2-2, EXC 1010 SyNergy, HA1737/16-1 and FOR2290

Abstract

The triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2) is a multifunctional surface protein that affects survival, migration, and phagocytic capacity of myeloid cells. Soluble TREM2 levels were found to be increased in early stages of sporadic and familial Alzheimer's disease (AD) probably reflecting a defensive microglial response to some initial brain damage. The disintegrin and metalloproteases (ADAM) 10 and 17 were identified as TREM2 sheddases. We demonstrate that meprin β is a direct TREM2 cleaving enzyme using ADAM10/17 deficient HEK293 cells. LC-MS/MS analysis of recombinant TREM2 incubated with meprin β revealed predominant cleavage between Arg136 and Asp137, distant to the site identified for ADAM10/17. We further demonstrate that the metalloprotease meprin β cleaves TREM2 on macrophages concomitant with decreased levels of soluble TREM2 in the serum of *Mep1b*^{-/-} mice compared to WT controls. Isolated BMDMs from *Mep1b*^{-/-} mice showed significantly increased full-length TREM2 levels and enhanced phagocytosis efficiency compared to WT cells. The diminished constitutive shedding of TREM2 on meprin β deficient macrophages could be rescued by ADAM stimulation through LPS treatment. Our data provide evidence that meprin β is a TREM2 sheddase on macrophages and suggest that multiple proteases may be involved in the generation of soluble TREM2.

Abbreviations: AD, Alzheimer's disease; ADAM, a disintegrin and metalloprotease; APP, amyloid precursor protein; BMDM, bone marrow derived macrophage; CTF, C-terminal fragment; ICD, intracellular domain; TREM2, triggering receptor expressed on myeloid cells 2.

Dennis Kristopher Berner and Luisa Wessolowski contributed equally to this work.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

© 2020 The Authors. *The FASEB Journal* published by Wiley Periodicals LLC on behalf of Federation of American Societies for Experimental Biology

KEYWORDS

ADAM10, Alzheimer's disease, cell surface protein, meprin β , metalloprotease, phagocytosis, protein-protein interaction, TREM2

1 | INTRODUCTION

Triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2) is a type 1 transmembrane protein that is expressed on myeloid cells such as macrophages, dendritic cells, and microglia.¹ TREM2 is thought to be involved in different signaling pathways, thereby influencing cell differentiation, survival, proliferation, activation, and phagocytic potential.² Several mutations within the stalk region and the Ig-like V type domain of TREM2 were associated with an increased risk to develop Alzheimer's disease (AD).³⁻⁶ If and how TREM2 function affects amyloid plaque metabolism is controversially discussed. It is reported that a loss of TREM2 function affects plaque morphology leading to larger and more diffuse plaques associated with more neurotic pathology and less clustered microglia (summarized in (7)). Along the same line, it was recently demonstrated that in the absence of functional TREM2 early amyloidogenesis is accelerated due to reduced phagocytic clearance of amyloid seeds despite reduced plaque-associated ApoE.⁸ On the contrary, it was shown that TREM2 deficiency eliminates TREM2-positive inflammatory macrophages and ameliorates pathology in AD mouse models.⁹ Although no definite endogenous ligand has been described to date a preference for anionic and lipid-like substances has been observed.¹⁰⁻¹² It was shown that TREM2 can bind LPS¹³ and A β peptides,¹⁴⁻¹⁶ which induces phagocytosis in cells. However, TREM2 cannot transduce the signal by itself, but requires the adaptor protein DNAX-activation protein 12 (DAP12), which can be phosphorylated, and then, stimulates a variety of intracellular pathways.^{13,17} TREM2 is shed from the cell surface by the disintegrin and metalloproteases 10 and 17 (ADAM10 and ADAM17), leaving a C-terminal fragment (CTF) that is prone to proteolysis by the γ -secretase complex¹⁸⁻²¹ (Figure 1A). Cleavage of TREM2 by ADAM10 occurs between His157 and Ser158, which is enhanced by the AD-associated variant H157Y.^{20,21} Shedding of TREM2 from the cell surface may terminate signaling, and therefore, reduce the phagocytic capacity of microglia and macrophages.^{18,20} The resulting soluble TREM2 (sTREM2) was shown to induce ERK and MAPK14 signaling in bone marrow derived macrophages (BMDM)²² and NF κ B signaling in microglia inducing pro-inflammatory cytokine expression and prolonged cell survival.^{13,23} Additionally, sTREM2 increases early in AD and may serve as a surrogate marker for microglial activation.^{18,24}

Meprin β belongs to the astacin family of metalloproteinases and exhibits striking cleavage specificity with a preference for negatively charged amino acids around the scissile bond.²⁵ Similar to ADAM10 and ADAM17, meprin β was found to cleave several cell surface proteins such as the amyloid precursor protein (APP) at the β -secretase site,²⁶ the IL-6 receptor on human granulocytes to induce IL-6 trans-signaling,²⁷ and CD99 on endothelial cells, thereby promoting transendothelial cell migration.^{28,29}

Here, we demonstrate that meprin β sheds membrane bound TREM2 and rapidly degrades the soluble ectodomain. However, the identified major cleavage site for meprin β in TREM2 between Arg136 and Asp137 is N-terminal to the ADAM10 site, thus, generating slightly different CTFs and soluble TREM2 species. Meprin β co-expression with TREM2 significantly decreased the phagocytic potential of macrophages. Physiological relevance of this proteolytic cleavage is supported by strong accumulation of TREM2 on the surface of BMDMs isolated from meprin β knock-out mice and decreased serum levels of sTREM2 in these animals compared to wild-type controls.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Cell culture and transient transfection

Cells were cultured in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium; Gibco), supplemented with 10% (v/v) of FBS, 100 units/mL penicillin, and 100 μ g/mL streptomycin. Culture conditions were under a humidified atmosphere (5% of CO₂) at 37°C. Generation of HEK293_ADAM10/17^{-/-} cells was previously described.³⁰ For transient transfection, cells were seeded in 10 cm cell culture dishes. Plasmid cDNA for hTREM2, meprin β , ADAM10, empty vector (pcDNA3.1), or the TREM2-DAP12 fusion construct²⁰ was mixed with polyethylenimine (1:3) (Sigma-Aldrich) in serum-free medium and incubated at room temperature for 30 minutes. After 24 hours of transfection, medium was changed to serum-free DMEM to avoid inhibition of meprin β through FCS. For CTF analysis, 5 μ M of DAPT were added to the medium at 5 and 20 hours. Cells were harvested 24 hours posttransfection. In the relevant experiments, 50 nM each of recombinant soluble meprin β (smeprin β),³¹ smeprin α ,³² or of sADAM10³³ were added to the serum-free DMEM.

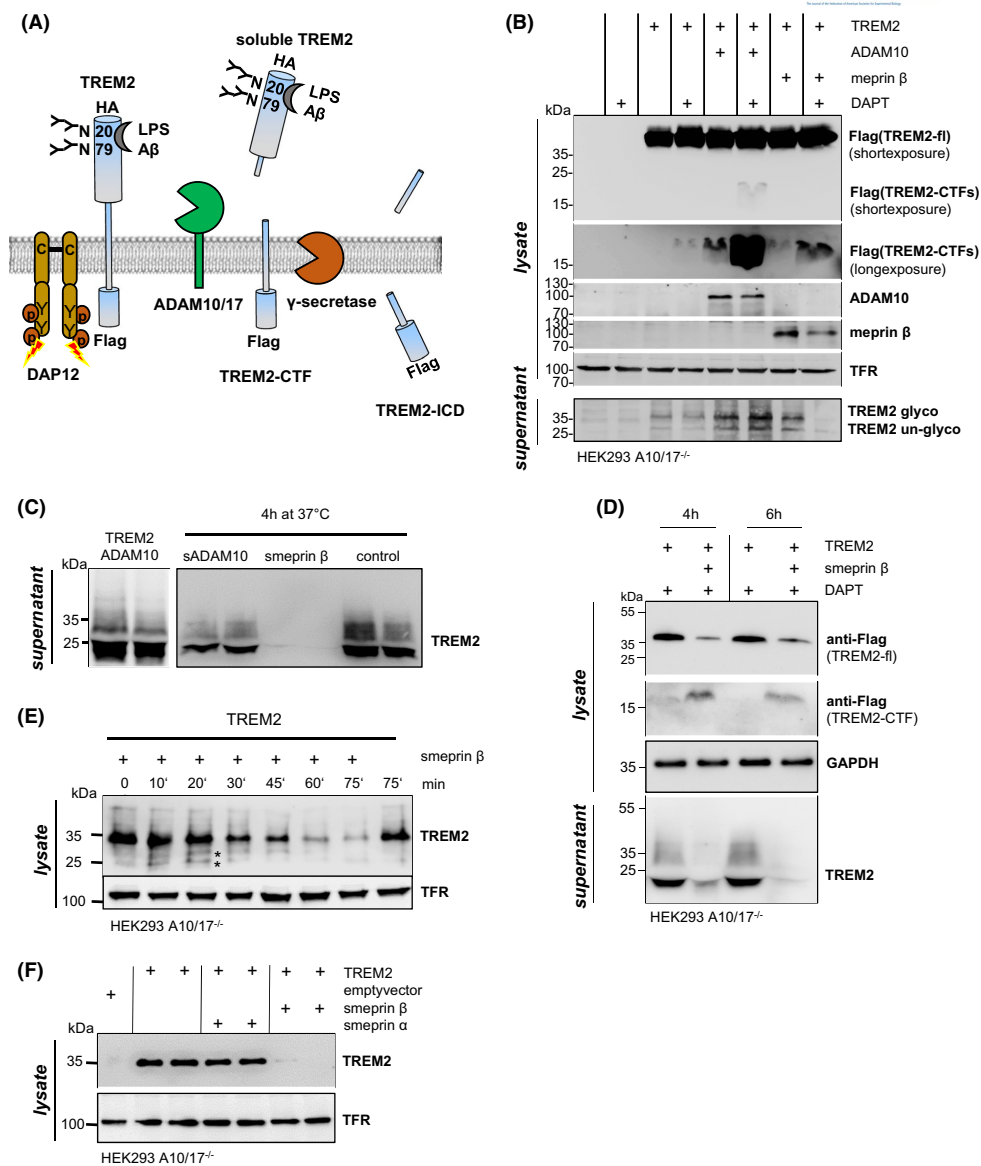


FIGURE 1 TREM2 is shed by meprin β in HEK293_A10/17^{-/-} cells. (A) Illustration of membrane bound TREM2 and DAPI12. Upon shedding by ADAM10, the remaining C-terminal fragment (CTF) of TREM2 is cleaved within the membrane by γ-secretase, thereby releasing the intracellular domain (ICD). (B) Co-expression of TREM2 with meprin β or ADAM10 in HEK293_A10/17^{-/-} cells and Western blot analyses of TREM2 fragments in membrane-enriched fractions and cell supernatants. Anti-TFR antibody was used as loading control. (C) Conditioned media from TREM2 and ADAM10 transfected HEK293_A10/17^{-/-} cells were incubated with the recombinant ectodomains of meprin β and ADAM10 at 37°C for 4 hours. sTREM2 levels were analyzed by Western blot. (D) HEK293_A10/17^{-/-} cells transfected with TREM2 were incubated with recombinant meprin β and proteins from membrane-enriched fractions and cell supernatants were analyzed by Western blot. (E) Time series showing the cleavage of membrane bound TREM2 in HEK293_A10/17^{-/-} cells by recombinant soluble meprin β analyzed by Western blot. (F) Incubation of TREM2 overexpressing HEK293_A10/17^{-/-} cells with recombinant meprin α or meprin β and analysis of TREM2 by Western blot. All transient cell transfections and Western blot analyses were at least performed in biological triplicates

2.2 | Cell lysates, SDS-PAGE, and Western blot

Cell supernatants were collected and cells were harvested with a cell scraper and washed three times in ice-cold PBS. Cells were then incubated in membrane fractioning buffer (1 mM of EDTA, 1 mM of EGTA, 10 mM of TRIS, pH 7.0) for 30 minutes at 4°C and subsequently snap frozen in liquid nitrogen. After centrifugation for 30 minutes at 13 000 rpm at 4°C, pellets were suspended in EDTA-containing lysis buffer (1% (v/v) of Triton X-100 in PBS, pH 7.4) and incubated for 45 minutes. Lysates were centrifuged for 20 minutes at 15 000g at 4°C and protein amount was determined using the BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific) following the manufacturer's instructions. Lysates were denatured in sample buffer including DTT for 10 minutes at 95°C.

Conditioned medium was collected after 24 hours, centrifuged at 1100g for 5 minutes and supplemented with a protease inhibitor cocktail (cOmplete EDTA-free, Roche). Supernatants were frozen at -20°C before analysis. For the analysis of soluble TREM2, 50 µL of Concanavalin A beads (C9017, Sigma) were added to 1 mL of supernatant and samples were incubated overnight. Beads were washed three times with sterile PBS before denaturation with sample buffer including DTT for 10 minutes at 95°C.

Samples were separated by SDS-PAGE (10% or 14% of gel) and blotted in a Tank Blot onto a PVDF-membrane. For immunoblot detection, the following antibodies were used: anti-human TREM2 (AF1828; R&D Systems; 1:1000), anti-murine TREM2 (clone 5F4)³⁴; anti-flag (F1804; Sigma; 1:2000), anti-human meprin β (polyclonal, Pineda; 1:1000), anti-myc (9B11; Cell Signaling), anti-his (34660; Qiagen; 1:1000), anti-GAPDH (14C10; Cell Signaling; 1:2000), anti-TFR (ab84036; Abcam; 1:1000). The HRP-conjugated anti-goat (Jackson ImmunoResearch), anti-mouse (Jackson ImmunoResearch), and anti-rabbit (Jackson ImmunoResearch) were used as secondary antibodies.

2.3 | Bone marrow derived macrophages (BMDMs)

Macrophages derived from meprin β knock-out mice (*Mep1b*^{-/-}) were analyzed for TREM2 levels using murine-specific anti-TREM2 antibody (clone 5F4).³⁴ Mice were kept under specific pathogen free conditions in isolated ventilated cages, on a 12 hours light-dark cycle with food and water ad libitum. Mice were handled in accordance to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the German Animal Welfare Act on protection of animals. All animal protocols were approved by the Central Animal Facility of the University of Kiel and the relevant German authorities.

For isolation of primary macrophages, mice were killed by cervical dislocation. To get access to the BMDMs, extremities where amputated and transferred into sterile PBS. All surgical examinations took place under endotoxin-free conditions under a cell culture hood. Skin and muscles were carefully detached to isolate femur, crus, and humerus. Epiphysis were clipped off to allow access to the bone marrow in the medullary cavity of the diaphysis. By usage of sterile cannula (0.4 × 20 mm, Sterican, Braun) the medullary cavity was washed several times with DMEM. The obtained bone marrow in DMEM was then isolated with a cell strain (Falcon, A corning brand, 100 µm) and transferred into 50 mL Falcons. Collected cells were counted using a hemocytometer (C-chip, NanoEenTek, Neubauer improved, dhc-N01) and transferred into uncoated 10 cm cell culture dishes (TC-dish 100, Cell+, Sarstedt) in a density of 10⁷ cells/dish and cultured in 10 mL DMEM (10% (v/v) of FCS) followed by substitution of 0.5 µg macrophage colony stimulating factor (M-CSF) per 10 mL DMEM. Cells were incubated for 5 days at 37°C. After 48 hours another 5 mL DMEM including 250 ng M-CSF were added. After 5 days, plates were washed three times with sterile PBS and macrophages were prepared for Western blotting or phagocytosis assay as described.

2.4 | Phagocytosis assay

Phagocytosis of fluorogenic *Escherichia coli* particles (pHrodo green *E. coli*, Thermo Fisher Scientific) was analyzed using HEK293T ADAM10/17^{-/-}, PMA-induced THP-1, and U937 cells as well as primary macrophages (BMDMs) from mice. Cells were seeded in 96-well plates at a density of 8 × 10⁴ cells per well 24 hours before phagocytosis measurements. After collection of the supernatants cells were washed two times with Live cell imaging solution (Thermo Fisher Scientific). *E. coli* particles were added in a suspension of 1 µg/mL in Live cell imaging solution at a total of 50 µL/well. As a negative control, phagocytosis was inhibited with 10 µM of cytochalasin D (Life technologies), which was added 30 minutes prior to addition of pHrodo *E. coli* bioparticles. Samples were incubated at 37°C for 120 minutes. Afterward, the suspension was carefully collected and cells were washed three times with MACS buffer (PBS pH 7.4, 0.5% (w/v) of BSA (Albumin Fraction V), 2 mM of EDTA). Cells were subsequently analyzed by either fluorescence-activated cell scanning (FACS) or fluorescence measurements with a microplate reader (Spark®, Tecan Group Ltd.). For Flow cytometric analysis of the phagocytosis assay, we used the FACSCanto (BD Biosciences). Data were analyzed with *FACS Diva* (BD Biosciences) and *FLOWJO Software* (Tree Star Inc).

2.5 | Deglycosylation of recombinant TREM2

Human recombinant TREM2 ectodomain (Sino Biological) was incubated with soluble recombinant meprin β in 20 mM of HEPES, pH 7.5 for 60 minutes at 37°C. For PNGaseF digestion, 4.5 μ g of recombinant TREM2 were incubated with 5 nM of soluble meprin β in HEPES buffer for 2 hours. The samples were deglycosylated with PNGaseF kit (New England Biolabs) according to manufacturer's instructions and separated by SDS-PAGE. For Coomassie staining, gels were incubated in Coomassie Brilliant Blue R-250 Dye (Thermo Fisher Scientific) and subsequently destained.

2.6 | C-Terminal labeling and LC-MS/MS analysis

About 10 μ g of human recombinant TREM2 (Sino Biological) were incubated with 5 nM soluble meprin β in HEPES

buffer for 2 hours at 37°C. The samples were separated by SDS-PAGE and stained with Coomassie. To determine the C-terminus of the protein, a C-terminal labeling experiment was performed. Samples were excised from the gel band and further digested in heavy water ($H_2^{18}O$, 97% pure) with an additional protease (here LysargiNase and chymotrypsin). Newly formed C-termini, or neo-C-termini, will incorporate heavy water ($H_2^{18}O$), and can then be distinguished from the C-termini generated by the incubation of TREM2 with meprin β , which was performed using normal light water ($H_2^{16}O$).

Bands from the SDS-PAGE (Figure 2C) were excised, halved (split into two samples), cut into pieces of approximately 1 mm³, destained, reduced with 10 mM of dithiothreitol at 56°C, alkylated with 55 mM of iodoacetamide at room temperature, washed with ammonium bicarbonate and acetonitrile (ACN), and dried in a vacuum centrifuge. Samples were subsequently digested overnight at 37°C in either 100 ng of chymotrypsin or LysargiNase (10 mM of ammonium bicarbonate, 2 mM of $CaCl_2$) in heavy water ($H_2^{18}O$,

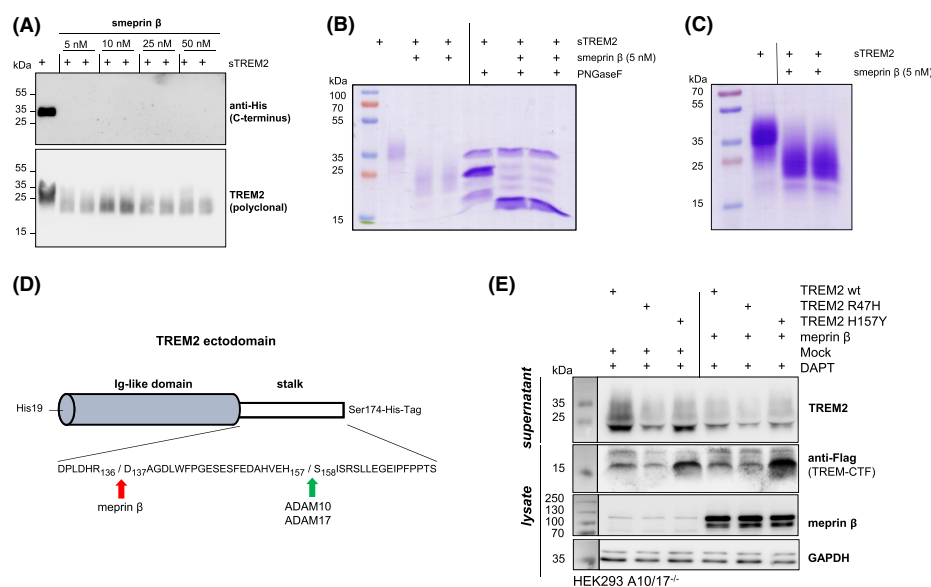


FIGURE 2 Meprin β cleaves TREM2 between arginine 136 and aspartate 137. (A) Incubation of sTREM2 with recombinant soluble meprin β (smeprin β) led to the generation of TREM2 fragments analyzed by Western blot (AF1828; R&D Systems; 1:1,000). (B) sTREM2 was incubated with smeprin β for 2 hours at 37°C and subsequently digested with PNGaseF. The meprin β generated TREM2 fragment is about 10 kDa smaller than the uncleaved TREM2 as analyzed by SDS-PAGE. (C) Coomassie stained gel of sTREM2 incubated with meprin β (2 hours at 37°C) that was used for determination of cleavage sites. Gel bands were excised, split into two samples and digested with either chymotrypsin or LysargiNase in heavy water. (D) Illustration of the TREM2 ectodomain construct used for cleavage site identification (sTREM2). While TREM2 is cleaved by ADAM10 and ADAM17 between histidine 157 and serine 158, the major meprin β cleavage site is further N-terminal between arginine 136 and aspartate 137. (E) Co-expression of TREM2 WT and AD-associated variants with meprin β in HEK293_A10/17^{-/-} cells and Western blot analyses of TREM2 fragments in membrane-enriched fractions and cell supernatants. Anti-GAPDH antibody was used as loading control. All transient cell transfections and Western blot analyses were at least performed in biological triplicates

97% pure). Following overnight digestion, peptides were extracted from the gel by subsequent sonication and shaking in 1% of formic acid (FA), 50% of ACN in 1% of FA, and 90% of ACN in 1% of FA, respectively. The samples were dried in a vacuum centrifuge and the peptides resuspended in 3% of ACN, 0.1% of TFA for further measurements with LC/MS.

In-gel digested samples were analyzed on a Dionex Ultimate 3000 nano-UHPLC coupled to a Q Exactive mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific). The samples were washed on a trap column (Acclaim Pepmap 100 C18, 5 mm × 300 µm, 5 µm, 100 Å, Dionex) for 4 minutes with 3% of ACN/0.1% of TFA at a flow rate of 30 µL/min prior to peptide separation using an Acclaim PepMap 100 C18 analytical column (50 cm × 75 µm, 2 µm, 100 Å, Dionex). A flow rate of 300 nL/min using eluent A (0.05% of FA) and eluent B (80% of ACN/0.04% of FA) was used for gradient separation. Spray voltage applied on a metal-coated PicoTip emitter (10 µm tip size, New Objective, Woburn) was 1.6 kV, with a source temperature of 250°C. Full scan MS spectra were acquired between 300 and 2000 *m/z* at a resolution of 70 000 at *m/z* 400. The ten most intense precursors with charge states greater than 2+ were selected with an isolation window of 3.0 *m/z* and fragmented by HCD with normalized collision energies of 27 and at a resolution of 17 500. Lock mass (445.120025) and dynamic exclusion (15 seconds) were enabled.

The MS raw files were processed by Proteome Discover 2.2 (Thermo, version 2.2.0.388) and MS/MS spectra were searched using the Sequest HT algorithm against a database containing common contaminants (45 sequences) and the canonical human database (20 195 sequences). A semi-enzyme-specific search was performed for both chymotrypsin and LysargiNase with three and two missed cleavages allowed, respectively. An MS1 tolerance of 10 ppm and a MS2 tolerance of 0.02 Da was implemented. Oxidation (15.995 Da) of methionine residues was set as a variable modification along with C-terminal incorporation of ¹⁸O (2.00425 Da). Carbamidomethyl (57.02146 Da) on cysteine residues was set as a static modification. Minimal peptide length was set to six amino acids and a peptide false discovery rate (FDR) was set to 1%.

2.7 | Generation of TBS soluble fractions

Snap-frozen brains were crunched on liquid nitrogen to generate brain powders. Several milligrams of brain powder were then thoroughly homogenized in 10 times the volume (w/v) of ice-cold TBS buffer (50 mM of Tris, 150 mM of NaCl, pH 7.4) by applying multiple strokes in protein low binding tubes (Eppendorf) using a syringe and a 26G needle. In the following, samples were incubated 30 minutes on ice with

vortexing every 10 minutes. Upon centrifugation (10 minutes, 5000g) supernatants were subjected to ultracentrifugation (60 minutes, 130 000g). Supernatants were collected and frozen at −20°C until analysis.

2.8 | Murine TREM2 ELISA

For the quantification of sTREM2 levels in serum from wild-type and meprin β knock-out mice, we used the Meso Scale Discovery (MSD) platform employing the assay essentially as previously described.³⁵ We analyzed only male mice, as we have previously observed a gender-specific difference in TREM2 expression at a significantly lower level in female mice than in male littermates. First, an MSD Gold small spot streptavidin plate was coated with blocking buffer (3% of BSA, 0.05% of tween-20 in PBS, pH 7.4) overnight at 4°C. On the next day, the plate was incubated for 90 minutes at RT with 0.125 µg/mL of biotinylated polyclonal goat anti-mouse TREM2 capture antibody (BAF1729; R&D Systems) diluted in blocking buffer. In the meantime, serum samples and TBS fractions were diluted 1:10 and 1:2, respectively, in sample dilution buffer (1% of BSA, 0.05% of tween-20 in PBS, pH 7.4) supplemented with protease inhibitor mix (Sigma). The plate was then washed two times with wash buffer (0.05% of tween-20 in PBS, pH 7.4) and serum samples were subsequently transferred onto the MSD plate for 120 minutes incubation at RT. The plate was washed two times with wash buffer and incubated in the following with 1 µg/mL rat monoclonal anti-mouse TREM2 detection antibody (clone 5F4, (34)) diluted in blocking buffer for 60 minutes at RT. The plate was again washed two times with wash buffer, and then, incubated with a SULFO-TAG-labeled goat anti-rat secondary antibody (1:1000; MSD) diluted in blocking buffer for 60 minutes at RT. Before the actual measurement, the plate was washed two times with wash buffer and another two times with PBS, pH 7.4. MSD read buffer was added to the plate and the light emission at 620 nm after electrochemical stimulation was measured using the MSD Sector Imager 2400. Concentrations of sTREM2 were finally calculated using the MSD Discovery Workbench software (v4.0.12). As a standard, we used recombinant murine TREM2 (Hözel Diagnostika). For standard curve determination, two-fold serial dilutions were performed in sample dilution buffer supplemented with protease inhibitor mix (Sigma) on the plate spanning concentrations from 4000 to 62.5 pg/mL. sTREM2 concentrations as calculated for TBS soluble fractions were normalized to the total protein concentration as determined using the BCA assay (Interchim). In all incubation steps at RT, the plate was shaken at 300 rpm. All plate washings were performed using a plate washer (ELx405, BioTek).

2.9 | Statistics

All statistical analyses were carried out using GraphPad Prism version 6.01 for Windows (GraphPad Software, La Jolla California, USA). For multiple comparison, a One-way ANOVA followed by a Newman-Keuls multiple comparison test was performed. The comparison of two test groups was performed using an unpaired two-tailed t test. Statistical significance was assigned at the following p-values: * $P < .05$ and ** $P < .01$; **** $P < .0001$. All statistical analyses were carried out using at least three independent biological replicates and error bars are presented as standard error of the mean (SEM) or as standard deviation (SD).

3 | RESULTS

3.1 | Meprin β cleaves TREM2 at the cell surface

Several cell surface proteins were found to be similarly cleaved by ADAM10/17 and meprin β .^{26,27} Therefore, we hypothesized that TREM2 may also be a shared substrate and investigated its shedding by meprin β . To avoid influence of the known TREM2 sheddases ADAM10 and ADAM17 (Figure 1A) in our experiments, we employed Crispr/Cas generated HEK293_ADAM10/17^{-/-} cells.³⁰ We co-expressed TREM2 together with meprin β and, as a positive control, together with ADAM10. As described previously¹⁸ ADAM10 generated a TREM2-CTF that could be enriched in membrane fractions by the addition of the γ -secretase inhibitor DAPT (Figure 1B). Indeed, co-expression with meprin β also resulted in the generation of TREM2-CTF (15 kDa), which was prone to γ -secretase cleavage as observed for the ADAM10 mediated CTF (Figure 1B). As ADAM10 cleaves TREM2 at a defined position within the stalk region^{18,20} increased levels of sTREM2 could be precipitated from the cell supernatant after co-expression (Figure 1B). Surprisingly, in the presence of meprin β only faint signals were detected for sTREM2 after precipitation, even less pronounced than in TREM2 single transfected cells (Figure 1B). Therefore, we hypothesized that meprin β might not only act as a sheddase of TREM2, but also further degrades the entire ectodomain of the receptor. As a control experiment, we generated sTREM2 through co-expression of TREM2 with ADAM10, and then, added the recombinant, active ectodomains of ADAM10 (sADAM10)³³ or meprin β (smeprin β)³¹ to the conditioned medium (Figure 1C). While sADAM10 showed almost no effect on sTREM2, incubation with smeprin β resulted in complete degradation of the sTREM2 ectodomain (Figure 1C). To investigate whether membrane bound TREM2 is also a substrate of soluble meprin β , we transfected the HEK293_ADAM10/17^{-/-} cells with TREM2 and

incubated them with smeprin β . This resulted in a decrease of full-length TREM2 and an increase in CTFs (Figure 1D). Again, we found less sTREM2 in the supernatant of cells incubated with smeprin β compared to untreated cells. To gain further insight into the cleavage dynamics and to investigate if the complete degradation of TREM2 by meprin β can already occur on the cell surface, we performed a time course experiment. To do so, HEK293_ADAM10/17^{-/-} cells were transfected with TREM2 and incubated with smeprin β for different times (Figure 1E). We observed that almost 50% of full-length TREM2 was already cleaved after 30 minutes. The polyclonal antibody raised against the ectodomain of human TREM2 revealed additional bands (Figure 1E, indicated by asterisks) at lower molecular weight after 10 and 20 minutes incubation that vanished later on, supporting the observation of TREM2 degradation at the cell surface. To further validate specificity of meprin β as a sheddase and degrading enzyme of TREM2, we additionally assessed TREM2 cleavage by meprin α , a close relative of meprin β .³⁶ However, meprin α showed no proteolytic activity against TREM2 (Figure 1F).

3.2 | TREM2 is cleaved by meprin β between arginine 136 and aspartate 137

To determine the meprin β cleavage site in TREM2, we used recombinant human TREM2 ectodomain comprising the whole stalk region and Ig-like domain (His19 to Ser174), fused with a His-tag at its C-terminus. In Western blot analysis, we found that incubation with 5 nM of meprin β is sufficient to cleave soluble TREM2 and generate a rather stable fragment (Figure 2A). TREM2 is highly N-glycosylated (Asn20 and Asn79) and it is difficult to determine the exact size of the cleavage fragments. Therefore, we used PNGaseF to deglycosylate TREM2. This experiment showed that the meprin β generated TREM2 fragment is about 10 kDa smaller than the uncleaved TREM2 (Figure 2B). A C-terminal ¹⁸O-labeling strategy followed by LC-MS/MS analysis was employed for the identification of meprin β cleavage sites in glycosylated TREM2 (Figure 2C, Tables 1 and 2). One prominent cleavage site (in terms of the number of PSMs (Peptide Spectrum Matches)) between Arg136 and Asp137 in two separate experiments (Tables 1 and 2) could be identified. Besides this major cleavage site, we also found several minor cleavage events N- and C-terminal of acidic amino acid residues from positions 131 to 147. In summary, meprin β cleaves TREM2 within the stalk region predominantly between Arg136 and Asp137, which is distinct to the ADAM10/17 identified site between His157 and Ser158 (Figure 2D).^{20,21,37} However, we additionally analyzed shedding of the AD-associated variant TREM2 H157Y by meprin β (Figure 2E). Interestingly, we observed that cleavage of TREM2 H157Y by meprin β resulted in increased TREM2-CTF levels compared to the

Annotated sequence	Position in protein	# PSMs	Theo. MH+ [Da]
[L].RKVLVEVLADPLDHRDAG.[D]	[122-139]	1	2003.10325
[L].RKVLVEVLADPLDHRDA.[G]	[122-138]	2	1946.08178
[L].RKVLVEVLADPLDHR.[D]	[122-136]	8	1760.01773
[L].RKVLVEVLADPL.[D]	[122-133]	1	1351.83076
[R].KVLVEVLADPLDHR.[D]	[123-136]	2	1603.91662

Annotated sequence	Position in protein	# PSMs	Theo. MH+ [Da]
[L].HGSEADTLRKVLVEVLADPL.[D]	[114-133]	1	2162.18156
[L].RKVLVEVLADPLDHRDA.[G]	[122-138]	4	1946.08178
[L].RKVLVEVLADPLDHR.[D]	[122-136]	51	1760.01773
[L].RKVLVEVLADPLDH.[R]	[122-135]	2	1603.91662
[L].RKVLVEVLADPLD.[H]	[122-134]	1	1466.85771
[L].RKVLVEVLADPL.[D]	[122-133]	3	1351.83076
[L].RKVLVEVLAD.[P]	[122-131]	2	1141.69393
[L].VEVLADPLDHRDAG.[D]	[126-139]	1	1506.7547
[L].VEVLADPLDHR.[D]	[126-136]	6	1263.66918
[L].VEVLADPLDH.[R]	[126-135]	1	1107.56807
[L].DHRDAGDLWFPGES.[E]	[134-147]	2	1601.69791
[L].DHRDAGDLWFPG.[S]	[134-146]	1	1514.66588
[L].DHRDAGDLWFPG.[E]	[134-145]	1	1385.62329

TABLE 1 C-terminal peptides that were identified for meprin β hydrolyzed TREM2 following an in-gel digestion with LysargiNase. Several cleavage sites were identified including 133L.134D, 136R.137D, 138A.139G, and 139G.140D. The most abundant meprin β cleavage site (in terms of the number of PSMs (Peptide Spectrum Matches)) was observed at 136R.137D

TABLE 2 C-terminal peptides that were identified for meprin β hydrolyzed TREM2 following an in-gel digestion with chymotrypsin. Several cleavage sites were identified. The most abundant meprin β cleavage site (in terms of PSMs) was observed at 136R.137D

wild-type form, although the aa exchange at position 157 is not directly influencing the newly identified meprin β cleavage site at Asp137. Therefore, we assume that this variant is somehow more accessible to meprin β (localization, protein stability, etc) rather than triggering the cleavage site.

3.3 | Co-expression of meprin β and TREM2 decreases the phagocytic potential of cells

To assess the functional consequence of TREM2 degradation by meprin β , we performed a phagocytosis assay in different cell lines. To test the phagocytic potential in ADAM10/17 deficient HEK cells, a fusion construct of TREM2 and DAPI2 was used as these cells do not naturally express DAPI2¹⁸ (Figure 3A). To test if this construct is proteolytically processed, it was co-expressed with ADAM10 or meprin β (Figure 3B). Isolated membrane fractions revealed a decreased signal for full-length TREM2 upon co-expression with both proteases, confirming cleavage of this TREM2-DAPI2 construct. As expected, increased levels of sTREM2 were found in precipitated supernatants upon ADAM10 co-transfection and

decreased levels upon meprin β co-expression (Figure 3B). The phagocytic potential of the cells was measured by the internalization of fluorogenic pHrodo beads.^{18,20} These are *E. coli* bioparticles conjugated to a dye emitting fluorescence in acidic milieu. Thus, a fluorescent signal can only be measured after endocytosis of the particles and transport to the lysosome. We observed that co-expression of TREM2 and meprin β decreases the phagocytic capacity of these cells significantly when compared to TREM2 single transfected cells (Figure 3C). A similar decrease in phagocytosis was detected after co-transfection of TREM2 and ADAM10 (Figure 3C).¹⁸ To assess this in a more physiologically relevant cell type, we repeated this experiment using the human macrophage cell lines THP-1 and U937, which endogenously expresses DAPI2. Therefore, cells were transfected with TREM2 alone or together with meprin β (which is barely detectable endogenously), and at the same time, were stimulated with PMA to induce a macrophage-like differentiation.³⁸ After 72 hours, pHrodo beads were added and the amount of phagocytosed beads was analyzed after 120 minutes. As seen in the HEK cell experiment, co-expression of meprin β with TREM2 reduced the phagocytic potential significantly (Figure 3D,E) in both macrophage cell lines.

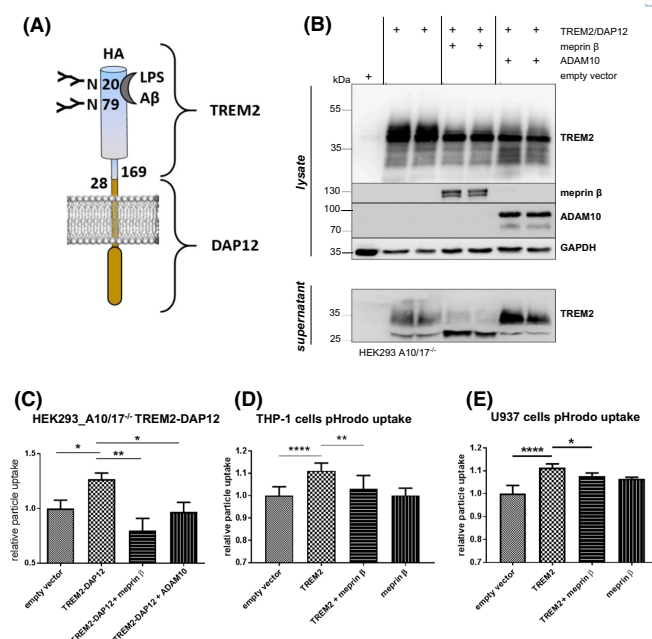


FIGURE 3 Impaired phagocytosis of fluorogenic *E. coli* particles in cells co-expressing meprin β and TREM2. (A) Illustration of the TREM2/DAPI12 fusion construct used in the phagocytosis assays. (B) Proteolytic cleavage of the overexpressed fusion constructs in HEK293_A10/17^{-/-} cells transfected with meprin β or ADAM10. Proteins from cell supernatants and membrane-enriched fractions were analyzed by Western blot. (C) Phagocytosis assay with transfected HEK293_A10/17^{-/-} cells. Relative particle uptake analyzed by FACS is indicated for differentially transfected cells. Data are represented as means of median fluorescence intensity \pm SEM from two independent experiments and expressed relative to empty vector transfected control ($n = 8$ and 9 , respectively). (D) Relative particle uptake of THP-1 cells transfected with wild-type TREM2 and meprin β ($n = 10$) was analyzed using a Tecan fluorescent reader measuring mean fluorescence intensity of a defined number of cells. (E) Relative particle uptake of U937 cells transfected with wild-type TREM2 and meprin β ($n = 6$) was analyzed using a Tecan fluorescent reader measuring mean fluorescence intensity of a defined number of cells. All transient cell transfections and Western blot analyses were at least performed in biological triplicates. Statistical differences were calculated by One-way ANOVA followed by a Newman-Keuls multiple comparison test. Comparison of two test groups was performed using an unpaired two-tailed t test (* $P < .05$; ** $P < .01$; *** $P < .0001$)

3.4 | Meprin β controls TREM2 levels on primary macrophages

As we could show that membrane bound and soluble meprin β degrade TREM2, which leads to reduced phagocytosis, we were keen to evaluate if cleavage of TREM2 by meprin β is physiologically relevant. Meprin β has been reported to be expressed on macrophages important for cell migration and pro-inflammatory stimuli.^{39,40} Thus, we isolated BMDMs from meprin β knock-out⁴¹ and wild-type mice and analyzed the TREM2 levels. Mature TREM2 significantly accumulated in membrane-enriched fractions of macrophages deficient for meprin β (Figure 4A,B). After activating the BMDMs with LPS for 6 hours to induce ADAM mediated shedding, the signal intensity for mature TREM2 was similar

to the one obtained for wild-type BMDMs (Figure 4A). This indicates a constitutive function for meprin β and an inducible shedding activity for ADAMs in TREM2 proteolysis. To assess a possible functional consequence, we performed the phagocytosis assay with these cells (non LPS stimulated) and found a significant increase in phagocytic potential for cells deficient for meprin β when compared to wild-type cells (Figure 4C). As a negative control, we added cytochalasin D (CytoD), an actin polymerization inhibitor that blocks phagocytosis (Figure 4C).¹⁸ To further investigate, if meprin β is a constitutive sheddase of TREM2 in vivo, we analyzed the levels of soluble TREM2 in serum of *Mep1b*^{-/-} mice. Indeed, we detected significantly reduced amounts of the soluble receptor in serum of *Mep1b*^{-/-} animals compared to WT mice (Figure 4D).

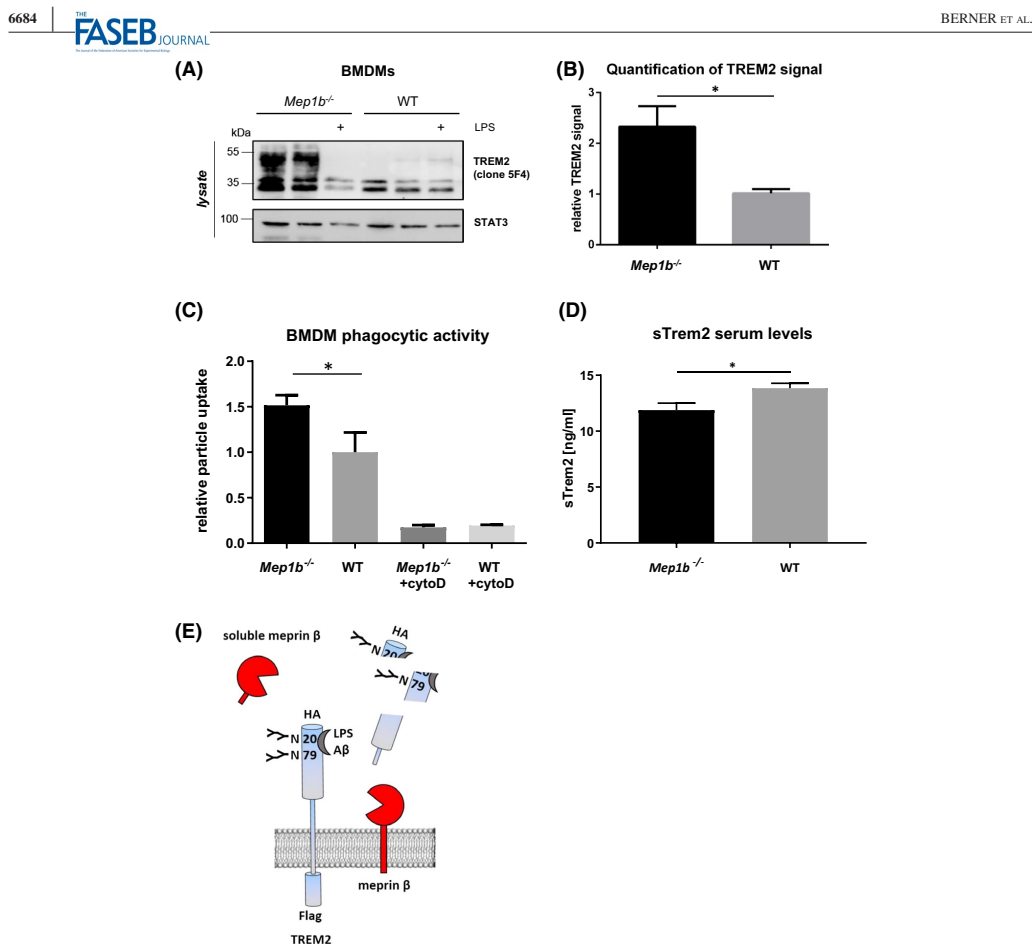


FIGURE 4 Cleavage of TREM2 on macrophages by meprin β . (A) Membrane-enriched fractions from BMDMs of *Mep1b*^{-/-} mice showed higher levels of mature TREM2 than the wild-type controls visualized by Western blot. Enhanced levels of mature TREM2 at 45 kDa were detected (murine-specific anti-TREM2, clone 5F4) in samples of *Mep1b*^{-/-} mice, which was decreased upon LPS stimulation. Anti-STAT3 was used as loading control. (B) Densitometric analysis of TREM2 band intensities in non LPS stimulated BMDMs from *Mep1b*^{-/-} and wild-type mice as seen in (A). The comparison of two test groups ($n = 5$) was performed using an unpaired two-tailed t test. ($*P < .05$). (C) Phagocytosis assay with BMDMs from wild-type and *Mep1b*^{-/-} mice. Cytochalasin D (CytoD) was used to block endocytosis. Relative particle uptake measured by FACS is indicated for different cells. Data are represented as means of median fluorescence intensity \pm SD ($n = 3$). Statistical differences were calculated by One-way ANOVA followed by a Newman-Keuls multiple comparison test ($*P < .05$). (D) Determination of sTREM2 levels in serum reveals significantly lower levels in *Mep1b*^{-/-} ($n = 7$, all male) than in wild-type mice ($n = 5$, all male). Data are represented as means \pm SEM. (E) Cartoon illustrating the interaction of TREM2 with soluble and membrane bound meprin β resulting in the degradation of the TREM2 ectodomain

4 | DISCUSSION

Recently, Crowther and colleagues showed that on macrophages turnover of TREM2 is remarkably rapid, having a half-life of <1 hour. Notably, inhibition experiments revealed only minor contribution of ADAM10 in these cells.²¹ The metalloprotease meprin β can cleave several cell surface

proteins similar to ADAM10/17.^{26,27} Hence, we investigated if TREM2 may also be a shared substrate and analyzed its shedding by meprin β . Indeed, TREM2 was cleaved by meprin β , and the soluble ectodomain of the receptor was even further degraded by the protease, which is a striking difference compared to ADAM10 cleavage. Meprin β can be physiologically shed from the cell surface by ADAM10 and

ADAM17, generating the soluble meprin β ectodomain that is still able to cleave substrates,⁴²⁻⁴⁴ which was also confirmed for the cleavage of TREM2 (Figure 4E).

Besides ADAM10/17, we further validated the specificity of meprin β as a sheddase and degrading enzyme of TREM2. Therefore, we investigated TREM2 cleavage by the metallo-protease meprin α , which is closely related to meprin β .³⁶ Of note, meprin α displays a similar cleavage specificity with a preference for negatively charged amino acids in P1' position of the cleavage site.²⁵ However, meprin α showed no proteolytic activity against TREM2. This observation is similar to APP cleavage, where meprin β but not meprin α can act as β -secretase.⁴⁵

For meprin β the major cleavage site in TREM2 was identified between Arg136 and Asp137, which is N-terminal to the ADAM10/17 site. This cleavage site perfectly matches the meprin β preference for negatively charged amino acids at the P1' position.²⁵ Besides this major cleavage site, we also found several minor cleavage events N- and C-terminal of acidic amino acid residues from positions 131 to 147. Of note, for frontotemporal dementia (FTD) one missense mutation of TREM2 (D134G) is reported⁴⁶ that is in close proximity to the major meprin β cleavage site and may affect TREM2 shedding under certain conditions.

It was shown previously that the amount of functional TREM2 directly correlates with the phagocytic potential of cells.¹⁸ This is further supported by disease-associated TREM2 variants found in AD, Nasu-Hakola disease (NHD), and FTD-like syndrome that do not reach the cell surface and dampen phagocytosis.^{18,20} We were interested, if the activity of meprin β toward TREM2 alters the phagocytic potential of cells. Since meprin β has been reported to be expressed on macrophages, being important for cell migration and pro-inflammatory stimuli,^{39,40} we analyzed BMDMs from *Mep1b*^{-/-} mice and observed increased phagocytosis compared to wild-type cells. These findings indicate a correlation of meprin β levels and the amount of TREM2 on the cell surface of macrophages and consequently link meprin β levels to the phagocytic potential of these cells in vivo. However, we cannot fully exclude that additional meprin β substrates could influence phagocytosis or that the interaction of meprin β and TREM2 may have impact on other biological functions besides phagocytosis, such as migration. The physiological relevance of meprin β mediated TREM2 cleavage is further supported by significantly reduced levels of soluble TREM2 in the serum of *Mep1b*^{-/-} mice compared to control animals. However, the role of meprin β in inflammatory diseases is still a controversial issue. Meprin β has been linked to inflammatory bowel disease⁴⁷ and it was shown to shed the IL-6R and to induce pro-inflammatory trans-signaling.²⁷ Meprin β promotes transendothelial migration of cells through CD99 cleavage, an important step for immune cells to reach the site of inflammation.²⁸

Additionally, meprin β can cleave, and thereby inactivate IL-6⁴⁸ and the important chemokine CCL2/MCP-1 leading to a reduced monocyte attraction.⁴⁹

Taken together, we found that meprin β sheds and degrades TREM2 at the cell surface and that it controls the level of TREM2 on macrophages but not on microglial cells, at least under unchallenged conditions. We determined a major cleavage site for meprin β between Arg136 and Asp137, which is 21 aa N-terminal of the described ADAM10 cleave site. Additionally, we could show that meprin β can control the cell autonomous function of TREM2 and decreases the phagocytic potential of cells. Of note, this is not necessarily restricted to meprin β expressing cells, as we could show that the protease can act as membrane bound or soluble protease in cis and trans, respectively. In sum, soluble TREM2 generated by meprin β exhibits different properties compared to the ADAM-released ectodomain, which might interfere with already established approaches for the detection of sTREM2 in blood or CSF. This should be taken into account in TREM2 associated pathologies.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Inez Götting and Gaby Steinkamp for excellent help in BMDM isolation, cultivation, and differentiation. We also thank Brigitte Nuscher for technical assistance with MSD ELISA measurements.

CONFLICT OF INTEREST

C.H. collaborates with Denali Therapeutics, participated on one advisory board meeting of Biogen, and received a speaker honorarium from Novartis and Roche. C.H. is chief advisor of ISAR Bioscience.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

DKB, LW, PA, and CBP conceived the study. DKB, LW, JS, KS, TK, FS, FA, AT, CH, PA, and CBP performed or designed experiments. KS, RL, GK, and CH provided material. DKB, LW, and CBP wrote the manuscript.

REFERENCES

1. Yeh FL, Hansen DV, Sheng M. TREM2, microglia, and neurodegenerative diseases. *Trends Mol Med*. 2017;23:512-533.
2. Colonna M, Wang Y. TREM2 variants: new keys to decipher Alzheimer disease pathogenesis. *Nat Rev Neurosci*. 2016;17:201-207.
3. Guerreiro R, Wojtas A, Bras J, et al. TREM2 variants in Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2013;368:117-127.
4. Jin SC, Benitez BA, Karch CM, et al. Coding variants in TREM2 increase risk for Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*. 2014;23:5838-5846.
5. Jonsson T, Stefansson H, Steinberg S, et al. Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2013;368:107-116.
6. Jiang T, Tan L, Chen Q, et al. A rare coding variant in TREM2 increases risk for Alzheimer's disease in Han Chinese. *Neurobiol Aging*. 2016;42:217.e211-217.e213.

7. Ulland TK, Colonna M. TREM2—a key player in microglial biology and Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*. 2018;14:667-675.
8. Parhizkar S, Arzberger T, Brendel M, et al. Loss of TREM2 function increases amyloid seeding but reduces plaque-associated ApoE. *Nat Neurosci*. 2019;22:191-204.
9. Jay TR, Miller CM, Cheng PJ, et al. TREM2 deficiency eliminates TREM2+ inflammatory macrophages and ameliorates pathology in Alzheimer's disease mouse models. *J Exp Med*. 2015;212:287-295.
10. Daws MR, Sullam PM, Niemi EC, Chen TT, Tchao NK, Seaman WE. Pattern recognition by TREM-2: binding of anionic ligands. *J Immunol*. 2003;171:594-599.
11. N'Diaye EN, Branda CS, Branda SS, et al. TREM-2 (triggering receptor expressed on myeloid cells 2) is a phagocytic receptor for bacteria. *J Cell Biol*. 2009;184:215-223.
12. Charles JF, Humphrey MB, Zhao X, et al. The innate immune response to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by macrophages is dependent on TREM2-DAP12. *Infect Immun*. 2008;76:2439-2447.
13. Zhong L, Chen XF, Zhang ZL, et al. DAP12 stabilizes the C-terminal fragment of the triggering receptor expressed on myeloid cells-2 (TREM2) and protects against LPS-induced pro-inflammatory response. *J Biol Chem*. 2015;290:15866-15877.
14. Yeh FL, Wang Y, Tom I, Gonzalez LC, Sheng M. TREM2 binds to apolipoproteins, including APOE and CLU/APOJ, and thereby facilitates uptake of amyloid-beta by microglia. *Neuron*. 2016;91:328-340.
15. Zhao Y, Jaber V, Lukiw WJ. Over-expressed pathogenic miRNAs in Alzheimer's disease (AD) and Prion disease (PrD) drive deficits in TREM2-mediated Abeta42 peptide clearance. *Front Aging Neurosci*. 2016;8:140.
16. Zhao Y, Wu X, Li X, et al. TREM2 is a receptor for beta-amyloid that mediates microglial function. *Neuron*. 2018;97:1023-1031. e1027.
17. Zhong L, Zhang ZL, Li X, et al. TREM2/DAP12 complex regulates inflammatory responses in microglia via the JNK signaling pathway. *Front Aging Neurosci*. 2017;9:204.
18. Kleinberger G, Yamanishi Y, Suarez-Calvet M, et al. TREM2 mutations implicated in neurodegeneration impair cell surface transport and phagocytosis. *Sci Transl Med*. 2014;6:243ra286.
19. Wunderlich P, Glebov K, Kemmerling N, Tien NT, Neumann H, Walter J. Sequential proteolytic processing of the triggering receptor expressed on myeloid cells-2 (TREM2) protein by ectodomain shedding and gamma-secretase-dependent intramembranous cleavage. *J Biol Chem*. 2013;288:33027-33036.
20. Schlepckow K, Kleinberger G, Fukumori A, et al. An Alzheimer-associated TREM2 variant occurs at the ADAM cleavage site and affects shedding and phagocytic function. *EMBO Mol Med*. 2017;9:1356-1365.
21. Thornton P, Sevalle J, Deery MJ, et al. TREM2 shedding by cleavage at the H157-S158 bond is accelerated for the Alzheimer's disease-associated H157Y variant. *EMBO Mol Med*. 2017;9:1366-1378.
22. Wu K, Byers DE, Jin X, et al. TREM-2 promotes macrophage survival and lung disease after respiratory viral infection. *J Exp Med*. 2015;212:681-697.
23. Zhong L, Chen XF, Wang T, et al. Soluble TREM2 induces inflammatory responses and enhances microglial survival. *J Exp Med*. 2017;214:597-607.
24. Suarez-Calvet M, Kleinberger G, Araque Caballero MA, et al. sTREM2 cerebrospinal fluid levels are a potential biomarker for microglia activity in early-stage Alzheimer's disease and associate with neuronal injury markers. *EMBO Mol Med*. 2016;8:466-476.
25. Becker-Pauly C, Barre O, Schilling O, et al. Proteomic analyses reveal an acidic prime side specificity for the astacin metalloprotease family reflected by physiological substrates. *Mol Cell Proteomics*. 2011;10:M111 009233.
26. Schonherr C, Bien J, Isbert S, et al. Generation of aggregation prone N-terminally truncated amyloid beta peptides by meprin beta depends on the sequence specificity at the cleavage site. *Mol Neurodegener*. 2016;11:19.
27. Arnold P, Boll I, Rothaug M, et al. Meprin metalloproteases generate biologically active soluble interleukin-6 receptor to induce trans-signaling. *Sci Rep*. 2017;7:44053.
28. Bedau T, Peters F, Prox J, et al. Ectodomain shedding of CD99 within highly conserved regions is mediated by the metalloprotease meprin beta and promotes transendothelial cell migration. *FASEB J*. 2017;31:1226-1237.
29. Bedau T, Schumacher N, Peters F, et al. Cancer-associated mutations in the canonical cleavage site do not influence CD99 shedding by the metalloprotease meprin beta but alter cell migration in vitro. *Oncotarget*. 2017;8:54873-54888.
30. Riethmueller S, Ehlers JC, Lokau J, et al. Cleavage site localization differentially controls interleukin-6 receptor proteolysis by ADAM10 and ADAM17. *Sci Rep*. 2016;6:25550.
31. Becker C, Kruse MN, Slotty KA, et al. Differences in the activation mechanism between the alpha and beta subunits of human meprin. *Biol Chem*. 2003;384:825-831.
32. Becker-Pauly C, Howel M, Walker T, et al. The alpha and beta subunits of the metalloprotease meprin are expressed in separate layers of human epidermis, revealing different functions in keratinocyte proliferation and differentiation. *J Invest Dermatol*. 2007;127:1115-1125.
33. Jefferson T, Auf dem Keller U, Bellac C, et al. The substrate degradome of meprin metalloproteases reveals an unexpected proteolytic link between meprin beta and ADAM10. *Cell Mol Life Sci*. 2013;70:309-333.
34. Xiang X, Werner G, Bohrmann B, et al. TREM2 deficiency reduces the efficacy of immunotherapeutic amyloid clearance. *EMBO Mol Med*. 2016;8:992-1004.
35. Kleinberger G, Brendel M, Mrcsco E, et al. The FTD-like syndrome causing TREM2 T66M mutation impairs microglia function, brain perfusion, and glucose metabolism. *EMBO J*. 2017;36:1837-1853.
36. Broder C, Becker-Pauly C. The metalloproteases meprin alpha and meprin beta: unique enzymes in inflammation, neurodegeneration, cancer and fibrosis. *Biochem J*. 2013;450:253-264.
37. Feuerbach D, Schindler P, Barske C, et al. ADAM17 is the main sheddase for the generation of human triggering receptor expressed in myeloid cells (hTREM2) ectodomain and cleaves TREM2 after Histidine 157. *Neurosci Lett*. 2017;660:109-114.
38. Daigneault M, Preston JA, Marriott HM, Whyte MK, Dockrell DH. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS ONE*. 2010;5:e8668.
39. Li YJ, Fan YH, Tang J, Li JB, Yu CH. Meprin-beta regulates production of pro-inflammatory factors via a disintegrin and metalloproteinase-10 (ADAM-10) dependent pathway in macrophages. *Int Immunopharmacol*. 2014;18:77-84.
40. Crisman JM, Zhang B, Norman LP, Bond JS. Deletion of the mouse meprin beta metalloprotease gene diminishes the ability of

- leukocytes to disseminate through extracellular matrix. *J Immunol.* 2004;172:4510-4519.
41. Norman LP, Jiang W, Han X, Saunders TL, Bond JS. Targeted disruption of the meprin beta gene in mice leads to underrepresentation of knockout mice and changes in renal gene expression profiles. *Mol Cell Biol.* 2003;23:1221-1230.
 42. Hahn D, Pischitzis A, Roesmann S, et al. Phorbol 12-myristate 13-acetate-induced ectodomain shedding and phosphorylation of the human meprin beta metalloprotease. *J Biol Chem.* 2003;278:42829-42839.
 43. Schutte A, Ermund A, Becker-Paul C, et al. Microbial-induced meprin beta cleavage in MUC2 mucin and a functional CFTR channel are required to release anchored small intestinal mucus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111:12396-12401.
 44. Wichert R, Ermund A, Schmidt S, et al. Mucus detachment by host metalloprotease meprin beta requires shedding of its inactive proform, which is abrogated by the pathogenic protease RgpB. *Cell Rep.* 2017;21:2090-2103.
 45. Bien J, Jefferson T, Causevic M, et al. The metalloprotease meprin beta generates amino terminal-truncated amyloid beta peptide species. *J Biol Chem.* 2012;287:33304-33313.
 46. Sirkis DW, Aparicio RE, Schekman R. Neurodegeneration-associated mutant TREM2 proteins abortively cycle between the ER and ER-Golgi intermediate compartment. *Mol Biol Cell.* 2017;28:2723-2733.
 47. Vazeille E, Bringer MA, Gardarin A, et al. Role of meprins to protect ileal mucosa of Crohn's disease patients from colonization by adherent-invasive *E. coli*. *PLoS ONE.* 2011;6:e21199.
 48. Keiffer TR, Bond JS. Meprin metalloproteases inactivate interleukin 6. *J Biol Chem.* 2014;289:7580-7588.
 49. Herzog C, Haun RS, Shah SV, Kaushal GP. Proteolytic processing and inactivation of CCL2/MCP-1 by meprins. *Biochem Biophys Rep.* 2016;8:146-150.

How to cite this article: Berner DK, Wessolowski L, Armbrust F, et al. Meprin β cleaves TREM2 and controls its phagocytic activity on macrophages. *The FASEB Journal.* 2020;34:6675–6687. <https://doi.org/10.1096/fj.201902183R>

7.2 Danksagung

Mein Dank gilt...

... Christoph für die Überlassung des Themas, die sehr gute und stetige Betreuung sowie die Möglichkeit, meine Arbeit auf der Winter School on Proteinases and Inhibitors in Tiers (Italien) zu präsentieren.

... Dennis für die Vorarbeit an dem Thema.

... der Arbeitsgruppe für die Einführung in die Laborarbeit und die ständige Bereitschaft Fragen zu beantworten, nützliche Ratschläge zu geben und Experimente durchzusprechen. Insbesondere danke ich Fred, Philipp, Cynthia, Martin, Franka, Flo und Rielana, die immer ein offenes Ohr hatten.

... Dr. rer. nat. T. Koudelka und Prof. Dr. rer. nat. A. Tholey (Institut für Experimentelle Medizin, AG Systematische Proteomics und Bioanalytik, UKSH Campus Kiel) für die gute Zusammenarbeit.

... Prof. Dr. Dr. h.c. Christian Haass und seiner Arbeitsgruppe für die Kooperation und die Überlassung mehrerer Arbeitsmaterialien.

... der IRTG des SFB 877 und der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die finanzielle Unterstützung und das Angebot an Weiterbildungsmöglichkeiten.

... meiner Familie und Waldemar, die mich nicht nur in der Zeit meiner Doktorarbeit, sondern auch während meines ganzen Studiums bedingungslos und unermüdlich unterstützt haben.