



**Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg**  
**Medizinische Fakultät Mannheim**  
**Dissertations-Kurzfassung**

**New mechanisms of signal transduction in alternatively activated macrophages**

Autor: Anna Popova  
Institut / Klinik: Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie  
Doktormutter: Priv.-Doz. Dr. J. Kzhyshkowska

Klassisch aktivierte Makrophagen fördern die Inflammation, die Degradation der extrazellulären Matrix und die Apoptose, wohingegen alternativ aktivierte Makrophagen zur Aufhebung der Inflammation und Wundheilung beitragen, aufgrund ihrer anti-inflammatorischen, fibrotischen, proliferativen und angiogenen Aktivität. In dieser Studie wurden zwei Themen bearbeitet: „Regulation der M-CSF Produktion und dessen Rezeptorexpression und Aktivität in M1 und M2 Makrophagen“ und „Analyse der Signaltransduktion von IL17BR in M2 Makrophagen“.

Zunächst wurde die Regulation der M-CSF Produktion und dessen Rezeptorexpression und Aktivität in zwei Typen von Makrophagen untersucht. Die Fähigkeit der Makrophagen selber M-CSF zu produzieren, wurde bereits in der Literatur beschrieben, allerdings sind die Daten zur Regulation durch TH1 und TH2 Cytokine oder Hormone widersprüchlich. In dieser Studie wurde die Regulation der M-CSF Produktion durch primäre, humane Monocyten-abgeleitete Makrophagen in Abhängigkeit von TH1 und TH2 Cytokinen (IFN $\gamma$  und IL4) und anti-inflammatorischen Wirkstoffen- Glucocortikoid (GC) Dexamethasone untersucht. Es wurde gezeigt das IFN $\gamma$  und IL4 effizient die Produktion von M-CSF von Makrophagen induzieren, während GC diese dosisabhängig inhibieren. Ähnlich inhibiert GC die Produktion die Inflammation durch Makrophagen als Antwort auf bakterielle Stimuli. Der Hypothese nachgehend, dass dieser Effekt von GC auf der Inhibition von M-CSF basiert, wurde gezeigt, dass die Zugabe von exogenem M-CSF zu Dexamethason behandelten Makrophagen ihre Fähigkeit, TNF $\alpha$  in Abhängigkeit in LPS zu produzieren, wieder herstellt. Diese Daten zeigen, dass GC behandelte Makrophagen ihre Fähigkeit auf M-CSF zu reagieren beibehalten. In Bezug auf den Mechanismus der Reaktivität wurde aufgezeigt, dass Dexamethason die Oberflächenexpression von CSFR stark hochreguliert, während es keinen, oder nur geringen Effekt auf die CSFR1 mRNA und das gesamt Protein hat. Demzufolge sichert die Fähigkeit der Makrophagen M-CSF zu produzieren die Makrophagendifferenzierungen unter TH1 und TH2 Bedingungen. Die Erhöhung von CSFR an der Oberfläche, könnte einen kompensatorischen Mechanismus herstellen, der es erlaubt auf geringe Mengen von M-CSF zu reagieren. Desweiteren wurde die Signaltransduktion von IL17BR, der zu IL17R Familie gehört, untersucht. Bis heute ist die Signalgebung von IL17 BR wenig verstanden und daher war es das Ziel der Untersuchung, Bindungspartner von IL17BR im Yeast Two Hybrid screening zu identifizieren. DAZAP2 wurde als Bindungspartner von IL17BR in prätransformierter humanen Placenta und Nieren cDNA library identifiziert. DAZAP2 ist ein kleines Protein von 168 Aminosäuren und besitzt diverse Funktionen in Zellprozessen, wie der Signaltransduktion, der Bildung von Stressgranula, der Organentwicklung der Herzmuskeldifferenzierung und der Osteoblasten Adhäsion.

Zunächst wurde die Eingrenzung von Bindungsstellen in IL17BR und DAZAP2 durchgeführt, Es wurde beobachtet das ein 33 Aminosäuremotiv in IL17BR, lokalisiert zwischen Aminosäure 327 und 360 für die Bindung des Rezeptors an DAZAP2, verantwortlich ist. Es wurde gezeigt, dass die DAZAP2 SH2 Bindungsdomäne für die Rezeptorbindung wichtig ist. Genauer, die YSEI und YTIW Motive sind wichtig für die Interaktion von DAZAP2 mit IL17BR. Aber nur eines von 2 Tyrosinen in diesen Domänen war ausreichend für die Bindung. Danach wurde die Lokalisation von DAZAP2 in transient transfizierten HEK 293 und in nativen Makrophagen untersucht. In HEK 293 Zellen wurde DAZAP2 im Cytoplasma und im Nukleus detektiert. Es war überall im Cytoplasma in einer punktuellen Verteilung vorhanden. Wohingegen es im Nukleus entweder gleichmäßig verteilt, oder in nukleären Punkten lokalisiert war, kolokalisiert mit dem Splicingfaktor SC 35. Die Verteilung von DAZAP2 in Makrophagen unter verschiedenen Stimulationen war sehr ähnlich. Es war mehrheitlich im Nukleus lokalisiert, mit einer schwachen Färbung im Cytoplasma. Allerdings zeigten Makrophagen, differenziert in Gegenwart von IL4/IL17E und IL4/TGF $\beta$  eine viel stärkere Färbung von DAZAP2 im Cytoplasma, verglichen zu anderen Stimulationen. Schließlich wurde die Fähigkeit von Smurf2 einer E3 ubiquitin Ligase, welche ein Bindungspartner von DAZAP2 ist, untersucht mit DAZAP2 und IL17BR zu interagieren. Es wurde gezeigt das Smurf 2 an beide DAZAP2 und IL17BR bindet. Wie erwartet ist die Bindung von Smurf2 an DAZAP2 von den Smurf2 WW Domänen und der DAZAP2 PY Domäne abhängig. Die Analyse von Smurf2 und IL17BR zeigte, dass die WW Domänen von Smurf 2 nicht für die Bindung von IL17BR verantwortlich sind und das ein Motiv, lokalisiert in IL17BR zwischen Aminosäure 311 und 404 für die Bindung von Smurf 2 ausreichend ist. Von publizierten Daten kann geschlussfolgert werden, dass DAZAP2 sehr wahrscheinlich an

verschiedenen Signalwegen beteiligt ist. In dieser Studie wird zum ersten Mal gezeigt, dass DAZAP2 an IL17BR bindet und konzentrierter im Cytoplasma, infolge IL17E Stimulation, erscheint, was auf seiner Rolle im IL17BR Signalweg hindeutet. Desweiteren war eine entscheidende Beobachtung dieser Studie, dass Smurf2 direkt mit DAZAP2 interagiert und an deren Degradation teil hat.