

# **Comparative characterization of SPP related proteases and discovery of regulated intramembrane proteolysis of TNF $\alpha$ and FasL by SPPL2a and SPPL2b**

A dissertation submitted to the Swiss Federal Institute of Technology Zurich  
for the degree of

Doctor of Natural Sciences

presented by

**Elena Friedmann**

M.Sc., Weizmann Institute of Science

born April 25<sup>th</sup>, 1977

citizen of Russia and Israel

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Ari Helenius, examiner

Dr. Bruno Martoglio, co-examiner

Prof. Ulrike Kutay, co-examiner

2005

---

## Summary

Intramembrane-cleaving proteases cut proteins within their transmembrane regions in the plane of lipid bilayer. This cleavage liberates fragments from membrane-bound precursor proteins, which typically exert downstream functions such as cell signaling and regulation, immune surveillance and intracellular communication. Three families of metallo-, serine-, and aspartic proteases that promote intramembrane cleavage are known at present. Presenilin and a recently identified Signal Peptide Peptidase (SPP) belong to the family of GXGD aspartic intramembrane proteases.

This work focused on Signal Peptide Peptidase Like proteins (SPPLs) recently identified in the human genome. A comparative analysis of the topologies of SPP and its human homologues, SPPL2a, 2b, 2c and 3 was performed using SPPL and SPPL glycosylation mutants expressed in tissue culture HeLa cells. We demonstrated that their N-terminal extensions are located in the extracellular space and, with the exception of SPPL3, modified with N-glycans. While SPPL2a, 2b, and 2c contain a signal sequence, SPP and SPPL3 contain a type I signal anchor sequence for initiation of protein translocation and membrane insertion. The hydrophilic loops joining the transmembrane regions, which contain the catalytic residues, are facing the exoplasm. The C-termini of all these proteins are exposed toward the cytosol.

We further demonstrate by immunostaining that SPP is localized in the ER, and SPPL2b predominantly at the plasma membrane. For SPPL2c, we found localization in the ER, whereas for SPPL3 localization was observed in the Golgi. SPPL2a was shown to localize to late endosomes. These results indicate that each main compartment along the secretory pathway is equipped with an SPP-type protease with the potential to promote intramembrane proteolysis of type II anchored substrates.

With information about potential substrate preferences, we selectively searched for candidate substrates of the SPPLs. In the present work, we demonstrate that the candidate intramembrane-cleaving proteases SPPL2a and SPPL2b are proteolytically active enzymes, capable to catalyze intramembrane cleavage of type II anchored stubs of shedded TNF $\alpha$  and FasL. Since regulated intramembrane proteolysis (RIP) in mammals seemed so far limited to type I anchored substrates, with the exception of a few signaling factors activated by the Golgi localized

---

metalloprotease S2P, the finding presented in this study is the first demonstrating that also type II anchored cell surface receptors and ligands can exhibit direct signaling through RIP. Therefore similar to presenilin/ $\gamma$ -secretase, SPPL2a and SPPL2b may have a broad substrate spectrum.

We have further identified for the first time that in monocyte derived human DCs the RIP of TNF $\alpha$  triggers the expression of the pro-inflammatory cytokine IL-12, which is a critical factor for inducing the differentiation of Th1 cells and Th1-mediated adaptive immunity, therefore we assume the two proteases SPPL2a and SPPL2b occupy a central role in the human immune system. Inhibition of these proteases may be relevant for the repression of immune responses in autoimmune diseases, and other pathological conditions involving activation of the immune system.

Using TNF $\alpha$  and FasL to investigate the mechanism of SPPL2a/-2b cleavage, we showed that the cleavage of substrates by SPPL2a/-2b is similar to the  $\gamma$ -secretase/presenilin cleavages of APP.

---

## Zusammenfassung

Intramembranproteasen spalten Proteine innerhalb ihrer Transmembranregionen in der Fläche der Lipid Doppelschicht. Diese Spaltung setzt Fragmente von membrangebundenen Vorläuferproteinen frei, welche typischerweise Funktionen abwärts durchführen so wie zum Beispiel zelluläre Signalübertragung und Regulation, Immunüberwachung und intrazelluläre Kommunikation. Drei Familien von Metallo-, Serin-, und Aspartatproteasen, die Intramembranspaltung durchführen, sind heute bekannt. Presenilin und die kürzlich identifizierte Signal Peptid Peptidase (SPP) gehört zur Familie der GXGD Aspartat-Intramembranproteasen.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit den Signal Peptid Peptidase-ähnlichen Proteinen (SPPLs), die kürzlich im humanen Genom identifiziert wurden. Wir führten eine vergleichende Analyse der Topologie der SPP Protease und ihrer humanen Homologen, SPPL2a, 2b, 2c und 3 mit Hilfe von SPPL und SPPL glycosylierten Mutanten, die in Zellkultur HeLa Zellen exprimiert wurden, durch. Wir konnten zeigen, dass sich ihre N-terminalen Verlängerungen im extrazellulären Raum befinden und mit Ausnahme von SPPL3 mit N-Glykanen modifiziert sind. Während SPPL2a, 2b und 2c eine Signalsequenz enthalten, besitzen SPP und SPPL3 eine Typ I Signalankersequenz für die Initiation der Proteintranslokation und Membraninsertion. Die hydrophilen Schleifen, die die Transmembranregionen verknüpfen, enthalten die katalytischen Reste und sind dem Cytosol zugewandt.

Weiterhin zeigen wir mit Immunfärbung, dass sich SPP im ER und SPPL2b vorrangig in der Plasmamembran befinden. SPPL2c ist im ER lokalisiert, wohingegen SPPL3 im Golgi gefunden wird. SPPL2a fanden wir in späten Endosomen. Aus diesen Ergebnisse kann man folgern, dass jedes Hauptkompartiment im sekretorischen Weg mit einer Protease des SPP-Typs ausgestattet ist, welche das Potential hat, Typ-II-verankerte Substrate in der Membran zu spalten.

Mit Informationen über potentielle Substratpräferenzen suchten wir selektiv nach Substratkandidaten der SPPLs. In dieser Arbeit zeigten wir, dass die potentiellen Intramembranproteasen SPPL2a und SPPL2b proteolytisch aktive Enzyme sind. Sie sind in der Lage, die Intramembranspaltung von Typ-II-verankerte Stümpfen der Proteine TNF $\alpha$  und FasL zu katalysieren, die zuvor bereits ausserhalb der Membran gespalten wurden. Mit der Ausnahme von einigen Signalfaktoren, die von der im

---

Golgi lokalisierten S2P-Protease aktiviert werden, schien RIP in Säugetieren bis jetzt auf Typ-I-verankerte Substrate limitiert zu sein. In dieser Arbeit wurde daher das erste Mal gezeigt, dass auch Zelloberflächenrezeptoren und Liganden des Typs II Signale durch RIP direkt übertragen können. Deshalb könnten SPPL2a und SPPL2b wahrscheinlich ähnlich wie Presenilin/ $\gamma$ -Sekretase ein breites Substratspektrum haben.

Zusätzlich erkannten wir zum ersten Mal überhaupt, dass durch die RIP von  $\text{TNF}\alpha$  in Monocyten, die von human DCs abstammen, die Expression von IL-12 ausgelöst wird. IL-12 ist ein kritischer Faktor, welcher die Differenzierung pro-inflammatorischer Th1 Zellen und die Th1-abhängige adaptive Immunantwort induziert. Wir nehmen deshalb an, dass die zwei Proteasen SPPL2a und SPPL2b eine wichtige Rolle im humanen Immunsystem spielen. Die Inhibierung dieser Proteasen könnte für die Unterdrückung des Immunsystems in Autoimmunerkrankungen und anderen pathologischen Zuständen, in die das Immunsystem einbezogen ist, wichtig sein.