

## Kurzzusammenfassung

C-Type Lectin Domain Family 3 Member A (CLEC3A) ist ein knorpelspezifisches Protein, das sowohl im artikulären Knorpel als auch in der Epiphysenfuge vorkommt. Aufgrund seiner Fähigkeit, die Tissue-Type Plasminogen Activator-vermittelte Aktivierung von Plasminogen *in vitro* zu beschleunigen, wird vermutet, dass CLEC3A eine Rolle im Gewebeumbau und der enchondralen Ossifikation spielt. Weitere *in vitro*-Experimente konnten bisher zeigen, dass exogenes CLEC3A die Osteoblastogenese von mesenchymalen Stammzellen stimuliert und die Chondrogenese fördert. Zur näheren Untersuchung der zugrundeliegenden physiologischen Funktion wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine CRISPR/Cas9-vermittelte CLEC3A-Knockout (KO)-Maus generiert. Es erfolgte die Untersuchung des generellen und skelettalen Phänotyps der Mäuse im Alter von sechs Wochen und sechs Monaten. Darüber hinaus wurden Knorpelextrakte aus den Femora neugeborener Mäuse mittels Proteomanalyse analysiert. Die KO-Mäuse wiesen im Vergleich zum Wildtyp (WT) keine Auffälligkeiten in ihrem Verhalten und ihrem generellen Phänotyp auf. Bei den weiblichen KO-Mäusen im Alter von sechs Wochen zeigte sich eine leichte Retardierung des Wachstums des Femurs. Ferner zeigte sich eine leichte Minderung der Fläche der Kortikalis. Hierdurch hielten die Knochen bis zum Bruch einer geringeren Kraft stand und wiesen eine geringere Steifigkeit im Vergleich zu den WT-Mäusen auf. Dieser Effekt normalisierte sich jedoch mit zunehmendem Alter der Mäuse. CLEC3A konnte im Kniegelenk und im Sternum in der Epiphysenfuge und im artikulären Knorpel nachgewiesen werden. Die Expression nahm mit Zunahme des Alters ab. Ein Unterschied in der Morphologie der Epiphysenfuge und des artikulären Knorpels der CLEC3A-KO-Maus im Vergleich zur WT-Maus ließ sich in der männlichen Maus nicht feststellen. Des Weiteren konnte keine gesteigerte Anfälligkeit für eine Arthrose in der CLEC3A-KO-Maus festgestellt werden. Es zeigte sich eine gesteigerte Extrahierbarkeit des Tissue-Type Plasminogen Activators in den CLEC3A-KO-Mäusen. In der Proteomanalyse konnte keine Änderung der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix des Knorpels festgestellt werden. Zusammenfassend führte der KO von CLEC3A bei weiblichen Mäusen im Alter von sechs Wochen zu einer milden Wachstumsstörung des Femurs, die mit steigendem Alter kompensiert wurde. Dies und die verminderte Expression des Proteins mit steigendem Alter sprechen für eine Rolle von CLEC3A in der skelettalen Entwicklung.

Im Rahmen der durch das Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Type 2 (SARS-CoV-2) ausgelösten Pandemie wiesen erste Beobachtungen darauf hin, dass die Einnahme von Vitamin D den Krankheitsverlauf der Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) positiv beeinflussen kann. Es wurde vermutet, dass dieser Effekt mit der verstärkten Expression des antimikrobiellen Peptids (AMP) LL-37 zusammenhängt. Eine antivirale Wirkung von AMPs wird häufig über eine Bindung an virale Oberflächenproteine vermittelt. Daher erfolgte im Rahmen dieser Arbeit eine Untersuchung der Bindung von LL-37 an rekombinant exprimiertes SARS-CoV-2 Spike-Glykoprotein (Spike) und Open Reading Frame 8 Protein (ORF8). Hierbei konnte mittels Oberflächenplasmonenresonanz-spektroskopie und Ko-Affinitätsaufreinigung die Bindung von LL-37 an Spike nachgewiesen werden. Ferner konnte gezeigt werden, dass LL-37 die Bindung von Spike an seinen zellulären Rezeptor human Angiotensin Converting Enzyme (hACE2) *in vitro* hemmen kann. Außerdem ließ sich mit Hilfe der Elektronenmikroskopie die Bindung von bis zu sieben LL-37-Molekülen an Spike sichtbar machen. Darüber hinaus konnte ebenso die Bindung von zwei LL-37-Molekülen an ORF8 nachgewiesen werden. Da ORF8 mit einer effizienten Erregerübertragung assoziiert ist, könnte die Bindung von LL-37 an ORF8 dessen Wirkung abschwächen und dadurch eventuell zu einer geringeren Infektiosität von SARS-CoV-2 und einem weniger schweren Verlauf von COVID-19 führen.

Die CLEC3A-basierenden AMPs Ex1 und Ex12 weisen eine strukturelle Ähnlichkeit zu LL-37 auf. Folglich wurde ebenso eine Untersuchung der Bindung von Ex1 und Ex12 an Spike und ORF8 mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie und Elektronenmikroskopie durchgeführt. Beide Proteine waren hierbei in der Lage an Spike zu binden. Zusätzlich konnte mittels Elektronenmikroskopie gezeigt werden, dass mehrere Moleküle Ex1 und Ex12 an Spike binden. Der Vergleich der Ergebnisse mit den Kontrollpeptiden lässt erste Hinweise auf den Bindungsmechanismus zu. Offenbar ist die positive Ladung der Peptide für die Bindung an Spike essenziell und die zusätzliche amphipathische alpha-Helix von Ex12 scheint die Bindungseigenschaft des Peptids positiv zu beeinflussen. Die Bindungsaffinität für die Bindung von Ex1 bzw. Ex12 an Spike sind vergleichbar mit der Bindungsaffinität von LL-37 an Spike. Für LL-37 ließ sich nachweisen, dass die Bindung von LL-37 an Spike stark genug ist, um eine Bindung von Spike an hACE2 zu inhibieren. Insofern kann davon ausgegangen werden, dass Ex1 und Ex12 ebenfalls in der Lage sind die Bindung von Spike an hACE2 zu inhibieren. Ferner waren Ex1 und Ex12 auch in der Lage an ORF8 zu binden. Da Spike und ORF8 stark glykosylierte Proteine sind, wäre eine Bindung der positiv geladenen Peptide an die Glykane von Spike und ORF8 denkbar. Da viele Virusproteine stark glykosyliert sind, könnte die Bindung von AMPs an die Glykane viraler Proteine ein genereller Mechanismus der antiviralen Wirkung von AMPs sein.