

ABSTRACT

Communication between cells and tissues in response to environmental cues is vital for any organism and accomplished via secreted soluble proteins and extracellular vesicles (EVs). These membrane-bound containers encapsulate all kinds of biomolecules, facilitating long-term and long-distance exchange of information and resemble the basic concept of life. This is mediated by secreted proteins via classical or non-classical secretory pathways. Macrophages play a crucial role in the innate immune system, being at the crossroads of inflammation, antigen presentation and tissue repair such as the skin via crosstalk to dermal fibroblasts. In this thesis, I investigated the macrophages' *de novo* synthesized protein repertoire following pro-inflammatory (M1) and anti-inflammatory (M2) polarization using bone marrow-derived macrophages (BMDMs) expressing a mutant variant of the methionyl-tRNA synthetase (MetRS*) in the ROSA26 locus. By replacing methionine with the azide-bearing non-canonical amino acid azidonorleucine (ANL), newly synthesized proteins are traceable via bio-orthogonal non-canonical amino acid tagging (BONCAT) after copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition ("click chemistry"). Following affinity purification, newly synthesized proteins of the proteome, secretome including EVs of the BMDMs were investigated via mass spectrometry (LC-MS). Doing so, 544 *de novo* proteins in the whole cell, 136 *de novo* proteins in the secretome, and 38 *de novo* proteins in EVs were detected and respectively showed an increased abundance (\log_{10} p-value > 1.3; \log_2 difference >1) during M1 and M2 polarization. While M1 polarization induced the expression of inflammatory effectors, the M2 polarization led to extended expression of anti-inflammatory proteins and proteins, which are involved in tissue repair. Impressively, co-culture experiments of BMDMs with primary, dermal fibroblasts revealed protein uptake in dermal fibroblasts, including ribosomal proteins, RNA-binding proteins, and immune regulatory proteins such as the interferon-induced proteins IFIT1 and IFI205A and the tryptophanyl-tRNA synthetase 1 (WARS1), which may contribute to fibroblasts behavior and inflammatory responses. Conversely, paracrine signaling from M2-polarized BMDMs to dermal fibroblasts seems to secrete proteins associated with healing and ECM remodeling. Moreover, by combining stable amino acids in cell culture (SILAC) labeling with ANL labeling, a large number of potential candidates involved in macrophage-fibroblast communication were identified. Overall, the study provides novel and valuable insights into protein dynamics during macrophage polarization and how their secretomes and EVs communicates information towards fibroblasts to induce cell death or tissue repair and wound healing programs in the skin.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Kommunikation zwischen Zellen und Geweben als Reaktion auf Umweltreize ist für jeden Organismus lebenswichtig und erfolgt über sekretierte Proteine und extrazelluläre Vesikel (EVs). In EVs sind alle Arten von Biomolekülen eingekapselt, die einen langfristigen und weichtreichenden Informationsaustausch ermöglichen. Sekretion von Proteinen geschieht über klassische und nicht-klassische Sekretionswege. Makrophagen spielen eine entscheidende Rolle im angeborenen Immunsystem, da sie an der Schnittstelle zwischen Entzündung, Antigenpräsentation und Gewebereparatur stehen, wie z.B. in der Haut durch die Kommunikation mit dermalen Fibroblasten. In dieser Arbeit untersuchte ich das *de novo* synthetisierte Proteinrepertoire der Makrophagen nach pro-inflammatorischer (M1) und anti-inflammatorischer (M2) Polarisierung unter Verwendung von aus Knochenmark stammenden Makrophagen (BMDMs), die eine mutierte Variante der Methionyl-tRNA-Synthetase (MetRS*) im ROSA26-Locus exprimieren. Durch den Austausch von Methionin mit der azid-haltigen nicht-kanonischen Aminosäure Azidonorleucin (ANL) sind neu synthetisierte Proteine über bio-orthogonales nicht-kanonisches Aminosäure-Tagging (BONCAT) nach kupferkatalysierter Azid-Alkin-Cycloaddition („Klick-Chemie“) nachweisbar. Nach der Affinitätsreinigung wurden die neu synthetisierten Proteine des Proteoms, Sekretoms und der EVs von BMDMs mittels Massenspektrometrie (LC-MS) untersucht. Dabei wurden 544 *de novo* Proteine im Proteom, 136 *de novo* Proteine im Sekretom und 38 *de novo* Proteine in EVs detektiert, die während der M1- und M2-Polarisation jeweils eine erhöhte Abundanz ((log₁₀ p-Wert > 1.3; log₂ Differenz >1) aufwiesen. Während die M1-Polarisierung die Expression von Entzündungseffektoren induzierte, führte die M2-Polarisierung zu einer verstärkten Expression von entzündungshemmenden Proteinen und Proteinen, die an der Gewebereparatur beteiligt sind. Beeindruckend ist, dass Co-Kultur-Experimente von BMDMs mit primären dermalen Fibroblasten die Aufnahme von Proteinen in dermale Fibroblasten zeigten, darunter ribosomale Proteine, RNA-bindene Proteine und immunregulatorische Proteine wie die Interferon-induzierten Proteine IFIT1 und IFI205A und die Trypophanyl-tRNA-Synthetase 1 (WARS1), die möglicherweise zum Verhalten der Fibroblasten und zu Entzündungsreaktionen beitragen. Umgekehrt scheinen parakrine Signale von M2-polarisierten BMDMs an dermalen Fibroblasten Proteine zu sezernieren, die mit der Heilung und dem Umbau der ECM in Verbindung stehen. Darüber hinaus wurde durch die Kombination von stabilen Aminosäuren in Zellkultur (SILAC) und ANL-Markierung eine große Anzahl potenzieller Kandidaten identifiziert, die an der Kommunikation zwischen Makrophagen und Fibroblasten beteiligt sind. Insgesamt bietet diese Arbeit neue und wertvolle Einblicke in die Proteindynamik während der

Makrophagenpolarisierung und die Art und Weise, wie ihr Sekretom und ihre EVs Informationen an Fibroblasten weitergeben, um Zelltod oder Gewebereparatur- und Wundheilungsprogramme in der Haut zu induzieren.