

**IDENTIFIZIERUNG UND FUNKTIONELLE
CHARAKTERISIERUNG VON TRANSFERRINREZEPTOR-
SHEDDINGPROTEASEN**

Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
am Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie
der Freien Universität Berlin

Matthias Kaup

Berlin 2002

Die praktischen Arbeiten für die hier vorliegende Dissertation wurden am Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie (Leiter: Prof. Dr. R. Tauber, Arbeitsgruppe Dr. H. Fuchs) des Universitätsklinikums Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin durchgeführt.

Die in dieser Dissertation verwendeten geschützten Warenzeichen sind nicht als solche gekennzeichnet. Aus dem Fehlen einer Kennzeichnung kann folglich nicht geschlossen werden, dass der entsprechende Produktname frei von Rechten Dritter ist.

1. Gutachter: Prof. Dr. R. Tauber

2. Gutachter: PD Dr. M. Ziegler

Tag der Disputation: 06. März 2003

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
1 ZUSAMMENFASSUNG	1
SUMMARY	3
2 EINLEITUNG	5
2.1 Biologische Bedeutung von Eisen	5
2.2 Eisenmetabolismus	5
2.3 Der Transferrinrezeptor	7
2.3.1 Struktur des Transferrinrezeptors	7
2.3.2 Regulation der Eisenaufnahme durch den TfR.....	8
2.3.2.1 TfR-Regulation durch Hormone und synthetische Reagenzien	8
2.3.2.2 TfR-Regulation durch das <i>iron regulatory protein</i>	9
2.3.2.3 Regulation der Eisenaufnahme durch HFE	10
2.4 Der Transferrinrezeptor-2	10
2.5 Shedding	11
2.5.1 Sheddingproteasen.....	11
2.5.2 Regulation des Sheddings.....	12
2.5.3 Funktionen des Sheddings	13
2.5.4 TfR-Shedding	16
2.5.4.1 Der Serumtransferrinrezeptor	16
2.5.4.2 TfR-Sheddingprotease	16
2.5.4.3 Lokalisierung des TfR-Sheddings	17
2.5.4.4 Regulation des TfR-Sheddings.....	18
2.6 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	18
3 ERGEBNISSE	20
3.1 Isolierung und Identifizierung TfR-spaltender Proteasen aus Leukozyten	20
3.1.1 Immunpräzipitation von sTfR aus HL60- und U937-Zellkulturüberstand.....	20
3.1.2 TfR-Verdauassay	22
3.1.3 Reinigung TfR-spezifischer Proteasen	23
3.2 Charakterisierung einer bei Arg-100 TfR-spaltenden proteolytischen Aktivität.....	31
3.2.1 Nachweis von TfR-Fragmenten in HL60-Zellmembranen	31
3.2.2 TfR-Freisetzungassay	32
3.2.3 pH-Abhängigkeit des TfR-Sheddingprozesses.....	34
3.2.4 Integral vermittelte Membranverankerung.....	35
3.2.5 Inhibition der TfR-Sheddingprotease	36

3.2.6	Solubilisierung der sTfR-Freisetzungaktivität.....	40
3.3	TfR-Shedding durch leukozytäre Zelllinien	41
3.3.1	Inhibition des TfR-Sheddings.....	42
3.3.2	Regulation des TfR-Sheddings.....	43
3.3.3	Lokalisierung des TfR-Sheddings	43
4	DISKUSSION	46
4.1	Isolierung und Charakterisierung TfR-spezifischer Serinproteasen.....	46
4.2	Charakterisierung einer bei Arg-100 TfR-spaltenden Metalloprotease.....	50
4.3	Analyse des alternativen sTfR	53
4.4	TfR-Shedding durch leukozytäre Zelllinien	55
4.5	Lokalisierung des TfR-Sheddings	56
4.6	Ausblick.....	58
5	MATERIAL	60
5.1	Geräte.....	60
5.1.1	Elektrophorese und Elektrophoretogramm.....	60
5.1.2	Zellkultur	60
5.1.3	Zentrifugen	60
5.1.4	Chromatographie	60
5.1.5	ELISA.....	60
5.1.6	Sonstige Geräte.....	60
5.2	Verbrauchsmaterial.....	61
5.3	Zellkulturmaterial	61
5.4	Chemikalien.....	61
5.5	Proteaseinhibitoren	62
5.6	Antikörper.....	63
5.6.1	Primärantikörper.....	63
5.6.2	Sekundärantikörper.....	63
5.7	Weitere Proteine	63
5.8	Zelllinien.....	64
6	METHODEN	65
6.1	Zellbiologische Methoden	65
6.1.1	Kultivierung leukämischer Zelllinien.....	65
6.1.2	Solubilisierung von Zellen	65
6.1.3	Inhibition des TfR-Sheddings leukozytärer Zelllinien	65
6.1.4	Stimulierung des TfR-Sheddings verschiedener leukozytärer Zelllinien.....	66

6.1.5	Markierung von Zelloberflächenproteinen mit Biotin.....	66
6.2	Proteinbiochemische Methoden.....	66
6.2.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	66
6.2.2	Lyophilisierung von Proteinen	67
6.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	67
6.2.4	Nachweis von Proteinen in der SDS-PAGE mit Silberfärbung	68
6.2.5	Westernblot.....	68
6.2.5.1	Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen.....	68
6.2.5.2	Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen	69
6.2.6	Immunpräzipitation	70
6.2.6.1	Immunpräzipitation von TfR und sTfR.....	70
6.2.6.2	Immundepletion von Neutrophiler Elastase aus A80-aktiven Fraktionen.....	70
6.2.7	Membranpräparation aus HL60- und U937-Zellen.....	71
6.2.8	TfR-Verdauassay	71
6.2.9	<i>ProteaseSpot</i> -Assay.....	71
6.2.10	sTfR-Freisetzungssassay	72
6.2.11	sTfR-ELISA	73
6.3	Chromatographische Methoden.....	74
6.3.1	Anionenaustauschchromatographie.....	74
6.3.2	Hydrophobe-Interaktionschromatographie.....	75
7	GLOSSAR	76
7.1	sTfR-Terminologie	76
7.2	Schnittstellenspezifität von Proteasen	76
8	LITERATURVERZEICHNIS	77
9	ANHANG	95
	Veröffentlichungen	95
	Lebenslauf.....	97
	Danksagung	98

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACE	<i>angiotensin converting enzyme</i>
APP	<i>amyloid precursor protein</i>
ADAM	<i>a disintegrin and metalloprotease</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Bis-Tris	2,2-Bis-(Hydroxyethyl)-(iminotris)-(hydroxymethyl)methan
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
°C	Grad Celsius
H ₂ O _{Elix}	Deionisiertes Wasser (Qualität entspricht zweifach destilliertem Wasser)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth factor</i>)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCI	Furinconvertaseinhibitor
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
g	Erdbeschleunigung
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
h	Stunde
HB-EGF	Heparinbindender Epidermaler Wachstumsfaktor
HER-2	Humaner Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor-2
HIC	Hydrophobe-Interaktionschromatographie
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
M	molar (Mol pro Liter)
mA	Milliampere
mAb	Monoklonaler Antikörper (<i>monoclonal antibody</i>)
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption ionisation time-of-flight</i>
mfTfR	Membranfragment des Transferrinrezeptors
MG	Molekulargewicht
MM	mikrosomale Membranfraktion
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
MT-MMP	Membranständige Matrixmetalloproteinase (<i>membrane-type MMP</i>)

NADH	Nicotinamidadenindinucleotid
NP-40	Nonidet P-40
pAb	Polyklonaler Antikörper (<i>polyclonal antibody</i>)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PIC	Proteaseinhibitor-Cocktail
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-N-myristat-13-acetat
PP	Probenpuffer
RAM	Anti-Maus IgG-Antikörper aus Kaninchen (<i>rabbit anti-mouse</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S.A.M.	Standardabweichung des Mittelwertes
SAR	Anti-Kaninchen IgG-Antikörper aus Schwein (<i>swine anti-rabbit</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
sTfR	löslicher (<i>soluble</i>) Transferrinrezeptor (siehe auch Glossar, Kapitel 7)
TACE	<i>tumor necrosis factor α converting enzyme</i>
TAPI	TNF α -Proteaseinhibitor-2
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TfR	Transferrinrezeptor
TGF α	Transformierender Wachstumsfaktor (<i>transforming growth factor</i>)
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TRANCE	<i>TNF-related activation-induced cytokine</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	t-Oktylphenoxypolyethoxyethanol
Tween-20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	Einheit(en) (<i>unit(s)</i>)
(v/v)	Volumenanteil am Gesamtvolumen
(w/v)	Gewichtsanteil am Gesamtvolumen