

1 ZUSAMMENFASSUNG

Der Transferrinrezeptor (TfR) ist ein Typ II-Transmembranprotein, das die Aufnahme von extrazellulären Eisenionen in das Zellinnere vermittelt. Die transferrinbindende, extrazelluläre Domäne des TfR kann im Bereich eines molekularen Abstandshalters (*Stalk*) zwischen Arg-100 / Leu-101 durch eine Protease von der Membran abgespalten und als so genannter löslicher (*soluble*) Transferrinrezeptor (sTfR₁₀₁) in den extrazellulären Raum freigesetzt werden. Obgleich die Serumkonzentration dieses sTfR₁₀₁ unter bestimmten pathophysiologischen Bedingungen verändert sein kann und bei Eisenmangelerkrankungen als diagnostischer Parameter Verwendung findet, sind die molekularen Grundlagen dieses Prozesses noch weitestgehend unverstanden – insbesondere ist die Identität der beteiligten Sheddingprotease(n) unbekannt.

In der vorliegenden Arbeit konnten zwei Proteasen, die den humanen TfR spezifisch im *Stalk*-Bereich schneiden, aus Zellmembranen der leukozytären Zelllinie U937 gereinigt und als Neutrophile Elastase und Cathepsin G identifiziert werden. Mittels N-terminaler Sequenzierung konnte für Neutrophile Elastase die Schnittstelle am TfR zwischen Val-108 / Arg-109 bestimmt werden, während für Cathepsin G eine Schnittstelle zwischen Lys-95 / Thr-96 ermittelt wurde. Diese alternativen Schnittstellen befinden sich folglich nur wenige Aminosäuren von der Hauptschnittstelle entfernt und sind bisher nicht beschrieben worden. Die Vermutung, dass alternative Schnittstellen des TfR von Proteasen möglicherweise auch *in vivo* genutzt werden, wird durch die Beobachtung dieser Arbeit nahegelegt, dass im Überstand der U937-Zellen zwei sTfR-Formen detektiert wurden, die sich in der apparenten molekularen Masse geringfügig unterscheiden. Der N-Terminus der sTfR-Form mit der höheren molekularen Masse wurde durch Aminosäuresequenzierung zu Glu-111 bestimmt.

Aus dem Kulturüberstand der leukozytären Zelllinie HL60 wurde dagegen ein sTfR isoliert, dessen N-Terminus mit Leu-101 beginnt und somit identisch ist mit der Hauptform des sTfR, der natürlicherweise im humanen Serum vorkommt (sTfR₁₀₁). In einer mikrosomalen Membranfraktion dieser sheddingaktiven HL60-Zellen konnte erstmals die Existenz aller sechs theoretisch beim Sheddingprozess auftretenden TfR-Formen nachgewiesen werden. Von diesen TfR-Formen wurde als einziges ein 80 kDa großes TfR-Fragment nach Inkubation der Membranen bei 37 °C von diesen freigesetzt, und die Identität dieses löslichen TfR-Fragmentes mit dem sTfR₁₀₁ wurde mittels N-terminaler Sequenzierung verifiziert. Die für diesen Nachweis durchgeführte Isolierung des sTfR₁₀₁ mittels einer Affinitätschromatographie an Transferrinsepharose zeigte, dass von HL60-Zellmembranen freigesetzter sTfR₁₀₁ seine transferrinbindende Funktion immer noch auszuüben vermag.

Die Freisetzung des sTfR₁₀₁ aus den HL60-Zellmembranen zeigt die Existenz der für die Spaltung bei Arg-100 verantwortlichen TfR-Sheddingprotease in diesen Membranen an. Diese Beobachtung wurde zur Etablierung eines Assays genutzt, mit dessen Hilfe erstmals die

bei Arg-100 spaltende TfR-Sheddingprotease näher charakterisiert werden konnte: (i) Bei der TfR-Sheddingprotease handelt es sich um ein integrales Membranprotein. (ii) Der Sheddingprozess ist abhängig von einer intakten Membranstruktur. (iii) Die Protease ist inaktiv im sauren pH-Bereich und besitzt ein Optimum bei pH 7,5. (iv) Die Protease wird vermutlich durch Furin oder eine furinähnliche Protease aktiviert. (v) Die Protease zählt zu der Klasse der Metalloproteasen, vermutlich aus der Familie der ADAMs (*a disintegrin and metalloprotease*). (vi) TACE / ADAM-17 kann als TfR-Sheddingprotease ausgeschlossen werden, da die Protease durch TIMP-1 (*tissue inhibitor of metalloproteinases*), aber nicht TIMP-2 oder TIMP-3 inhibiert wurde.

Zur Untersuchung des TfR-Sheddings durch leukozytäre Zelllinien wurde ein ELISA optimiert, mit dessen Hilfe sTfR spezifisch im Kulturüberstand der Zellen detektiert und quantifiziert wurde. Diese Untersuchungen zeigten, dass die Ergebnisse aus den Inhibitionsversuchen, die mit Hilfe des Membranassays gewonnen wurden, auf das Zellsystem übertragen werden können. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass der Freisetzungsprozess des sTfR₁₀₁ in den Zellen konstitutiv abläuft, und als einziges, eindeutig das TfR-Shedding stimulierende Reagenz wurde der Tyrosinphosphataseinhibitor Pervanadat ermittelt.

Da die Lokalisierung des TfR-Sheddingprozesses umstritten ist, wurden zur Klärung dieser Frage Biotinylierungsexperimente an leukozytären Zelllinien durchgeführt. Diese Untersuchungen zeigten eindeutig, dass der TfR zunächst auf der Zelloberfläche erscheinen muss, bevor er dem Sheddingprozess unterliegt – folglich nicht bereits auf dem Biosyntheseweg gespalten wird. Da die induzierte Internalisierung des TfR mittels des Phorbolesters PMA keinen reduzierenden Einfluss auf das Shedding der Zelllinien zeigte, kann die Plasmamembran der Zellen als Ort des Sheddings vermutlich ausgeschlossen werden. Auch der endosomale Recyclingweg erscheint aus den Ergebnissen dieser Arbeit unwahrscheinlich, da die TfR-Sheddingprotease nicht im sauren pH-Bereich aktiv ist. Somit wird der TfR vermutlich auf seinem retrograden Transport zum Golgi, der von einem Teil der TfR-Moleküle beschriftet wird, oder seinem Weg von dort zurück zur Zelloberfläche gespalten.

Auf der Grundlage der hier vorgestellten Ergebnisse wird es nun möglich sein, einerseits die Prinzipien des TfR-Sheddingprozesses und seine Bedeutung für den Eisenstoffwechsel zu verstehen und für weitergehende Untersuchungen zu nutzen und andererseits das TfR-Shedding in einen Zusammenhang mit den Sheddingprozessen anderer Membranproteine zu setzen, so dass die Erkenntnisse über die vielfältigen Sheddingprozesse ergänzt und besser verstanden werden können.

SUMMARY

The transferrin receptor (TfR) is a type II transmembrane protein that mediates the cellular uptake of iron. The transferrin-binding extracellular domain of the receptor is cleaved in the stalk region between Arg-100 / Leu-101 by a protease and released as soluble TfR (sTfR₁₀₁) into the extracellular space. Although the serum concentration of sTfR₁₀₁ is altered in certain diseases and used to diagnose iron deficiency anemia, the molecular basis of this process is largely unknown – in particular the identity of the protease involved is unknown.

In the present work two proteases, which specifically cleave the human TfR in the stalk region, were isolated from cell membranes of the leukocytic cell line U937 and identified as neutrophil elastase and cathepsin G. The cleavage sites were determined by N-terminal sequencing to be Val-108 / Arg-109 for neutrophil elastase and Lys-95 / Thr-96 for cathepsin G. These cleavage sites are in the near vicinity of the major cleavage site and have not been previously described. The assumption that alternative cleavage sites are present *in vivo* is supported by the observation of this work that two sTfR types occur in the supernatant of U937 cells which differ slightly in their apparent molecular mass. The N-terminus of the sTfR with the higher molecular mass was determined to be Glu-111.

In contrast the N-terminus of the sTfR isolated from HL60 cell culture supernatant was shown to start with Leu-101, thus identical to the major type of sTfR found in human serum (sTfR₁₀₁). For the first time all six theoretical TfR-fragments that may be generated during shedding could be identified in a microsomal membrane preparation from HL60 cells. After incubation of the membranes at 37 °C only the 80 kDa TfR-fragment was shed and was shown to be identical to the sTfR₁₀₁ by N-terminal sequencing. The sTfR derived from incubated HL60 membranes could be purified on transferrin-sepharose illustrating that sTfR₁₀₁ retains its transferrin-binding capacity.

The release of sTfR₁₀₁ from HL60 membrane preparations after incubation at 37 °C suggested that the membranes contain a protease responsible for TfR shedding. This observation was used to establish an assay with which the protease that sheds the sTfR could be characterised (i) the protease is anchored to the membrane by an integral domain, (ii) TfR-shedding depends on an intact membrane structure, (iii) the protease is inactive at acidic pH with an optimum at pH 7.5, (iv) the protease is probably activated by furin or a furin-like pro-protein convertase, (v) the protease belongs to the metalloproteases, probably the ADAM-family (a disintegrin and metalloprotease) and (vi) TACE / ADAM-17 can be excluded, since the protease is inhibited by TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinases-1) but not TIMP-2 or TIMP-3.

The TfR-shedding by leukocytic cell lines was determined in a specific ELISA optimised for quantifying sTfR in cell culture supernatant. The investigations revealed that the results of the

inhibition experiments obtained by means of the membrane assay are in agreement with the cell system. Furthermore it was shown that the TfR-shedding process is mediated constitutively and the only reagent tested that stimulates TfR-shedding is the tyrosine phosphatase inhibitor pervanadate.

Since the localisation of TfR-shedding is unresolved, biotinylation experiments with leukocytic cell lines were performed. These experiments clearly show that the TfR must appear at the cell surface before it is shed – thus it is not cleaved during the biosynthetic pathway. The induced internalisation of the TfR by the phorbol ester PMA did not reduce TfR-shedding in the cell lines, the plasma-membrane can thus be excluded as the site of the TfR-shedding event. Furthermore the endosomal recycling pathway may also be excluded since the TfR-shedding protease is not active at acidic pH. The TfR is thus presumably cleaved during its retrograde transport to the Golgi that is used by part of the TfR-molecules, or from the Golgi back to the cell surface.

The results presented in this work on the one hand have contributed to the basic understanding of the principles of the TfR-shedding process and its importance for the iron metabolism and on the other hand relates the TfR-shedding process to that of other membrane proteins. This will contribute to and further our understanding of TfR-shedding in context to other shedding processes.