

## 2 EINLEITUNG

### 2.1 Biologische Bedeutung von Eisen

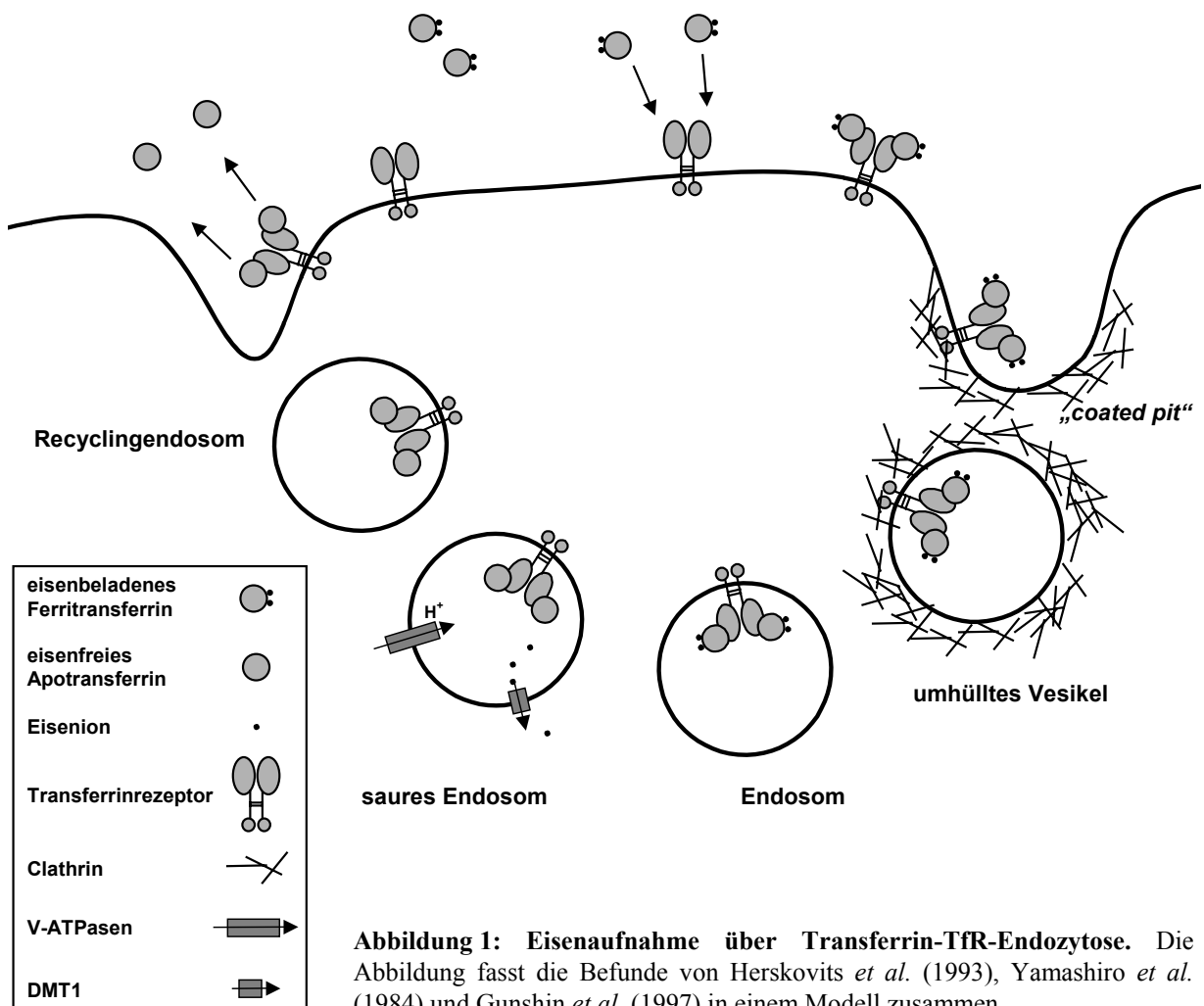
Eisen ist ein essentielles Spurenelement und wird von vielen Enzymen des Organismus zur Ausübung der Funktion benötigt. Da Eisen leicht zwischen seinen Oxidationsstufen +II und +III wechseln kann, wird es von elektronenübertragenden Enzymen der mitochondrialen Elektronentransportkette verwendet. Es bildet in Form von Eisen-Schwefel-Clustern die prosthetischen Gruppen der NADH-Q-Reduktase, der Succinat-Q-Reduktase und der Cytochromreduktase. Durch Komplexierung eines Eisenions an den ringförmigen Porphyrinliganden wird eine zweite Form einer biologisch bedeutsamen Eisenverbindung, das Hämmolekül, gebildet. Dieses stellt eine zweite prosthetische Gruppe der Cytochromreduktase, aber auch weiterer Enzyme der Atmungskette, wie Cytochrom c und Cytochromoxidase, dar. Die Fähigkeit des Hämmoleküls Sauerstoff zu binden, wird von den Proteinen Hämoglobin und Myoglobin ausgenutzt. In den Enzymen Katalase und Peroxidase unterstützt das Hämmolekül dagegen die katalytische Zersetzung von zelltoxischem Wasserstoffperoxid zu Wasser. Eine dritte Form einer Eisenverbindung findet sich im aktiven Zentrum der Ribonukleotidreduktase, die Ribonukleotide zu Desoxyribonukleotiden reduziert und damit eine wichtige Rolle in dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Synthese der DNA spielt. Im aktiven Zentrum dieses Enzyms stabilisieren zwei  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen, die über ein Sauerstoffatom verbrückt sind, das katalytische Zentrum der Ribonukleotidreduktase.

### 2.2 Eisenmetabolismus

Die schnelle Oxidierung von  $\text{Fe}^{2+}$  zu  $\text{Fe}^{3+}$  im wässrigen Milieu erfordert genau aufeinander abgestimmte Transport- und Speichermechanismen für den Eisenmetabolismus im Organismus, da  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen zum einen wesentlich schlechter löslich sind als  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen und zum anderen freie  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen die Bildung von toxischen Sauerstoffradikalen katalysieren. In den Zellen werden Eisenionen effektiv durch die hochmolekularen Proteine Ferritin und Hämosiderin gespeichert, der Eisenanteil im Ferritin beträgt 20 %, welches ungefähr 4000 Eisenionen pro Molekül entspricht, und im Hämosiderin sogar über 30 %. Eisen, welches an Hämosiderin gebunden ist, kann jedoch nur sehr langsam wieder freigesetzt werden, während Eisen aus Ferritin leicht mobilisierbar ist.

Für den geschützten Transport des Eisens im Blut ist das Protein Transferrin zuständig, an welches zwei  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen binden können. Die Aufnahme des eisenbeladenen Transferrins (Ferritransferrin) in die Zellen wird durch den Transferrinrezeptor (TfR) vermittelt. Nach Bindung von Ferritransferrin an den TfR werden die Komplexe internalisiert, indem sich diese zunächst in so genannten *coated pits* sammeln. Das Strukturprotein Clathrin bildet ein

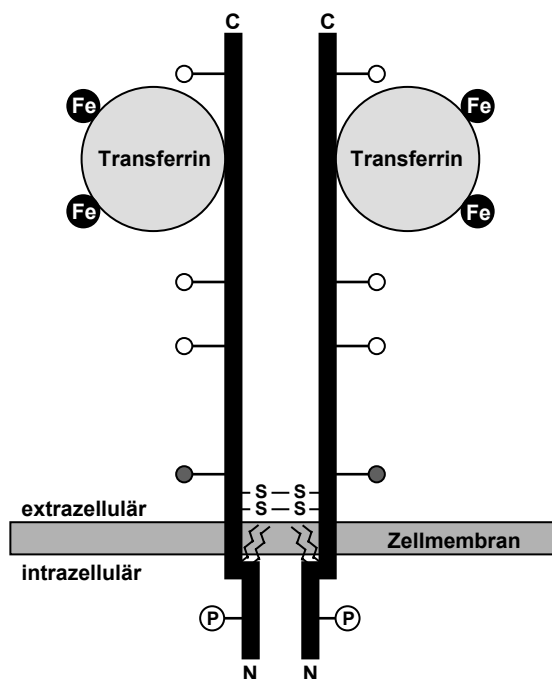
Netz um das *coated pit*, welches durch Dynamin und der Beteiligung zahlreicher weiterer Proteine unter Bildung eines umhüllten Vesikels von der Plasmamembran abgelöst wird (Herskovits *et al.*, 1993). Dieses Vesikel verliert schnell seine Clathrinhülle und wird im weiteren entweder zu einem späten Endosom, welches mit einem primären Lysosom fusioniert oder im retrograden Transport zum Golgi-Komplex wandert, oder es wird durch ATP-abhängige Protonenpumpen (V-ATPasen, *vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPasen*) auf einen pH von 6,3–6,8 angesäuert (Yamashiro *et al.*, 1984; Mellman, 1996). In diesen sauren Endosomen dissoziieren die Fe<sup>3+</sup>-Ionen vom Transferrin ab, werden von einer NADH-abhängigen Ferricyanid-Oxidoreduktase zu Fe<sup>2+</sup>-Ionen reduziert und durch den spezifischen Eisen-transporter DMT1 (*divalent metal transporter 1*) in das Cytosol transferiert (Núñez *et al.*, 1990; Gunshin *et al.*, 1997). Der eisenfreie Transferrin-TfR-Komplex kehrt an die Zelloberfläche zurück, bei pH 7,4 dissoziiert nun das eisenfreie Apotransferrin ins Blut ab und der TfR steht für eine erneute Bindung von eisenbeladenem Ferritransferrin zur Verfügung (Abbildung 1).



## 2.3 Der Transferrinrezeptor

### 2.3.1 Struktur des Transferrinrezeptors

Bereits 1959 konnten Jandl *et al.* (1959) zeigen, dass die Eisenaufnahme von Retikulozyten durch Transferrin abgesättigt werden kann und nach Inkubation der Zellen mit Trypsin inhibiert wird. Diese Beobachtungen führten zur Postulierung eines Zelloberflächenrezeptors für Transferrin. Weitere Untersuchungen zur Isolierung und Charakterisierung des TfR offenbarten den Rezeptor als disulfidverbrücktes Homodimer von 95-kDa-Untereinheiten (Hu und Aisen, 1978; Seligman *et al.*, 1979; Trowbridge und Omary, 1981). Weiterhin zeigten Affinitätsstudien, dass jede Untereinheit ein Transferrinmolekül zu binden vermag (Enns und Sussman, 1981) und die Klonierung des Gens für den humanen TfR bestätigte schließlich die postulierten Strukturmerkmale des TfR (Schneider *et al.*, 1984). Jede Untereinheit wird aus 760 Aminosäuren gebildet, welche sich in eine cytoplasmatische Domäne von 67 Aminosäuren, eine Transmembrandomäne von 21 Aminosäuren und eine extrazelluläre Domäne von 672 Aminosäuren aufteilen lässt. Der N-Terminus befindet sich im Cytosol, so dass man den TfR zu den Typ II-Membranproteinen zählt (Abbildung 2).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung des TfR.** Der TfR ist ein disulfidverbrücktes Homodimer, welches zwei Moleküle eisenbeladenes Transferrin bindet. Der N-Terminus ist zum Cytoplasma orientiert und der C-Terminus zur extrazellulären Seite. Helle Kreise bezeichnen N-Glycane und dunkle Kreise O-Glycane. Zwei cysteingebundene Palmitinsäurereste sind in der Zellmembran integriert (gezackte Linien) und P bezeichnet eine intrazelluläre Phosphorylierungsstelle am Ser-24.

Auf cytosolischer Seite ist an die Aminosäuren Cys-62 und Cys-67 je ein Palmitinsäurerest gebunden, dessen hydrophobe Kette in die Zellmembran hineinragt (Alvarez *et al.*, 1990), und Ser-24 stellt eine Phosphorylierungsstelle für die Proteinkinase C dar (Davis *et al.*, 1986). Extrazellulär befinden sich die beiden intermolekularen Disulfidbrücken Cys-89 und Cys-98 (Jing und Trowbridge, 1987), drei N-Glycane an Asn-251, Asn-317 und Asn-727 (Hayes *et*

*al.*, 1997; Orberger *et al.*, 1992) sowie ein O-Glycan an Thr-104 (Do und Cummings, 1992; Hayes *et al.*, 1992). Dieses O-Glycan am Thr-104 ist folglich in einem Bereich lokalisiert, der als *Stalk* (Cys-89 bis Arg-121) bezeichnet wird und die globuläre extrazelluläre Domäne in einem Abstand von 2,9 nm von der Membran entfernt hält (Fuchs *et al.*, 1998). Die globuläre extrazelluläre Domäne des TfR, beginnend mit Arg-121, wurde kristallisiert und die Struktur mittels Röntgenbeugung bestimmt (Lawrence *et al.*, 1999). Da frühere Strukturuntersuchungen gezeigt haben, dass die disulfidbrückenvermittelnden Aminosäuren Cys-89 und Cys-98 für die Dimerisierung nicht wichtig sind (Alvarez *et al.*, 1989), kristallisierte die extrazelluläre Domäne erwartungsgemäß als Dimer. Das TfR-Dimer hat eine schmetterlingsähnliche Struktur und jedes Monomer kann in drei Domänen eingeteilt werden: eine proteaseähnliche Domäne aus den Aminosäuren Leu-122 bis Val-188 und Ile-384 bis Asp-604, eine apikalen Domäne bestehend aus den Aminosäuren Lys-189 bis Glu-383 und einer helikalen Domäne aus den Aminosäuren Leu-607 bis Glu-760, welche die Dimerisierung der Ektodomäne des TfR bewirkt. Die proteaseähnliche Domäne zeigt enge Verwandtschaft zu Carboxy- und Aminopeptidasen (Chevrier *et al.*, 1996), besitzt jedoch keine proteolytische Aktivität, da ihr die Zn<sup>2+</sup>-komplexierenden Aminosäurereste fehlen.

### **2.3.2 Regulation der Eisenaufnahme durch den TfR**

Da der TfR das zentrale Molekül bei der Aufnahme von extrazellulärem Eisen in das Zellinnere darstellt, sollte die TfR-Expression derart reguliert sein, dass einerseits eine konstante intrazelluläre Eisenkonzentration aufrechterhalten werden kann und andererseits zusätzliches Eisen für Zellproliferation und Erythropoese bereit steht. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass der Anteil des TfR auf der Zelloberfläche sowohl durch konstitutive Expression als auch durch eine Verschiebung im Gleichgewicht zwischen Endo- und Exozytose sowie Rezeptorrecycling beeinflusst wird.

#### **2.3.2.1 TfR-Regulation durch Hormone und synthetische Reagenzien**

Eine Reihe von Faktoren können die Oberflächenexpression des TfR beeinflussen: Hormone und Wachstumsfaktoren wie Insulin, insulinähnliche oder epidermale Wachstumsfaktoren (Davis und Czech, 1986; Tanner und Lienhard, 1987), synthetische Reagenzien wie Phorbol ester (May und Tyler, 1987; Schonhorn *et al.*, 1995), Calciumionophore (Iacopetta *et al.*, 1986), Inhibitoren von calcium- / calmodulinabhängigen Proteinkinasen (Hunt und Marshall-Carlson, 1986), Proteinphosphataseinhibitoren (Beauchamp und Woodman, 1994) oder Mikrotubuliinhibitoren (Jin und Snider, 1993; Thatte *et al.*, 1994). Diese Aufzählung zeigt, dass viele unterschiedliche Faktoren die Zelloberflächenexpression des TfR beeinflussen, jedoch wurde eine Korrelation mit der Eisenaufnahme in nur wenigen Fällen untersucht (Davis und Czech, 1986; Tanner und Lienhard, 1987). Der Einfluss der TfR-Expression auf die Eisenaufnahme ist jedoch unstrittig und die Regulation der

TfR-Expression findet auf verschiedenen Ebenen statt. Faktoren, die einen Einfluss auf Zellwachstum und -differenzierung haben, regulieren die TfR-Expression auf Transkriptionsebene, während die Eisenbeladung der Zelle einen Einfluss auf posttranskriptionaler Ebene ausübt, wie im folgenden Absatz beschrieben wird.

### 2.3.2.2 TfR-Regulation durch das *iron regulatory protein*

In mehreren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass in Zellen mit geringer cytosolischer Eisenkonzentration die Expression des TfR hoch ist, während dagegen bei hoher Eisenkonzentration die TfR-Expression erniedrigt ist. Folglich ist die TfR-Expression entgegengesetzt zur Eisenbeladung der Zellen reguliert (Mattia *et al.*, 1984; Muller-Eberhard *et al.*, 1988). Weitere Untersuchungen konnten zeigen, dass die mRNA des TfR am 3'-Ende fünf hochkonservierte, palindromische Sequenzen trägt. An diese so genannten *iron responsive elements* (IRE) bindet bei geringer Eisenbeladung der Zelle ein cytosolisches Protein (*iron regulatory protein* (IRP)), welches die TfR-mRNA stabilisiert und damit die Expressionsrate des TfR erhöht (Mullner und Kuhn, 1988). Ist die Eisenbeladung der Zelle dagegen hoch, wird die Bindung des IRP an die IRE gelockert und die TfR-mRNA für einen Abbau durch Ribonukleasen zugänglich und degradiert (Seiser *et al.*, 1993). In gleicher Weise wird der Eisentransporter DMT1 reguliert, dessen 3'-mRNA-Ende ebenfalls IRP zu binden vermag (Gunshin *et al.*, 2001).

Dagegen wird die Expression zweier weiterer zentraler Proteine des Eisenstoffwechsels in genau entgegengesetzter Richtung reguliert. Sowohl die mRNA des Eisenspeicherproteins Ferritin als auch die mRNA der  $\delta$ -Aminolävulinat-Synthase (ALAS), die den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Hämsynthese katalysiert, besitzen je ein einzelnes IRE an ihrem 5'-Ende, an das ebenfalls IRP bei niedriger Eisenbeladung der Zelle bindet. In diesem Fall wird die mRNA jedoch nicht stabilisiert, sondern die Translation der mRNA wird inhibiert und die Expression von Ferritin und ALAS somit herabgesetzt. Die Eisenaufnahme durch den TfR, die Eisenspeicherung durch Ferritin und die Eisenverwendung durch die ALAS werden folglich alle über denselben Mechanismus, nämlich über das IRE-IRP-System in Abhängigkeit der Eisenbeladung der Zelle reguliert. Interessanterweise besitzt das IRP unter Eisenbeladung Aconitaseaktivität, obwohl es nicht am Citratzyklus beteiligt sein kann, da dieser in den Mitochondrien lokalisiert ist. Ob diese cytosolische Aconitaseaktivität eine Funktion besitzt, ist noch unbekannt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass im aktiven Zentrum des IRP ein Eisen-Schwefel-Cluster aus drei Eisenatomen [3Fe-4S] lokalisiert ist, der unter eisenreichen Bedingungen in einen Cluster mit vier Eisenatomen [4Fe-4S] übergeht und dabei seine RNA-bindende Eigenschaft verliert, jedoch gleichzeitig Aconitaseaktivität erhält. Der Eisen-Schwefel-Cluster stellt folglich den zentralen Ort der Eisensensitivität des IRP dar, der die jeweilige Aktivierung durch Konformationsänderung im Enzym induziert (Klausner *et al.*, 1993).

### 2.3.2.3 Regulation der Eisenaufnahme durch HFE

Ein dritter Regulationsmechanismus für die Eisenaufnahme durch den TfR findet sich auf Proteinebene. Assoziiert TfR mit dem membranständigen Hämochromatoseprotein (HFE), kann Transferrin nicht mehr an den TfR binden, und die TfR-vermittelte Eisenaufnahme der Zelle ist unterbunden. HFE wirkt folglich als negativer Modulator der Eisenaufnahme (Parkkila *et al.*, 1997; Bennett *et al.*, 2000). Dies wird bestätigt durch die Tatsache, dass Mutationen im HFE-Gen zu der häufigsten schweren Erbkrankheit, der vererbaren Hämochromatose, führen können – ungefähr eine von 300 kaukasischen Personen erkranken, wobei überwiegend Männer betroffen sind. Die Hämochromatose wird hervorgerufen durch eine erhöhte Eisenresorption der Zellen, in deren Folge es zu einer verstärkten Eisenablagerung in Geweben und Organen kommt. Bleibt die Erkrankung unbehandelt, führen die starken Organschädigungen schließlich zum Tode. Ungefähr 85 % der Erkrankten sind homozygote Träger der Mutation C260Y, welche die Expression des HFE an der Zelloberfläche verhindert (Feder *et al.*, 1998). Bei ungefähr 70 % der heterozygoten Träger der C260Y-Mutation findet man eine weitere Mutation (H41D), die zwar eine korrekte Expression des HFE zulässt, jedoch dessen Bindung an den TfR verhindert, so dass dieses mutierte HFE keinen modulierenden Einfluss auf die Eisenaufnahme mehr besitzt (Beutler *et al.*, 1997; Feder *et al.*, 1997).

## 2.4 Der Transferrinrezeptor-2

Kawabata *et al.* konnten eine dem TfR homologe cDNA aus zwei Bibliotheken, die aus humanen leukozytären Zelllinien hergestellt wurden, isolieren und bezeichneten das Produkt dieser cDNA wegen seiner großen Ähnlichkeit mit dem TfR als TfR-2 (Kawabata *et al.*, 1999). Im Gegensatz zum TfR werden vom TfR-2 zwei mRNA-Transkripte durch alternatives Spleißen gebildet, welche als  $\alpha$ - und  $\beta$ -Form bezeichnet werden. Die  $\alpha$ -Form stellt, wie der TfR, ein Typ II-Membranprotein dar und liegt vermutlich als Homodimer vor, welches über zwei Disulfidbindungen verbrückt ist. Der  $\beta$ -Form fehlt dagegen die Cytoplasmatische- und Transmembrandomäne, so dass diese eine lösliche Form des TfR-2 darstellt, die vermutlich im Cytosol lokalisiert ist. Während die  $\alpha$ -Form vornehmlich in Leber und erythroiden Blutzellen exprimiert ist, aber auch in Milz, Lunge, Muskel, Prostata und mononukleären Blutzellen in geringerer Konzentration nachgewiesen werden kann, ist die  $\beta$ -Form in allen typischen Geweben lokalisiert (Kawabata *et al.*, 1999; Kawabata *et al.*, 2001). Die  $\alpha$ -Form vermag Transferrin zu binden, jedoch mit geringerer Affinität als der TfR, und ist vermutlich beteiligt an der Eisenaufnahme der Zellen mittels Ferritransferrin-Endozytose. Die Expression des TfR-2 $\alpha$  ist jedoch nicht abhängig von der Eisenbeladung der Zelle, sondern wird abhängig vom Zellzyklus reguliert (Kawabata *et al.*, 2000). Der Unterschied in der Regulation des TfR-2 zum TfR zeigt sich weiterhin in dem Befund, dass TfR-2 nicht an das HFE-Protein bindet (West *et al.*, 2000). Mutationen im Gen des TfR-2 können zu einer Eisenstoffwechselkrankheit führen, die als Typ-3-Hämochromatose bezeichnet wird (Roetto *et al.*, 2001). Der

molekulare Zusammenhang zwischen dem mutierten Tfr-2 und der Typ-3-Hämochromatose ist jedoch noch völlig ungeklärt, wie auch die Funktion der löslichen  $\beta$ -Form des Tfr-2 bislang unbekannt ist.

## 2.5 Shedding

Bei einer Vielzahl von Membranproteinen wird beobachtet, dass deren extrazelluläre Domänen durch proteolytische Spaltung von der Zelle in die Zellumgebung freigesetzt werden. Dieses so genannte Shedding tritt bei verschiedensten Arten von Membranproteinen auf: Zelladhäsionsproteinen, Rezeptoren, Ligandenvorläuferproteinen und Membranproteinen, deren Funktion noch unbekannt ist, die aber bedeutende Rollen in pathophysiologischen Prozessen spielen. Hierzu zählt das  $\beta$ -Amyloidprecursorprotein (APP), welches an der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung beteiligt ist, sowie das Prionprotein, welches in seiner infektiösen Form beim Rind BSE (*bovine spongiform encephalopathy*) oder beim Menschen die Creutzfeldt-Jacob-Krankheit auslöst. Trotz der Bedeutung vieler dieser Proteine ist über die Regulation und Identität der beteiligten Sheddingproteasen jedoch erst wenig bekannt.

### 2.5.1 Sheddingproteasen

Einige Mitglieder einer Proteasefamilie, die als ADAM (*a disintegrin and metalloprotease*) bezeichnet wird, spielen eine zentrale Rolle in Sheddingprozessen. Die ADAM-Proteasen werden zur Metzincinsuperfamilie gezählt, die durch eine konservierte zinkbindende Sequenz (HEXXHXXGXXH) und eine methioninenthaltende Schleife gekennzeichnet ist. Zu dieser Proteasesuperfamilie gehören ebenfalls die Matrixmetalloproteinasen (MMPs), sowie Proteasen der Astacin- und Serralysinfamilien (Stocker *et al.*, 1995). Neben den strukturellen Ähnlichkeiten zwischen ADAMs und MMPs lassen sich Übereinstimmungen in ihren Substratanforderungen und ihrer Sensitivität gegenüber spezifischen Metalloproteaseinhibitoren ausmachen. Inhibitorstudien an gereinigten ADAMs zeigten, dass die vier natürlichen Inhibitoren der Matrixmetalloproteinasen, die *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMPs), ebenfalls in der Lage sind bestimmte ADAMs zu inhibieren (Amour *et al.*, 1998; Amour *et al.*, 2000; Loechel *et al.*, 2000). Weiterhin wurden synthetische Metalloproteaseinhibitoren für ADAMs und MMPs entwickelt, welche mittels einer Hydroxamsäuregruppe an das katalytische Zentrum der Metalloprotease binden (Mohler *et al.*, 1994; Pikul *et al.*, 1998).

Ein gut untersuchter Sheddingprozess ist die Freisetzung des entzündungsvermittelnden Cytokins TNF $\alpha$  (Tumornekrosefaktor- $\alpha$ ) von seinem membrangebundenen Vorläufer. Die TNF $\alpha$ -Sheddingprotease, die als TNF $\alpha$ -*converting enzyme* (TACE) bezeichnet wird, konnte 1997 unabhängig voneinander in zwei Arbeitsgruppen isoliert werden und stellte sich als ein neuer Vertreter der ADAM-Proteine heraus (Black *et al.*, 1997; Moss *et al.*, 1997). Später

wurde gezeigt, dass TACE / ADAM-17 an der Freisetzung der extrazellulären Domäne einer Vielzahl weiterer Membranproteine, wie L-Selektin, *pro transforming growth factor- $\alpha$*  (proTGF $\alpha$ ), TNF $\alpha$ -2-Rezeptor (Peschon *et al.*, 1998), Interleukin-6-Rezeptor (Althoff *et al.*, 2000), Notch-1-Rezeptor (Brou *et al.*, 2000), APP (Slack *et al.*, 2001) und des Prionproteins (Vincent *et al.*, 2001) beteiligt ist. ADAM-10, das innerhalb einer Spezies die größte Homologie zu TACE / ADAM-17 besitzt, setzt ebenfalls die extrazellulären Domänen von proTNF $\alpha$  (Lunn *et al.*, 1997), APP (Lammich *et al.*, 1999), Notch-1-Rezeptor (Pan und Rubin, 1997) und des Prionproteins (Vincent *et al.*, 2001) in den Extrazellularraum frei. ADAM-9 ist verantwortlich für das Shedding des Heparinbindenden Epidermalen Wachstumsfaktors (HB-EGF) (Izumi *et al.*, 1998) und ADAM-19 für die Freisetzung von Neuregulin- $\beta$ 1, einem Mitglied der EGF-Familie (Shirakabe *et al.*, 2001). Neben den genannten ADAMs konnten weitere Proteasen identifiziert werden, die an verschiedenen Sheddingprozessen beteiligt sind. So konnte für die Matrixmetalloproteinase Stromelysin-1 (MMP-3) gezeigt werden, dass diese ebenfalls HB-EGF freisetzt (Suzuki *et al.*, 1997), während Matrilysin (MMP-7) sowohl aktiven löslichen Fas-Liganden generiert (Powell *et al.*, 1999) als auch TNF $\alpha$  aus Makrophagen freisetzt (Haro *et al.*, 2000). Weitere Proteasen, die ebenfalls an der Freisetzung von TNF $\alpha$  beteiligt sind, konnten als *membrane-type* MMP-4 (MT-MMP-4) (English *et al.*, 2000) und als die Serinprotease Proteinase-3 identifiziert werden (Robache-Gallea *et al.*, 1995).

## 2.5.2 Regulation des Sheddings

Die Beobachtung, dass auf der einen Seite eine Protease (TACE) mehrere Membranproteine (proTNF $\alpha$ , proTGF $\alpha$ , L-Selektin, APP, Prionprotein, Notch-1-Rezeptor und TNF $\alpha$ -2-Rezeptor) zu shedden vermag und auf der anderen Seite ein Membranprotein (TNF $\alpha$ ) durch verschiedene Proteasen (TACE, ADAM-10, Matrilysin, MT4-MMP und Proteinase-3) freigesetzt werden kann, zeigt, dass Shedding einen vielschichtigen Prozess darstellt. Dies lässt vermuten, dass der Regulation des Sheddings eine entscheidende Rolle dabei zukommt, welche Membranproteine zu welchem Zeitpunkt und unter welchen Bedingungen freigesetzt werden. Hierbei ist vermutlich die Expression und Aktivierung der beteiligten Proteasen von besonderer Bedeutung. Aber auch die Lokalisierung der Sheddingproteasen sowie ihrer Substrate könnte festlegen, ob ein Sheddingprozess stattfindet oder nicht.

Im Allgemeinen werden Sheddingprozesse unterteilt (i) in konstitutives Shedding, welches auf einem basalen Niveau ohne Aktivierung stattfindet oder (ii) in reguliertes Shedding durch Aktivierung der Proteinkinase C (PKC), die durch Phorbolster wie Phorbol-12-N-myristat-13-acetat (PMA) induziert werden kann. Die Aktivierung der PKC durch Behandlung von Zellen mit PMA führt zu einer Reduktion der Oberflächenexpression von L-Selektin und p75-TNF-Rezeptor in Wildtypzellen, aber nicht in TACE-defizienten Zellen (Peschon *et al.*, 1998). Ebenso wird das PMA-induzierte Shedding des Interleukin-6-Rezeptors in



TACE-defizienten Fibroblasten deutlich reduziert, während ein konstitutives Shedding des Interleukin-6-Rezeptors in diesen Zellen weiterhin nachweisbar bleibt (Althoff *et al.*, 2000). Weiterhin konnte in TACE-defizienten Zellen gezeigt werden, dass die regulierte Freisetzung von sAPP durch die  $\alpha$ -Sekretase blockiert ist, die konstitutive Freisetzung von sAPP jedoch unbeeinträchtigt bleibt (Buxbaum *et al.*, 1998). Diese Daten zeigen, dass TACE eine zentrale Rolle in regulativen Sheddingprozessen spielt. Im Gegensatz zu TACE wurde für ADAM-10 gefunden, dass es am konstitutiven Shedding von APP beteiligt ist (Lammich *et al.*, 1999; Lopez-Perez *et al.*, 2001). Weitere Hinweise, dass TACE und ADAM-10 tatsächlich unterschiedlichen Aktivierungsmechanismen unterliegen, erbrachten Untersuchungen zum Shedding des Prionproteins. Für diesen Prozess wurde gezeigt, dass PMA-stimuliertes Shedding durch TACE, jedoch konstitutives Shedding durch ADAM-10 vermittelt wird (Vincent *et al.*, 2001). Bei mit ADAM-10 transfizierten Zellen konnte jedoch ebenfalls eine verstärkte PMA-stimulierte sAPP-Freisetzung beobachtet werden (Lammich *et al.*, 1999), was zeigt, dass die Regulation der Aktivitäten von TACE und ADAM-10 nicht streng getrennt werden kann und vermutlich weitere Proteasen direkt oder indirekt an den beschriebenen Sheddingprozessen beteiligt sind.

Für einige Sheddingprozesse konnte eine Stimulierung mittels PMA nicht erzielt werden, jedoch wurden andere Reagenzien gefunden, die diese Rolle übernehmen können. Einen Überblick gibt Tabelle 1. So wird beispielsweise das Shedding des HER-2-Rezeptors (humaner EGF-Rezeptor-2) und das von TRANCE (*TNF-related activation-induced cytokine*), einem Mitglied der TNF-Cytokinfamilie, wirkungsvoll durch den Tyrosinphosphatase-inhibitor Pervanadat stimuliert, während PMA keinen Effekt zeigte (Codony-Servat *et al.*, 1999; Schlöndorff *et al.*, 2001). Für beide Prozesse wird eine Beteiligung von TACE ausgeschlossen, da die Freisetzung der extrazellulären Domäne von HER-2 durch TIMP-1 und die Freisetzung von TRANCE durch TIMP-2 inhibiert wird. Dagegen wird TACE durch TIMP-3, jedoch nicht TIMP-1, TIMP-2 oder TIMP-4 inhibiert (Amour *et al.*, 1998). Worauf die beobachteten, unterschiedlichen Regulationen der Sheddingprozesse beruhen und welche Bedeutung diese besitzen, ist in den meisten Fällen noch völlig ungeklärt.

### 2.5.3 Funktionen des Sheddings

Die Vielfältigkeit der Membranproteine, deren extrazelluläre Domänen durch Shedding freigesetzt werden, lässt ebenso vielfältige Funktionen des Sheddings für die verschiedenen Membranproteine vermuten. Für die membrangebundenen Vorläufer von Cytokinen ist die Funktion des Sheddings offensichtlich. Die Abspaltung von seinem Membrananker setzt das funktionelle Cytokin in den extrazellulären Raum frei, wo es seine Wirkung auf die Zielzellen über die entsprechenden Rezeptoren ausüben kann. Umgekehrt kann jedoch auch die Wirkung

Tabelle 1: Sheddingprozesse

Membranprotein	Typ	Schnittstelle (...P1↓P1'...)	Abstand von der Membran	Stimulierung	beteiligte Proteasen	Referenz
ACE	TM-1 <sup>a)</sup>	NSAR↓SEGP	27	PMA	MP <sup>c)</sup> , nicht TACE	(Eyries <i>et al.</i> , 2001) (Schwager <i>et al.</i> , 1999)
APP	TM-1					
α-Sekretase		HHQK↓LVFF	12	PMA	ADAM-10 TACE	(Lammich <i>et al.</i> , 1999) (Slack <i>et al.</i> , 2001)
β-Sekretase		EVKM↓DAEF	28		BACE-1 BACE-2	(Vassar <i>et al.</i> , 1999) (Hussain <i>et al.</i> , 2000)
γ-Sekretase		GGVV↓IATV	in der Membran		Presenilin-1 (?) Presenilin-2 (?)	(Wolfe <i>et al.</i> , 1999) (Steiner <i>et al.</i> , 1999)
E-Cadherin	TM-1	nicht bekannt		STS <sup>d)</sup>	MP	(Steinhusen <i>et al.</i> , 2001)
Fas-Ligand	TM-2	SELK↓QIGH	26	PMA	MP, nicht TACE	(Tanaka <i>et al.</i> , 1998) (Itai <i>et al.</i> , 2001)
HER-2	TM-1	nicht bekannt		PV <sup>e)</sup> , nicht PMA	MP, nicht TACE	(Codony-Servat <i>et al.</i> , 1999)
IL6-Rezeptor	TM-1	LAVQ↓DSSS	1	PMA, CRP <sup>f)</sup>	TACE	(Peschon <i>et al.</i> , 1998) (Althoff <i>et al.</i> , 2000)
L-Selektin	TM-1	KLDK↓SFSM	11	PMA, fMLP <sup>g)</sup>	TACE	(Peschon <i>et al.</i> , 1998)
Notch-1-Rezeptor	TM-1	KIEA↓VKSE	13	Notch-Ligand Delta	TACE, ADAM-10 / KUZ	(Brou <i>et al.</i> , 2000) (Pan und Rubin, 1997)
proEGF	TM-1	nicht bekannt		PMA	MP	(Dempsey <i>et al.</i> , 1997)
proHB-EGF	TM-1	nicht bekannt		PMA, Ionomycin	ADAM-9	(Izumi <i>et al.</i> , 1998) (Dethlefsen <i>et al.</i> , 1998)
proTGFα	TM-1	DLLA↓VVAA	9	PMA	TACE	(Peschon <i>et al.</i> , 1998)
proTNFα	TM-2 <sup>b)</sup>	LAQA↓VRSS	20	PMA, NO, LPS <sup>h)</sup>	TACE	(Black <i>et al.</i> , 1997) (Moss <i>et al.</i> , 1997) (Lunn <i>et al.</i> , 1997) (Haro <i>et al.</i> , 2000)
		SPLA↓QAVR	18		MT4-MMP	(English <i>et al.</i> , 2000)
		AQAV↓RSSS	21	LPS	Proteinase-3	(Robache-Gallea <i>et al.</i> , 1995)
proTRANCE	TM-1	nicht bekannt		PV, nicht PMA	MT-MMP	(Schlöndorff <i>et al.</i> , 2001)
TfR	TM-2	ECER↓LAGT	12		SP <sup>i)</sup> (?)	(Shih <i>et al.</i> , 1990)
TNFα-R-1	TM-1	QIEN↓VKGT	10	PMA, NO, TNFα	MP	(Okuyama <i>et al.</i> , 2000) (Pinckard <i>et al.</i> , 1997)
TNFα-R-2	TM-1	PGAV↓HLPQ	43	PMA, TNFα, Ionomycin	TACE, SP	(Pinckard <i>et al.</i> , 1997)

<sup>a</sup>TM-1, Typ-1 Membranprotein; <sup>b</sup>TM-2, Typ-2 Membranprotein; <sup>c</sup>MP, Metalloprotease; <sup>d</sup>STS, Staurosporin; <sup>e</sup>PV, Pervanadat; <sup>f</sup>CRP, C-reaktives Protein; <sup>g</sup>fMLP, N-Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin; <sup>h</sup>LPS, Lipopolysaccharid; <sup>i</sup>SP, Serinprotease

eines Cytokins durch Shedding vermindert werden, falls der membrangebundene Cytokinvorläufer eine stärkere Wirkung ausübt als das freigesetzte Cytokin, wie es für den Fas-Liganden gezeigt wurde (Tanaka *et al.*, 1998).

Da die meisten Cytokinrezeptoren ebenfalls dem Shedding unterliegen, kann die Wirkung der freigesetzten Cytokine auch dadurch vermindert werden, dass die Rezeptoren (i) nicht mehr auf der Zelloberfläche zur Verfügung stehen oder (ii) die freigesetzten extrazellulären Domänen der Rezeptoren die Cytokine durch Bindung zu inaktivieren vermögen. Aber auch eine umgekehrte Cytokinsignaltransduktion ist denkbar. Freigesetzte extrazelluläre Domänen der Rezeptoren könnten an die membrangebundenen Cytokinvorläufer binden und hierdurch Signalwege vermitteln.

Bemerkenswert ist die Entdeckung zweier Spleißvarianten des HER-4-Rezeptors, die sich lediglich im *Stalk*-Bereich unterscheiden. Eine der beiden Varianten wird durch PMA-Stimulierung gesheddet (HER4 JM-a), während die andere jedoch resistent gegen ihre Freisetzung ist (HER4 JM-b) (Elenius *et al.*, 1997). Da zudem beide Formen unterschiedliche Gewebelokalisierungen aufweisen, kann man vermuten, dass die Spaltbarkeit der einen Form und die Spaltungsresistenz der anderen Form eine wichtige physiologische Rolle spielen dürfte.

Es wird weiterhin vermutet, dass die Freisetzung der extrazellulären Domäne eine Voraussetzung für die intrazelluläre Abspaltung der cytoplasmatischen Domäne bei verschiedenen Membranproteinen ist. Einen Hinweis für einen solchen Mechanismus liefert der Notch-1-Rezeptor. Dieser wird nach Bindung seines Liganden Delta zwölf Aminosäuren von der Membran entfernt auf der extrazellulären Seite proteolytisch gespalten. In *Drosophila* wird die ADAM-10 homologe Form KUZ für diese Spaltung verantwortlich gemacht (Pan und Rubin, 1997), während in Säugetierzellen TACE als beteiligte Protease identifiziert wurde (Brou *et al.*, 2000). Die Abspaltung der extrazellulären Domäne ermöglicht nun die Aktion einer bisher nicht identifizierten Protease, die wie die  $\gamma$ -Sekretase beim APP, in der Transmembrandomäne des Notch-1-Rezeptors schneidet. Die cytoplasmatische Domäne wird daraufhin von der Membran freigesetzt und wandert zum Zellkern, wo sie als Transkriptionsfaktor wirkt (Kopan *et al.*, 1996).

Shedding von Zelladhäsionsproteinen wiederum führt zu einer Lockerung von Zell-Zell-Kontakten. Apoptose induziert bei Endothelzellen eine Abspaltung der extrazellulären Domäne von E-Cadherin mit einer nachfolgenden Ablösung der apoptotischen Zelle aus dem Zellverband (Steinhusen *et al.*, 2001). Das leukozytäre Zelloberflächenprotein L-Selektin vermittelt die Rezirkulation von naiven Lymphozyten in das lymphatische Gewebe und die Einwanderung von Leukozyten in entzündliches Gewebe. L-Selektin bildet hierbei einen ersten, initialen Kontakt zwischen Leukozyt und Endothel, durch den die Bewegung des Leukozyten verlangsamt wird. Durch Abspaltung der extrazellulären Domäne von L-Selektin

verliert der Leukozyt die Fähigkeit in Gewebe einzuwandern. L-Selektin-Shedding ermöglicht folglich die Modulation der Entzündungsantwort (Jung und Dailey, 1990).

## 2.5.4 TfR-Shedding

### 2.5.4.1 Der Serumtransferrinrezeptor

Ein Teil des membranständigen TfR gelangt in einer löslichen (*soluble*) Form (sTfR) ins Blut (Kohgo *et al.*, 1986) und kann dort beim gesunden Erwachsenen in einer Serumkonzentration von ungefähr 3–6 mg/l nachgewiesen werden (Flowers *et al.*, 1989; Ferguson *et al.*, 1992; Punnonen *et al.*, 1994). Ein Großteil des sTfR wird bei der Erythrozytenreifung freigesetzt, so dass die Konzentration des sTfR mit der Erythropoeseaktivität korreliert werden kann (Chitambar *et al.*, 1991; R'Zik und Beguin, 2001). Unter pathologischen Bedingungen, die mit einer veränderten Erythropoeseaktivität einhergehen, verändert sich ebenfalls die Konzentration des sTfR im Serum. Im Fall der Eisenmangelanämie ist die Konzentration von sTfR signifikant erhöht (Skikne *et al.*, 1990). Bei chronischen Entzündungen und akuten Infektionen bleibt die sTfR-Konzentration jedoch unbeeinflusst, so dass sie unter den genannten Bedingungen einen guten Marker für die Feststellung des Eisenstatus darstellt (Ferguson *et al.*, 1992).

Durch Isolierung des sTfR aus humanem Serum und der Analyse des N-Terminus mittels Aminosäuresequenzierung konnte gezeigt werden, dass der sTfR N-terminal mit Leu-101 beginnt (sTfR<sub>101</sub>, s. auch Glossar, Kapitel 7) und damit gegenüber der membranständigen Form genau um 100 Aminosäuren verkürzt ist (Shih *et al.*, 1990). Diese Schnittstelle zwischen Arg-100 / Leu-101 liegt folglich im *Stalk*-Bereich des TfR zwischen der Disulfidbrücke bei Cys-98 und dem O-Glycan am Thr-104.

### 2.5.4.2 TfR-Sheddingprotease

Obwohl bereits 1986 der sTfR in humanem Serum nachgewiesen wurde (Kohgo *et al.*, 1986), ist bisher wenig über die molekularen Grundlagen dieses Sheddingprozesses bekannt. Insbesondere gibt es nur wenige Anhaltspunkte zur Identität der beteiligten Sheddingprotease. Isolierte Zellmembranen der promyeloiden Zelllinie HL60 setzten ein lösliches TfR-Fragment frei, welches durch Zugabe eines unspezifischen Proteaseinhibitorcocktails inhibiert werden konnte (Chitambar und Zivkovic, 1989). Weiterhin spalteten Zellfraktionen von HL60-Zellen gereinigten plazentalen TfR. In diesem Assay wurde die beobachtete proteolytische Aktivität mit den Serinproteaseinhibitoren Diisopropylfluorophosphat (DFP) oder Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), nicht aber mit den Metalloproteaseinhibitoren 1,10-Phenanthrolin oder Ethylendiamintetraacetat (EDTA) gehemmt. Zudem zeigten vier MMPs (MMP-1, MMP-2, MMP-3 und MMP-9) in diesem Assay keine proteolytische Aktivität gegenüber TfR

(Baynes *et al.*, 1993). In einem weiteren Assay, in dem immobilisierter Schafs-TfR als Substrat für zellassoziierte Proteasen verwendet wurde, konnte gezeigt werden, dass eine Fraktion humaner, weißer Blutzellen eine proteolytische Aktivität zur Spaltung von Schafs-TfR besitzt, während rote Blutzellen keine entsprechende Aktivität zeigten (Ahn und Johnstone, 1993). Auch in diesem Assay konnte die beobachtete TfR-spezifische Aktivität mit PMSF inhibiert werden (Johnstone, 1996). Da in allen Assays keine Angaben zur Schnittstellenspezifität der beobachteten proteolytischen Aktivität gemacht wurden, bleibt die Relevanz der beobachteten Inhibition der TfR-Spaltungen durch Serinproteaseinhibitoren jedoch offen. Im Gegensatz hierzu zeigten Inhibitorstudien an TfR-sheddingaktiven CHO-Zellen, dass Serinproteaseinhibitoren, wie auch Inhibitoren anderer Proteaseklassen, keine Wirkung auf das TfR-Shedding haben (Rutledge *et al.*, 1994a).

#### **2.5.4.3 Lokalisierung des TfR-Sheddings**

Wie zur Identität der TfR-Sheddingprotease gibt es ebenso widersprüchliche Angaben über die Lokalisierung des TfR-Sheddings. Ahn und Johnstone zeigten, dass der membranständige TfR von Retikulozyten an Vesikel gebunden (so genannte Exosomen) externalisiert wird und durch leukozytäre, membranständige Proteasen von der Exosomenmembran als sTfR freigesetzt wird (Ahn und Johnstone, 1993; Johnstone, 1996). Da Baynes *et al.* (1994) ein vollständig geschnittenes, membranständiges TfR-Fragment nicht in Zellmembranen von HL60-Zellen, jedoch im Zellkulturüberstand an Exosomen assoziiert detektierten, postulieren diese, dass der TfR in multivesikulären Endosomen im Zellinneren proteolytisch gespalten wird, bevor diese als Exosomen externalisiert werden. Chitambar und Zivkovic-Gilgenbach (1990) vermuten dagegen, dass der TfR von der Zelloberfläche abgespalten wird, da durch PMA-induzierte Internalisierung des TfR in HL60-Zellen das TfR-Shedding reduziert wurde. Rutledge *et al.* (1994a) wiederum fanden, dass die Abspaltung des sTfR wahrscheinlich in einem intrazellulären Kompartiment stattfindet, da eine endozytosedefiziente TfR-Mutante in geringerem Maße gesheddet wurde als der Wildtyp-TfR. Weiterhin zeigten *Pulse-chase*-Untersuchungen, dass der sTfR nicht auf dem Biosyntheseweg proteolytisch abgespalten wird, sondern erst nach Erreichen der Zelloberfläche. Die Autoren folgern, dass das TfR-Shedding vermutlich in einem endosomalen Kompartiment stattfindet, obwohl die Spaltungseffizienz unabhängig von der Ansäuerung der Endosomen war.

Für zwei N-terminal verkürzte TfR-Mutanten, denen entweder die gesamte cytoplasmatische Domäne oder 31 Aminosäuren nahe der Membran deletiert wurden, wird dagegen beobachtet, dass diese bereits auf dem Biosyntheseweg proteolytisch gespalten werden. Die Analyse des TfR-Spaltfragmentes zeigte, dass diese TfR-Mutanten jedoch nicht an der Arg-100-Schnittstelle, sondern bei Gly-91 gespalten werden (Rutledge *et al.*, 1998).

#### 2.5.4.4 Regulation des TfR-Sheddings

Die sTfR-Konzentration in humanem Serum ist eng an den Eisenstatus gekoppelt, da der sTfR einen zuverlässigen Marker für die Diagnose von Eisenmangelanämien darstellt, in deren Verlauf die sTfR-Konzentration im Serum signifikant erhöht ist (Skikne *et al.*, 1990). Dieser Zusammenhang kann im Zellkulturmodell anhand der promyeloiden Zelllinie HL60 nachvollzogen werden. Kultivierung der Zellen im eisenangereicherten Medium führte zu einer ungefähr 70%igen Abnahme des TfR auf der Zelloberfläche unter gleichzeitiger Verringerung der sTfR-Freisetzung um 60 %. Umgekehrt konnte nach Inkubation der Zellen mit dem Eisenchelator Deferoxamin ein Anstieg der sTfR-Freisetzung beobachtet werden (Chitambar und Zivkovic-Gilgenbach, 1990). Der enge Zusammenhang zwischen der Expression von zellgebundenem TfR und freigesetztem sTfR konnte später *in vivo* anhand eines Rattenmodells unter verschiedenen Erythropoesebedingungen bestätigt werden (R'Zik und Beguin, 2001). Aus diesen Untersuchungen lässt sich folgern, dass die Kontrolle der Freisetzung des sTfR in erster Linie von der Bereitstellung des Substrates der TfR-Sheddingprotease, dem membrangebundenen TfR, abhängt. Das für die Stimulation allgemeiner Sheddingprozesse bekannte Reagenz PMA führte bei HL60-Zellen zu keiner Erhöhung der sTfR-Freisetzung sondern im Gegenteil zu einer Reduktion, was auf eine Abreicherung des membrangebundenen TfR an dem vermuteten Ort des Sheddings, der Zelloberfläche, zurückgeführt wurde (Chitambar und Zivkovic-Gilgenbach, 1990). Die Beteiligung direkter regulativer Prozesse, wie zum Beispiel die Aktivierung der TfR-Sheddingprotease, sind bisher nicht bekannt.

Das O-Glycan am Thr-104 nahe der Arg-100-Spaltstelle könnte die Effizienz des TfR-Sheddings durch sterische Blockierung der Spaltstelle beeinflussen. In einer Untersuchung konnte tatsächlich gezeigt werden, dass die Entfernung des O-Glycans die Sheddingaktivität von CHO-Zellen erhöht (Rutledge *et al.*, 1994b). Da der aus humanem Serum gereinigte sTfR jedoch sensitiv gegenüber O-Glycanase ist und mit Jacalinlektin, welches spezifisch an das O-Glycan bindet, nachgewiesen werden konnte, dürfte der TfR *in vivo* auch bei vorhandener O-Glycosylierung freigesetzt werden (Do und Cummings, 1992).

## 2.6 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Das Auftreten einer löslichen Form des TfR ist seit langem bekannt und das Ausmaß der Freisetzung des sTfR in das Blutplasma kann mit einigen wichtigen Krankheiten, die mit einer Störung im Eisenstoffwechsel und / oder der Erythropoese einhergehen, korreliert werden. Obwohl die Bestimmung der sTfR-Konzentration im Blutplasma zur Diagnose und Verlaufskontrolle dieser Krankheiten verwendet wird, sind die molekularen Grundlagen dieses Sheddingprozesses jedoch noch weitestgehend unverstanden. Insbesondere ist die Identität der TfR-Sheddingprotease ungeklärt. Für die Sheddingprozesse einiger anderer

Membranproteine werden verschiedenartige Proteasen verantwortlich gemacht, jedoch konnte umfassend bisher nur die Sheddingprotease des TNF $\alpha$  (ADAM-17 / TACE) funktionell charakterisiert werden.

Da es Hinweise gab, dass die für das TfR-Shedding verantwortliche Protease wahrscheinlich ein Mitglied der Klasse der Serinproteasen ist, sollte im ersten Teil dieser Arbeit ein Assay zum Nachweis dieser Serinprotease aus solubilisierten Zellfraktionen etabliert werden. Als Untersuchungsobjekt wurden leukozytäre Zelllinien ausgewählt, da für diesen Zelltyp bereits gezeigt werden konnte, dass diese sTfR freizusetzen vermögen. Da in den Veröffentlichungen, welche die Beteiligung einer Serinprotease am TfR-Shedding postulieren, die Schnittstellenspezifität der Protease nicht bestimmt worden war, sollte diese anhand eines Verdaus von solubilisiertem TfR erfolgen, der zuvor aus humaner Plazenta gereinigt wird. Hierzu war vorgesehen die entstandenen TfR-Fragmente mittels Ligandenaffinitätschromatographie zu isolieren und mit Hilfe der Aminosäuresequenzierung den N-Terminus zu ermitteln. Anschließend sollte die detektierte Protease vollständig anhand verschiedener Chromatographiemethoden gereinigt und über N-terminale Aminosäuresequenzierung mittels Edman-Abbau oder Massenspektrometrie mittels MALDI-TOF direkt nachgewiesen werden. Sollte auf diese Weise eine Identifizierung nicht möglich sein, sollten alternative Ansätze entwickelt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte ein Assay entwickelt werden, der die Untersuchung des TfR-Sheddingprozesses an intakten Membranen ermöglicht, da für Sheddingprozesse anderer Membranproteine gezeigt worden war, dass das Shedding von der intakten Membranstruktur abhängig ist. Zunächst sollte der von den Membranen freigesetzte sTfR mittels N-terminaler Sequenzierung auf die korrekte Spaltstelle zwischen Arg-100 / Leu-101 kontrolliert werden und anschließend die Freisetzung in Hinblick auf ihre Kinetik, die pH-Abhängigkeit, die Membranverankerung der TfR-Sheddingprotease und möglicher Kofaktoren sowie ihre Inhibitorsensitivität untersucht werden.

Im dritten Teil der Arbeit sollten die Ergebnisse aus den zuvor beschriebenen Untersuchungen dieser Arbeit, im Besonderen die Sensitivität gegenüber Proteaseinhibitoren, auf ein Zellsystem übertragen werden. Hierfür sollte ein in der Arbeitsgruppe bereits etablierter TfR-ELISA zur Messung von sTfR aus Zellkulturüberständen optimiert werden. Über die beschriebenen Inhibitoruntersuchungen hinaus sollte das Zellsystem Verwendung finden, um zum einen die Regulationsmechanismen des TfR-Sheddingprozesses zu untersuchen und zum anderen Versuche zur Feststellung seiner Lokalisierung durchzuführen.