

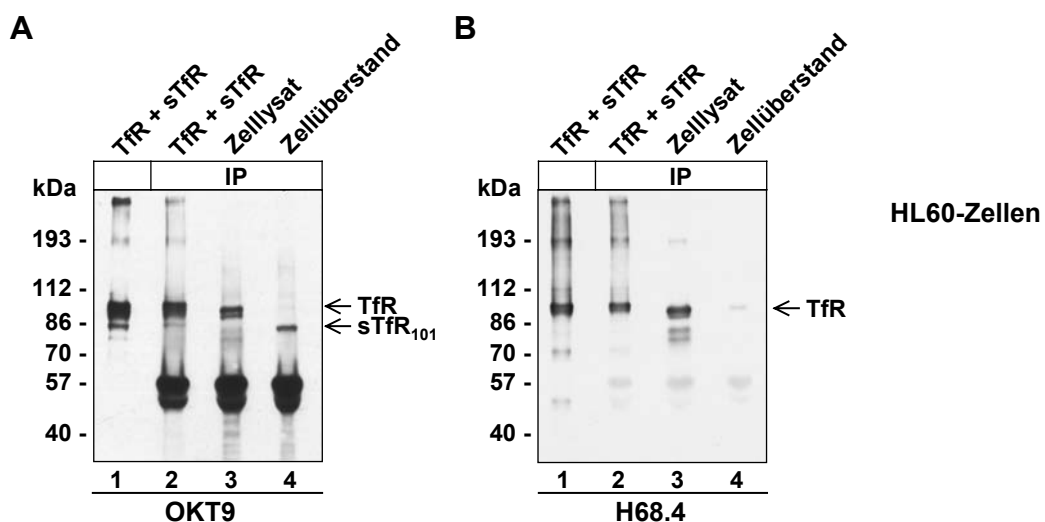
### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Isolierung und Identifizierung TfR-spaltender Proteasen aus Leukozyten

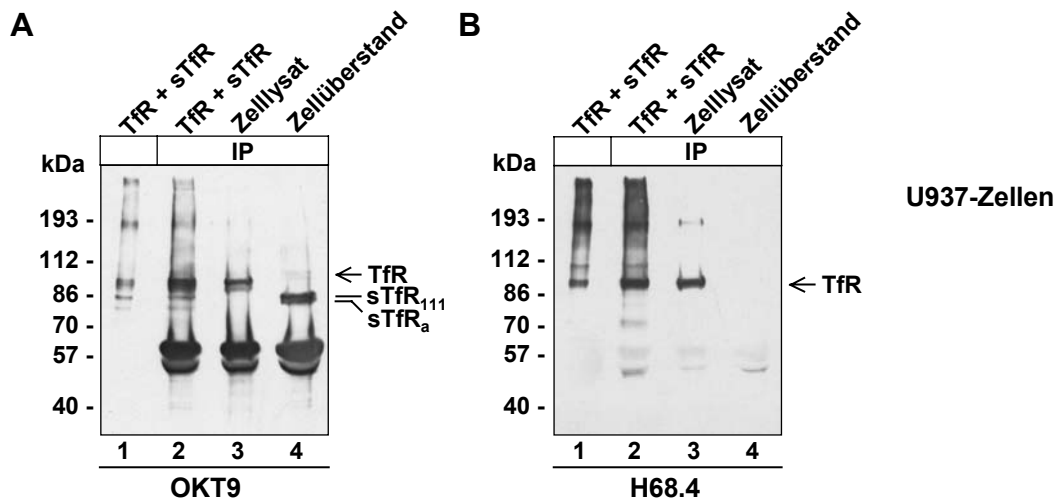
Sowohl für primäre Granulozyten und aktivierte Monozyten als auch für die leukozytären Zelllinien HL60 und K562 konnte eine proteolytische Aktivität nachgewiesen werden, die spezifisch TfR im Bereich des *Stalk* schneidet, so dass die extrazelluläre Domäne des TfR freigesetzt wird (Woith *et al.*, 1993; Johnstone, 1996; Chitambar und Zivkovic, 1989; Baynes *et al.*, 1991). Aus diesem Grund wurden leukozytäre Zelllinien als Ausgangsmaterial gewählt, um TfR-spaltende Proteasen zu isolieren und zu charakterisieren.

##### 3.1.1 Immunpräzipitation von sTfR aus HL60- und U937-Zellkulturüberstand

Zum Nachweis von freigesetztem löslichen TfR (sTfR) aus leukozytären Zelllinien wurde dieser aus Zellkulturüberständen von HL60- und U937-Zellen mit dem gegen die extrazelluläre TfR-Domäne gerichteten Antikörper OKT9 (Schneider *et al.*, 1982) immunpräzipitiert. Der Nachweis von immunadsorbiertem TfR erfolgte im Westernblot entweder mittels OKT9- (Abbildungen 3A und 4A) oder H68.4-Antikörper (Abbildungen 3B und 4B), der gegen die cytoplasmatische Domäne des TfR gerichtet ist (Trowbridge und Collawn, 1992).



**Abbildung 3: Nachweis von sTfR in HL60-Zellysaten und HL60-Zellkulturüberstand.** Aus  $5 \times 10^7$  HL60-Zellen sowie aus 200 ml HL60-Zellkulturüberstand wurde TfR mit OKT9 präzipitiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach Westernblot erfolgte eine Immunfärbung entweder mit (A) OKT9- oder (B) H68.4-Antikörpern. Aus humaner Plazenta gereinigter TfR (1  $\mu$ g) wurde entweder direkt (Spur 1) oder zur Kontrolle nach Immunpräzipitation mit OKT9 (Spur 2) aufgetragen. Bezüglich der Indizierung der verschiedenen sTfR-Banden siehe auch Glossar 7.1, Seite 76.



**Abbildung 4: Nachweis von sTfR in U937-Zelllysaten und U937-Zellkulturüberstand.** Aus  $5 \times 10^7$  U937-Zellen sowie 1000 ml U937-Zellkulturüberstand wurde TfR mit OKT9 präzipitiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach Westernblot erfolgte eine Immunfärbung entweder mit (A) OKT9- oder (B) H68.4-Antikörpern. Aus humaner Plazenta gereinigter TfR (1  $\mu$ g) wurde entweder direkt (Spur 1) oder zur Kontrolle nach Immunpräzipitation mit OKT9 (Spur 2) aufgetragen.

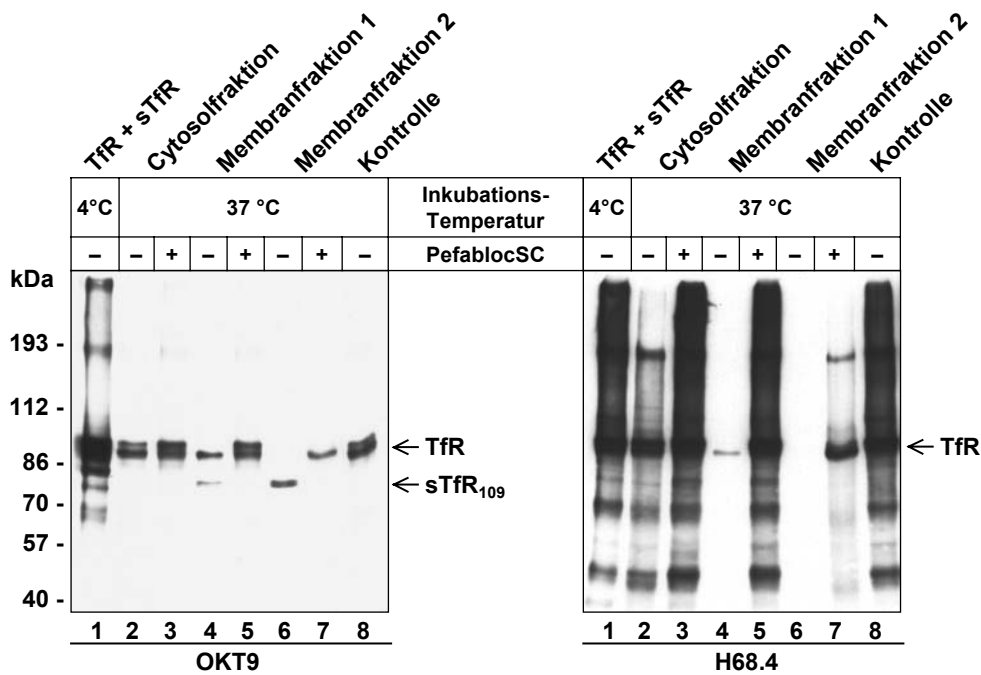
Im Kulturüberstand von HL60-Zellen konnte mit OKT9 ein TfR-Fragment nachgewiesen werden, welches eine molekulare Masse von ungefähr 85 kDa besitzt (sTfR<sub>101</sub><sup>1</sup>), während im Kulturüberstand von U937-Zellen dagegen eine Doppelbande bei ebenfalls ungefähr 85 kDa detektiert werden konnte (sTfR<sub>111</sub>, sTfR<sub>a</sub><sup>1</sup>). Die TfR-Fragmente wurden aus 3 l HL60- oder 5 l U937-Zellkulturüberstand mittels Affinitätschromatographie an Transferrinsepharose isoliert und der N-Terminus durch Edman-Abbau zu LAG(T)ES für das TfR-Fragment aus HL60-Zellen und zu XPGED für die obere prominente Bande des TfR-Fragmentes aus U937-Zellen bestimmt<sup>2</sup>. Zur Kontrolle der Immunpräzipitation wurde eine aus humaner Plazenta gereinigte TfR-Fraktion eingesetzt (Spur 2). Diese enthielt neben dem unverkürzten TfR, der unter reduzierenden Bedingungen eine molekulare Masse von 90–95 kDa besitzt, ein ca. 10 kDa kleineres TfR-Fragment, das ebenfalls mit OKT9 zu detektieren war. Alle 95-kDa-TfR-Formen konnten sowohl mit dem OKT9- als auch H68.4-Antikörper nachgewiesen werden, die 85-kDa-TfR-Fragmente jedoch nur mit OKT9-Antikörper. Dies zeigt, dass die 85-kDa-TfR-Fragmente N-terminal verkürzte Formen des TfR darstellen, welchen die Transmembrandomäne fehlt. Die Banden bei 50 kDa sind der schweren Kette des OKT9-Antikörpers zuzuordnen, der zur Durchführung der Immunpräzipitation an Protein A-Sepharose gekoppelt worden war.

<sup>1</sup> Die Indizierung erfolgte anhand des N-Terminus, der später ebenfalls für weitere TfR-Fragmente bestimmt wurde (s. Abschnitte 3.1.3 und 3.2.2 sowie Glossar 7.1).

<sup>2</sup> Alle N-terminalen Sequenzierungen wurden entweder durch Christoph Weise (Institut für Chemie-Biochemie, Freie Universität Berlin) oder kommerziell durch die Firma Peptide Speciality Laboratories, Heidelberg, durchgeführt.

### 3.1.2 TfR-Verdauassay

Der Nachweis von löslichen TfR-Fragmenten in Zellkulturüberständen der leukozytären Zelllinien HL60 und U937 zeigt, dass diese Zelllinien eine – oder mehrere – Proteasen besitzen, die für das Shedding vom TfR verantwortlich sind. Zum Nachweis dieser Proteasen wurde ein Assay entwickelt, in dem gereinigter solubilisierter TfR mit Zellfraktionen versetzt und für 18 h bei 37 °C inkubiert wird. Anschließend werden TfR-Fragmente im Westernblot mit OKT9 oder H68.4 nachgewiesen (Abbildung 5).



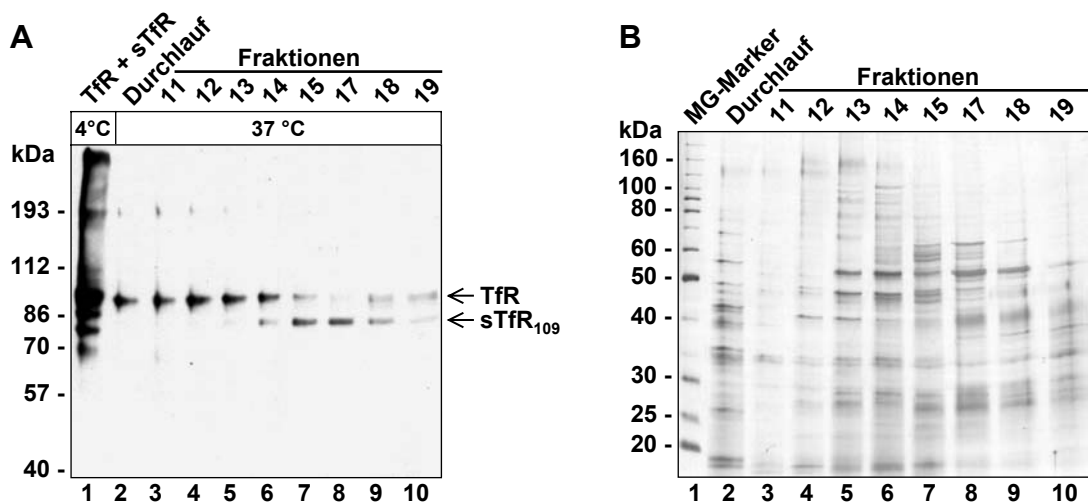
**Abbildung 5: TfR-spezifische proteolytische Aktivität von U937-Membranfraktionen.** U937-Zellen wurden durch differentielle Zentrifugation fraktioniert, mittels Triton X-100 solubilisiert und gereinigter TfR mit diesen Fraktionen für 18 h bei 37 °C jeweils ohne oder mit dem Serinproteaseinhibitor PefablocSC inkubiert. Anschließend wurden die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und mit OKT9 oder H68.4 detektiert. Zur Kontrolle wurde TfR ohne Zellfraktionen bei 37 °C inkubiert (Spur 8) und als Standard wurde eine aus humaner Plazenta gereinigte TfR-Fraktion (Spur 1) aufgetragen, in der neben vollständigem TfR ebenfalls sTfR enthalten war.

Während die Cytosolfraction von U937-Zellen kein Verdaufragment des TfR generierte, entstand durch die Inkubation von gereinigtem TfR mit den solubilisierten Membranfraktionen 1 und 2 ein ca. 80 kDa großes TfR-Fragment. Membranfraktion 1 enthält leichte Zellorganellen wie Mitochondrien, Lysosomen oder Peroxisomen, während Membranfraktion 2 mittels Ultrazentrifugation gewonnen wurde und vornehmlich Plasmamembranfragmente sowie kleine Vesikel und Teile des Endoplasmatischen Retikulums (ER) enthält. Im Weiteren wird diese, aus der Ultrazentrifugation gewonnene Membranfraktion als mikrosomale Membranfraktion bezeichnet. Das 80 kDa große TfR-Fragment stellt ein N-terminal verkürztes TfR-Fragment dar, da es nicht mit dem H68.4-Antikörper detektiert werden konnte. Die proteolytische Aktivität, die das 80-kDa-TfR-Fragment generiert, wird im Folgenden als A80-Aktivität bezeichnet. Membranfraktionen, die aus HL60-Zellen gewonnen

wurden, zeigten in diesem Assay dagegen keine TfR-spezifische proteolytische Aktivität. Da in ähnlichen Assays die TfR-spezifische Aktivität mit Serinproteaseinhibitoren inaktiviert werden konnte (Baynes *et al.*, 1993; Johnstone, 1996), wurden die Verdauansätze zusätzlich mit dem Serinproteaseinhibitor PefablocSC inkubiert. Hierbei zeigte sich, dass PefablocSC die A80-Aktivität effektiv inhibierte (Abbildung 5).

### 3.1.3 Reinigung TfR-spezifischer Proteasen

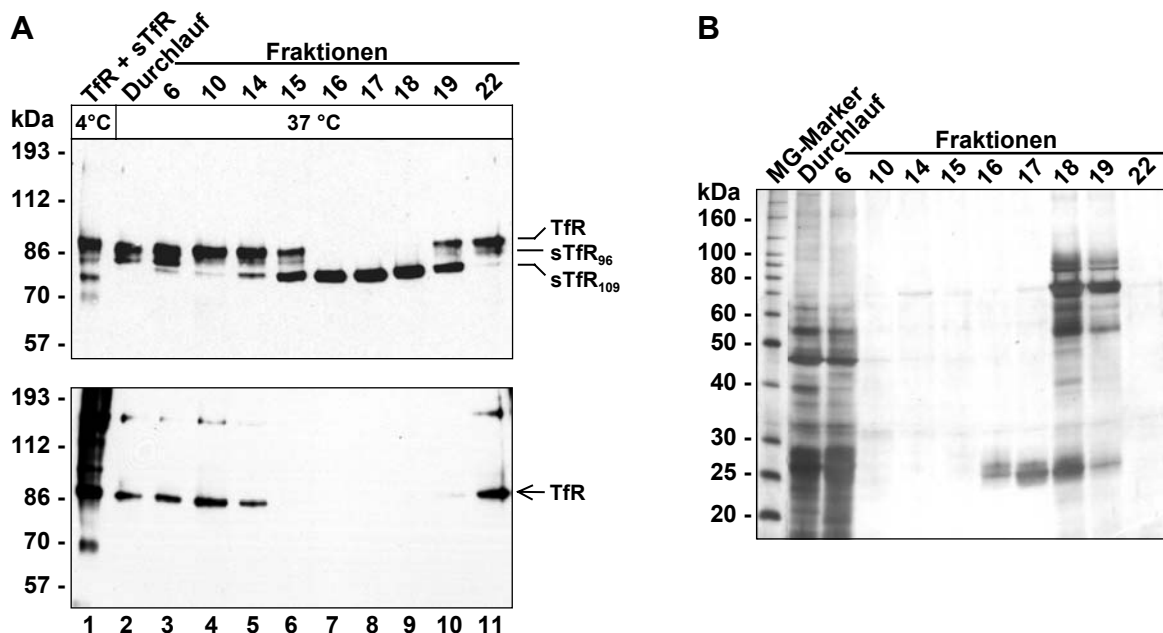
Da in solubilierten Membranen von U937-Zellen eine proteolytische Aktivität nachgewiesen werden konnte, welche gereinigten TfR in einem Verdauassay spezifisch im *Stalk*-Bereich schneidet (s. Kapitel 3.1.2.), wurden verschiedene chromatographische Methoden getestet, um diese Protease aus den solubilierten Membranen zu reinigen. Hierzu gehörten die Anionenaustauschchromatographie (Mono Q), die Kationenaustauschchromatographie (Mono S), für Serinproteasen spezifische Affinitätschromatographien (Arg-Sepharose, Lys-Sepharose und p-Aminobenzamidin-Sepharose), die Gelfiltration (Superdex 75 und Superdex 200) und die Hydrophobe-Interaktionschromatographie (HIC; Resource ETH, Resource ISO und Resource PHE). Für einen ersten Reinigungsschritt erwies sich eine Anionenaustauschchromatographie (Mono Q) als geeignet. Diese Methode beruht darauf, dass negativ geladene Proteine an positiv geladene Gruppen von Säulenmaterialien binden können und unter Bedingungen hoher Ionenstärke wieder eluieren. Als Ausgangsmaterial wurden die aus U937-Zellen gewonnenen, mikrosomalen Membranen in 1 % Triton X-100 solubiliert und zur Anionenaustauschchromatographie eingesetzt. Die erhaltenen Fraktionen wurden gegen PBS dialysiert und sowohl im TfR-Verdauassay als auch im Silbergel analysiert (Abbildung 6).



**Abbildung 6: Anionenaustauschchromatographie (Mono Q) mit solubilierten, mikrosomalen Membranen aus U937-Zellen.** Nach Dialyse wurden nicht gebundene Proteine (Durchlauf) und Fraktionen, die in einem linearen Salzgradienten von 0 bis 1 M NaCl eluierten, im TfR-Verdauassay (A) und nach elektrophoretischer Auftrennung und Silberfärbung analysiert (B).

Im TfR-Verdauassay zeigte die Fraktion 17, die bei ca. 0,7 M NaCl eluierte, die höchste Aktivität, während im Durchlauf der nicht gebundenen Proteine keine Aktivität zu detektieren war. Da zudem der größte Teil der Proteine im Durchlauf und den nicht aktiven Fraktionen nachgewiesen wurde, konnte folglich eine erste Teilreinigung der Aktivität, die das 80-kDa-TfR-Fragment generiert, erreicht werden.

Eine Hydrophobe-Interaktionschromatographie erwies sich als erfolgreicher weiterer Reinigungsschritt. Bei dieser Chromatographie wird die Eigenschaft ausgenutzt, dass Proteine in Puffern mit hohen Ionenstärken hydrophobe Bereiche ausbilden, welche die Bindung des Proteins an hydrophobe Säulenmaterialien ermöglichen. Aktive Fraktionen aus der Anionenaustauschchromatographie wurden auf eine Konzentration von 2 M KCl gebracht und auf eine HIC-Säule mit Isopropylgruppen aufgetragen. Gebundene Proteine wurden mit einem fallenden KCl-Gradienten von 2 bis 0 M KCl eluiert, erhaltene Fraktionen gegen PBS dialysiert und sowohl im TfR-Verdauassay als auch im Silbergel analysiert (Abbildung 7).

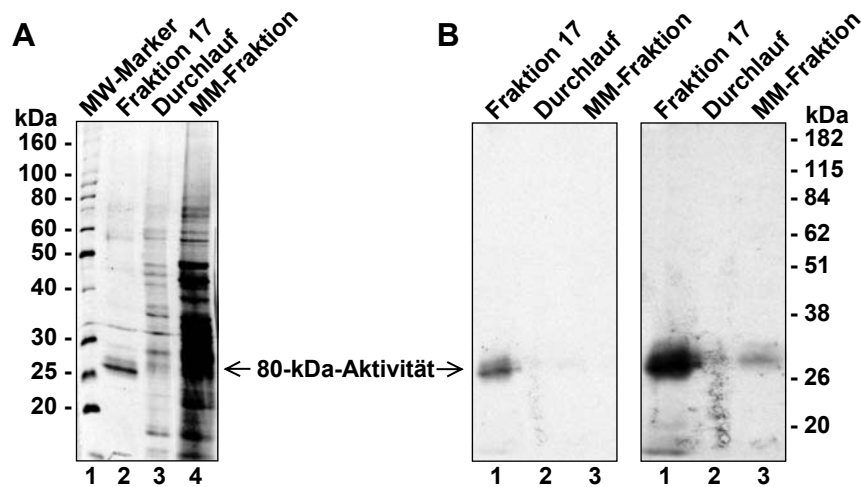


**Abbildung 7: Hydrophobe-Interaktionschromatographie mit aktiven Fraktionen aus der Anionenaustauschchromatographie.** Nach Dialyse wurden nicht gebundene Proteine (Durchlauf) und Fraktionen, die in einem linearen Salzgradienten von 2 bis 0 M KCl eluierten, im TfR-Verdauassay mit OKT9 (A, oberer Blot) oder H68.4 (A, unterer Blot) sowie nach SDS-PAGE und Silberfärbung analysiert (B).

Die Fraktionen 16 bis 18, die von 0,9 bis 0,7 M KCl eluierten, verdauten den TfR vollständig zum 80-kDa-TfR-Fragment (sTfR<sub>109</sub>). Genau in diesen Fraktionen wurde im Silbergel eine prominente Doppelbande, die eine Größe von ca. 27 kDa besitzt, nachgewiesen. In einigen Fraktionen der HIC konnte weiterhin ein zweites TfR-Fragment von ca. 85 kDa detektiert werden (sTfR<sub>96</sub>), das sich am deutlichsten im Durchlauf und in der Fraktion 6 zeigte. Dieses konnte – ebenso wie das 80-kDa-TfR-Fragment – nicht mit dem gegen die cytoplasmatische Domäne gerichteten Antikörper H68.4 nachgewiesen werden (Abbildung 7A, unterer Blot). Die proteolytische Aktivität, die dieses 85-kDa-TfR-Fragment generiert, wird im Folgenden

als A85-Aktivität bezeichnet. Die mittels der Hydrophoben-Interaktionschromatographie getrennten Aktivitäten wurden verwendet, um spezifisch sowohl das 80-kDa-TfR-Fragment als auch das 85-kDa-TfR-Fragment in genügender Menge zu gewinnen, so dass diese Fragmente einer N-terminalen Sequenzierung durch Edman-Abbau unterworfen werden konnten. Die ermittelten N-terminalen Sequenzen ergaben für die A80-Aktivität eine Schnittstelle zwischen Val-108 / Arg-109 (sTfR<sub>109</sub>) und für die A85-Aktivität eine Schnittstelle zwischen Lys-95 / Thr-96 (sTfR<sub>96</sub>) im TfR-*Stalk*<sup>3</sup>. Obwohl der Unterschied der beiden TfR-Fragmente somit lediglich 13 Aminosäuren beträgt, zeigte das Laufverhalten in der Gelelektrophorese einen molekularen Massenunterschied von ungefähr 5 kDa an. Diese Diskrepanz kann erklärt werden durch die Anwesenheit eines O-Glykans am Thr-104 (Do und Cummings, 1992; Hayes *et al.*, 1992).

Da in vorausgegangenen Experimenten die A80-Aktivität mit einem Serinproteaseinhibitor inaktiviert werden konnte (Abbildung 5), wurden Aliquots der mikrosomalen Membranfraktion, des Durchlaufs aus der Hydrophoben-Interaktionschromatographie und der aktiven Fraktion 17 mit dem radioaktiv markierten, irreversiblen Serinproteaseinhibitor [<sup>3</sup>H]-Diisopropylfluorophosphat ([<sup>3</sup>H]-DFP) inkubiert, die Inkubationsansätze gelelektrophoretisch aufgetrennt und markierte Proteine im Autoradiogramm nachgewiesen (Abbildung 8).

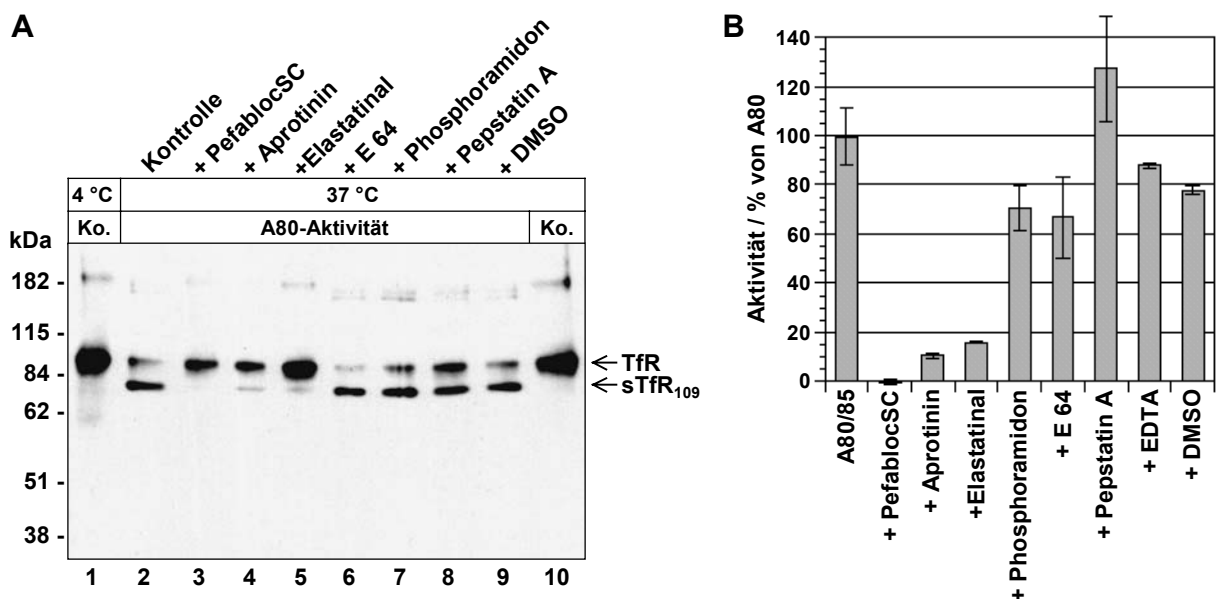


**Abbildung 8: Markierung der proteolytischen Aktivität A80 mit radioaktivem Inhibitor.** Aliquots der mikrosomalen Membranfraktion (MM-Fraktion), dem Durchlauf aus der Hydrophoben-Interaktionschromatographie und der aktiven Fraktion 17 (aus Abbildung 7) wurden mit dem radioaktiv markierten, irreversiblen Serinproteaseinhibitor [<sup>3</sup>H]-Diisopropylfluorophosphat ([<sup>3</sup>H]-DFP) inkubiert, die Inkubationsansätze gelelektrophoretisch aufgetrennt und Proteine mit Silberfärbung detektiert (A) oder markierte Proteine im Autoradiogramm nachgewiesen (B, rechtes Autoradiogramm nach zehnfacher Expositionszeit).

Die in der Silberfärbung der Fraktion 17 prominente Bande mit einer apparenten molekularen Masse von ca. 27 kDa konnte eindeutig mit [<sup>3</sup>H]-DFP markiert werden, was beweist, dass die proteolytische Aktivität, die den TfR spezifisch zum sTfR<sub>109</sub> prozessiert, der Klasse der

<sup>3</sup> Vgl. Fußnote 2, Seite 21

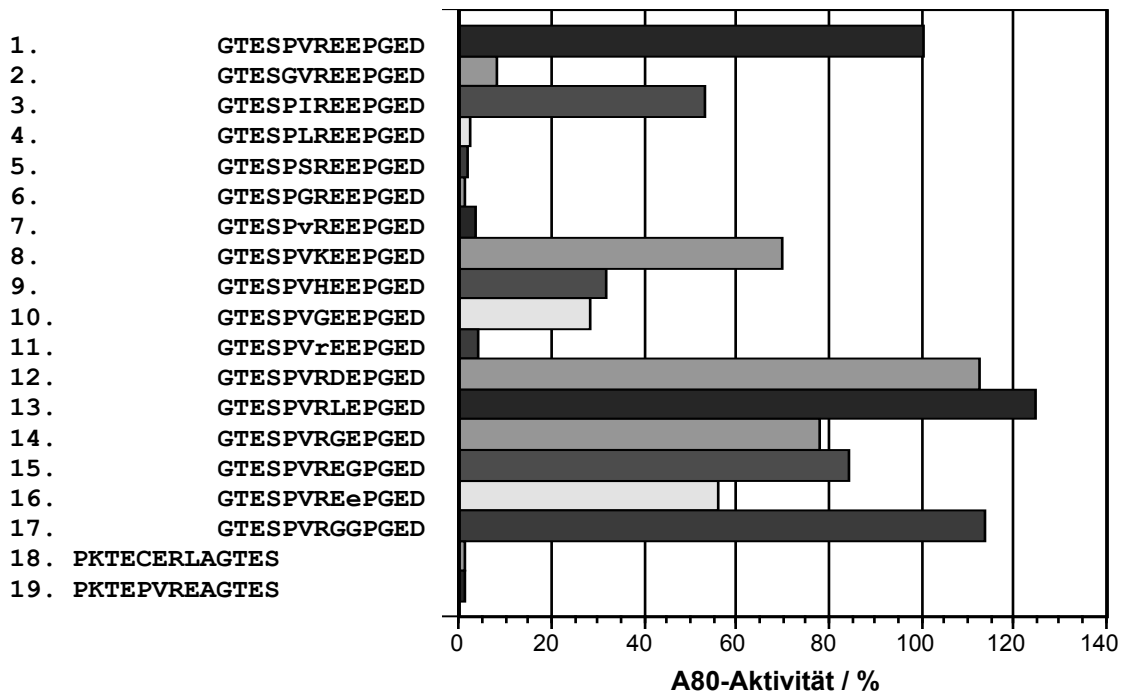
Serinproteasen zuzuordnen ist. Im Durchlauf dagegen waren keine radioaktiv markierten Proteine zu detektieren und in der mikrosomalen Membranfraktion konnte nach zehnmal längerer Expositionszeit des Autoradiogramms die A80-Aktivität festgestellt werden. Obwohl die Reinigung der A80-Aktivität effektiv durchgeführt wurde, konnte die A80-Aktivität weder mittels N-terminaler Sequenzierung noch mittels der Massenspektrometrie (MALDI-TOF) direkt identifiziert werden. Deshalb wurde eine weitere Charakterisierung der A80-Aktivität anhand des Inhibitionsusters verschiedenartiger Proteaseinhibitoren im TfR-Verdauassay durchgeführt (Abbildung 9A). Neben dem TfR-Verdauassay wurde ein kommerziell erhältlicher Proteaseassay eingesetzt, der von der Firma Jerini Biotools entwickelt wurde (Abbildung 9B). In diesem *ProteaseSpot*-Assay werden C-terminal an eine Zellulosemembran gebundene Peptide ausgewählter Sequenz, die N-terminal mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind, proteolytisch gespalten und der freigesetzte Fluoreszenzfarbstoff im Überstand quantifiziert. Für die Detektion der A80-Aktivität wurde ein Peptid ausgewählt, das von Gly-103 bis Asp-112 reicht (P103/13) und damit genau mittig die Val-108-Spaltstelle der A80-Aktivität beinhaltet. Für den *ProteaseSpot*-Assay wurde eine Fraktion aus der Anionenaustauschchromatographie eingesetzt, welche sowohl A80- als auch A85-Aktivität (A80/85) besitzt. Da das getestete Peptid jedoch nicht die Spaltstelle der A85-Aktivität beinhaltet, korreliert die gemessene Aktivität folglich nur mit der A80-Aktivität.



**Abbildung 9: Inhibition der A80-Aktivität durch Serinproteaseinhibitoren.** (A) Im TfR-Verdauassay wurde humaner plazentaler TfR mit gereinigter A80-Aktivität versetzt und in Anwesenheit verschiedener Proteaseinhibitoren für 18 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben in der reduzierenden SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot mit OKT9 analysiert. (B) Im *ProteaseSpot*-Assay wurden Peptidspots (P103/13) der TfR-Sequenz von Gly-103 bis Asp-112 (GTESPVREEPGED) mit A80/85-Aktivität in Anwesenheit verschiedener Proteaseinhibitoren für 5 h bei 37 °C inkubiert und im Überstand der freigesetzte Fluoreszenzfarbstoff quantifiziert. Konzentrationen der eingesetzten Inhibitoren waren: PefablocSC 540 µM, Aprotinin 40 µM, Elastatinal 170 µM, E64 30 µM, Phosphoramidon 75 µM, Pepstatin A 60 µM, EDTA 230 µM und DMSO 0,5 % (v/v). Dargestellt sind die gemittelten Werte aus drei unabhängigen Experimenten und deren S.A.M.

Im TfR-Verdauassay konnte die A80-Aktivität eindeutig durch die Serinproteaseinhibitoren PefablocSC, Aprotinin und Elastatinal inhibiert werden, während der Cysteinproteaseinhibitor E64, der Metalloproteaseinhibitor Phosphoramidon und der Aspartatproteaseinhibitor Pepstatin A keinen Einfluss auf die Bildung von sTfR<sub>109</sub> hatten. Der Anteil an ungeschnittenem TfR nahm jedoch nicht in allen Verdauansätzen in dem Maße ab wie der Anteil an sTfR<sub>109</sub> anstieg, was wahrscheinlich auf eine unspezifische Degradation des TfR zurückzuführen ist. Im *ProteaseSpot*-Assay konnte die Sensitivität der A80-Aktivität gegenüber Serinproteaseinhibitoren bestätigt werden, während Inhibitoren anderer Proteaseklassen keinen signifikanten Einfluss hatten. Hier wurde zusätzlich der metalloproteaseinhibierende Komplexbildner zweiwertiger Metallionen EDTA getestet, der ebenfalls keine hemmende Wirkung zeigte.

Mit Hilfe des *ProteaseSpot*-Assays wurden im folgenden Experiment die Substratanforderungen der A80-Aktivität ermittelt. Im Substratpeptid P103/13 wurden die Positionen P2 bis P3' (s. Glossar, Kapitel 7) bezüglich der Val-108-Schnittstelle substituiert und Änderungen in der A80-Aktivität gegenüber diesen Peptiden quantifiziert. Um zu untersuchen, ob die A80-Aktivität zusätzlich zur Val-108-Schnittstelle ebenfalls die Hauptschnittstelle der TfR-Sheddingprotease nach Arg-100 erkennt, wurde ein Peptid getestet, das mit den Aminosäuren Pro-94 bis Ser-106 (P94/13) die Arg-100-Schnittstelle des TfR umfasst. Eingesetzt wurden Fraktionen aus der HIC-Chromatographie, die ausschließlich sTfR<sub>109</sub> generierten (Abbildung 10).



**Abbildung 10: Charakterisierung der A80-Schnittstelle.** *ProteaseSpot*-Assay mit P103/13 Peptid (Spur 1), mit modifizierten P103/13 Peptiden (Spuren 2–17), mit Peptid P94/13 (Spur 18) und modifiziertem Peptid P94/13 als Substrate für die gereinigte A80-Aktivität. Substitutionen sind unterstrichen und D-Aminosäuren sind als Kleinbuchstaben gekennzeichnet. Die gemessene Aktivität gegenüber nichtmodifiziertem Peptid P103/13 wurde zu 100 % gesetzt.

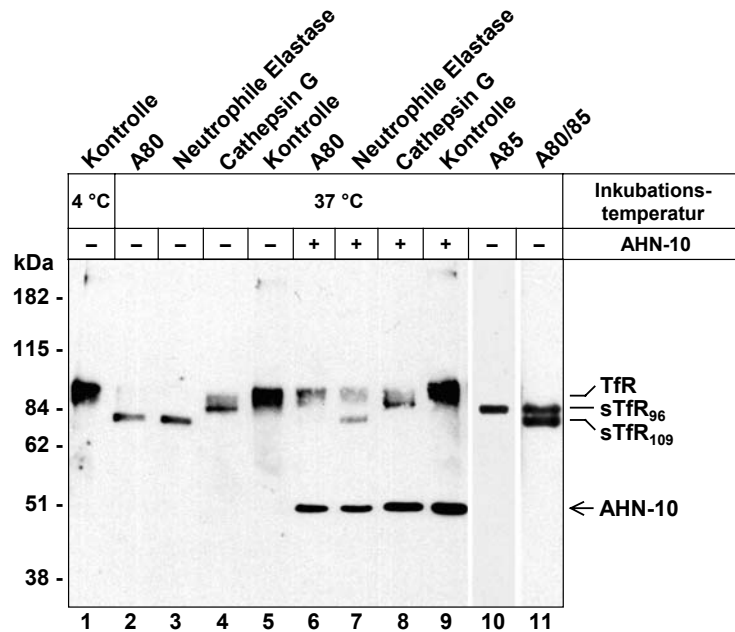


Die Substitution der Aminosäure Prolin in P2-Position durch Glycin verringerte die Proteolyse des Peptides auf unter 10 % (Peptid 2), so dass Prolin eine essentielle Rolle in dieser Position zugeschrieben werden kann. Die P1-Aminosäure Valin wurde jeweils ersetzt durch Isoleucin, Leucin, Serin, Glycin oder D-Valin (Peptide 3 bis 7). Hierbei verringerte sich die Spaltung des Peptides durch den Ersatz zu Isoleucin auf 50 %, während alle anderen Substitutionen zu einem vollständigen Ausbleiben der Spaltung führten. Arginin in P1'-Position wurde jeweils durch Lysin, Histidin und Glycin substituiert (Peptide 8 bis 10). In dieser Reihenfolge wurde die Spaltung von 70 % bis auf fast 20 % reduziert, was darauf hindeutet, dass eine positive Ladung die Erkennung der Schnittstelle durch die A80-Aktivität unterstützt. Die Änderung des Arginin in P1' zu seinem D-Enantiomer (Peptid 11) führte zu einem fast vollständigen Ausbleiben der Spaltung. Der Austausch der Aminosäuren in P2'- und P3'-Position führte nur bei der Substitution des L-Glutamats zu seiner D-Form (Peptid 16) zu einer ungefähr 50%igen Reduktion der Spaltung. Erwartungsgemäß wurde das Peptid P94/13 nicht durch die A80-Aktivität gespalten (Peptid 18). Jedoch konnte selbst durch die Einführung der vier Aminosäuren in P2- bis P2'-Position aus der Val-108 Schnittstelle eine Aktivität gegenüber dem Peptid P94/13 nicht erreicht werden, was darauf hindeutet, dass diese vier Aminosäuren nicht ausreichen, die Spezifität der A80-Aktivität festzulegen (Peptid 19).

Die bis hierhin beschriebenen Untersuchungsergebnisse (molekulare Masse, Inhibitorprofil sowie Substratanforderungen) legten die Möglichkeit nahe, dass es sich bei der A80-Aktivität um die Serinprotease Neutrophile Elastase handeln könnte. Um diese Vermutung zu verifizieren, wurde ein für Neutrophile Elastase spezifischer Antikörper (AHN-10) eingesetzt, der die native, katalytische Domäne des Enzyms erkennt und durch Bindung diese zu blockieren vermag. Tatsächlich ließ sich dieser Antikörper (i) als hochspezifischer Inhibitor für die A80-Aktivität und (ii) zur Depletion der A80-Aktivität mittels Immunpräzipitation einsetzen (s. unten).

Für die Identifizierung der A85-Aktivität gab es folgende Hinweise: Das Inhibitionsmuster der A85-Aktivität gleicht dem Inhibitionsmuster der A80-Aktivität, da in Inhibitionsexperimenten mit nicht getrennten Aktivitäten A80/85 bei einer Inhibition der A80-Aktivität in keinem Fall das Produkt der A85-Aktivität beobachtet werden konnte. Wäre ein Inhibitor der A80-Aktivität nicht ebenfalls gegen die A85-Aktivität wirksam gewesen, hätte man folglich den sTfR<sub>96</sub> beobachten können, da die Überlagerung der A85-Aktivität durch die A80-Aktivität inhibiert worden wäre. Die Schnittstellenspezifität, welche sich aus der ermittelten Schnittstelle durch Sequenzierung des sTfR<sub>96</sub> ergibt, zeigt, dass Lysin in P1-Position offensichtlich eine wichtige Rolle spielt, während dagegen Arginin in P1-Position weniger wichtig zu sein scheint, da bei Arg-100 kein Spaltprodukt des TfR im TfR-Verdauassay detektiert wurde. Eine Voraussetzung für diese Schlussfolgerung ist jedoch, dass Aminosäuren in anderen als der P1-Position keine entscheidene Bedeutung für die Schnittstellenspezifität der Protease haben. Die Bevorzugung der basischen Aminosäure

Lysin in P1-Position, während dagegen die ähnliche Aminosäure Arginin keine Rolle für die Schnittstellenerkennung spielt, ist ungewöhnlich für Serinproteasen, wurde jedoch für die Serinprotease Cathepsin G beschrieben (Powers *et al.*, 1989). Sowohl Neutrophile Elastase als auch Cathepsin G sind kommerziell in gereinigter Form erhältlich und wurden im TfR-Verdau auf ihre Spezifität gegenüber TfR getestet (Abbildung 11).



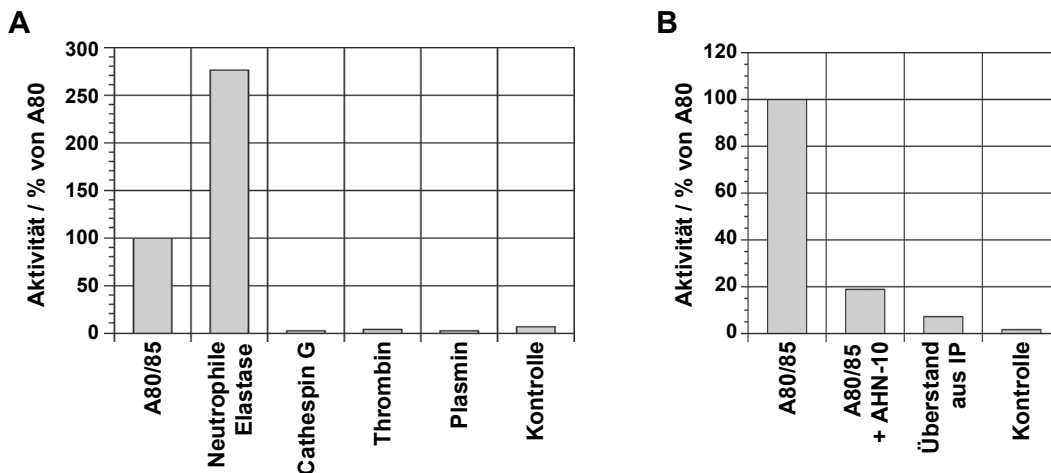
**Abbildung 11: TfR-Verdauassay mit Neutrophiler Elastase und Cathepsin G.** Gereinigter plazentaler TfR wurde mit den isolierten Aktivitäten A80, A85, A80/85, Neutrophiler Elastase oder Cathepsin G für 18 h bei 37 °C inkubiert. Der neutrophile-elastase-inhibierende Antikörper AHN-10 wurde den Inkubationsansätzen in den Spuren 6 bis 9 zugesetzt. Die Proben wurden in der reduzierenden SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot mit OKT9 analysiert. AHN-10-Antikörper wurde durch den sekundären Anti-Mausantikörper detektiert.

Das TfR-Fragment, das von Neutrophiler Elastase generiert wurde, entspricht in seiner apparenten molekularen Masse dem 80-kDa-TfR-Fragment (sTfR<sub>109</sub>), während Cathepsin G ein TfR-Fragment erzeugte, das dem 85-kDa-TfR-Fragment (sTfR<sub>96</sub>) entspricht. Durch N-terminale Sequenzierung der von Neutrophiler Elastase und Cathepsin G generierten TfR-Fragmente konnte die Identität dieser Fragmente eindeutig festgestellt werden<sup>4</sup>. Des Weiteren konnte durch Zugabe des neutrophile-elastase-inhibierenden AHN-10-Antikörpers sowohl die A80-Aktivität als auch erwartungsgemäß Neutrophile Elastase inhibiert werden. Auf die Bildung des 85-kDa-Fragmentes durch Cathepsin G hatte der AHN-10-Antikörper hingegen keinen Einfluss.

Einen weiteren Hinweis, dass es sich bei der A80-Aktivität um Neutrophile Elastase handelt, zeigte sich darin, dass Neutrophile Elastase eine Aktivität gegenüber dem Peptid P103/13 des *ProteaseSpot*-Assay besaß. Dagegen zeigten Cathepsin G, Thrombin und Plasmin keine proteolytische Aktivität gegenüber diesem Peptid (Abbildung 12A). Der abschließende

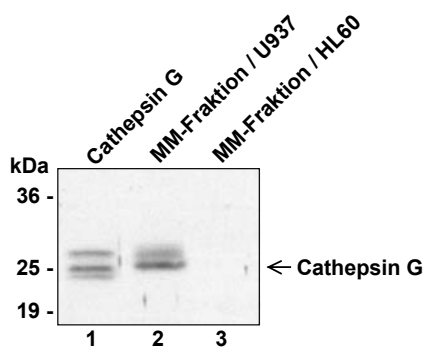
<sup>4</sup> vgl. Fußnote 2, Seite 21

Beweis der Identität der A80-Aktivität mit Neutrophiler Elastase, wurde durch Immunpräzipitation mit dem neutrophile-elastase-spezifischen Antikörper AHN-10 erbracht. Aus einer A80/85-aktiven Fraktion der Anionenaustauschchromatographie wurde die A80-Aktivität zunächst mit AHN-10 inhibiert und anschließend mittels eines sepharose-gebundenen Anti-Mausantikörpers depletiert (Abbildung 12B). Ein direkter Nachweis im Westernblot war nicht möglich, da AHN-10 denaturierte Neutrophile Elastase nicht erkennt und alternative Antikörper nicht zur Verfügung standen.



**Abbildung 12: AHN-10 depletiert A80-Aktivität.** (A) Die Reaktivität der bezeichneten Proteasen wurde im *ProteaseSpot*-Assay gegenüber Peptid P103/13 quantifiziert. (B) Ein Aliquot der A80/85-Aktivität aus der Anionenaustauschchromatographie wurde mit AHN-10 (20 µg/ml) versetzt. Anschließend wurde eine Hälfte dieses Ansatzes direkt im *ProteaseSpot*-Assay gemessen und von der anderen nach Immunpräzipitation mit Anti-Mausantikörpern der entsprechende Überstand im *ProteaseSpot*-Assay getestet. Zur Kontrolle wurde das Peptid nur mit Inkubationspuffer inkubiert.

Der Nachweis, dass es sich bei der A85-Aktivität tatsächlich um Cathepsin G handelt, konnte mit einem polyklonalen Anti-Cathepsin-G-Antikörper geführt werden, der denaturiertes Cathepsin G im Westernblot detektiert (Abbildung 13).



**Abbildung 13: Mikrosomale Membranen von U937-Zellen enthalten Cathepsin G.** Mikrosomale Membranfraktionen von U937- und HL60-Zellen und Cathepsin G wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran gebロットet und Cathepsin G mit einem spezifischen Anti-Cathepsin-G-Antikörper nachgewiesen.

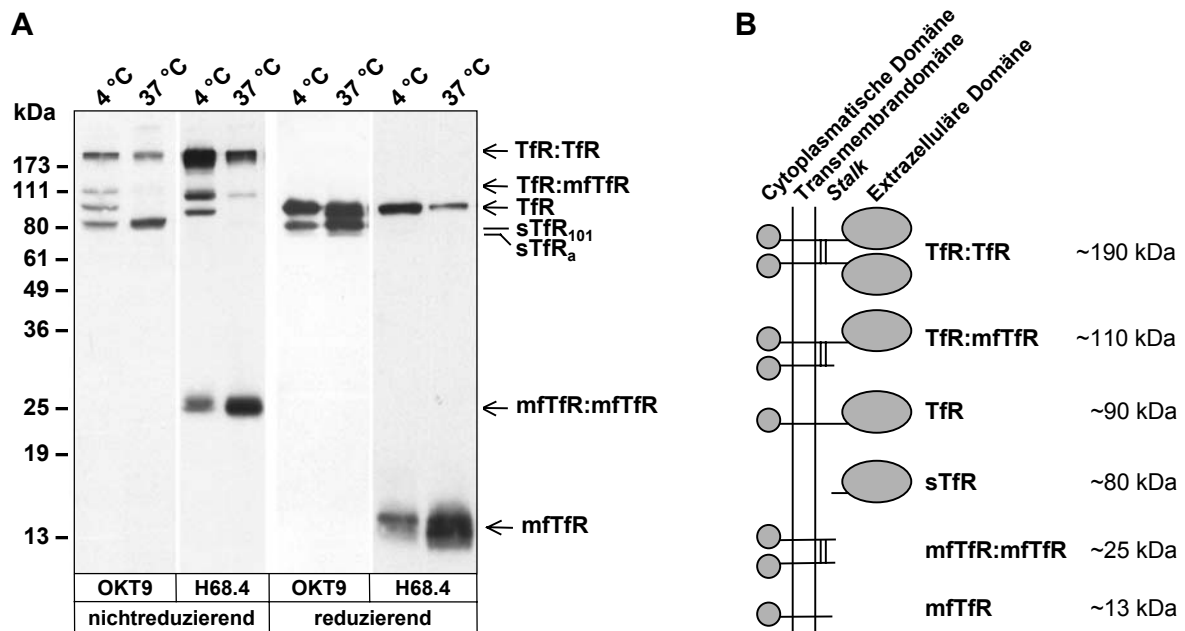
Der Vergleich von gereinigtem Cathepsin G mit der mikrosomalen Membranfraktion von U937-Zellen im Anti-Cathepsin-G-Westernblot zeigte eindeutig, dass mikrosomale Membranen von U937-Zellen tatsächlich Cathepsin G enthalten. Da in solubilisierten Membranen von HL60-Zellen weder A80-Aktivität noch A85-Aktivität nachgewiesen werden konnte, wurde in diesen Membranen erwartungsgemäß kein Cathepsin G detektiert.

### 3.2 Charakterisierung einer bei Arg-100 TfR-spaltenden proteolytischen Aktivität

Im TfR-Verdauassay konnte keine Aktivität beobachtet werden, die solubilisierten TfR an der Hauptschnittstelle der TfR-Sheddingprotease bei Arg-100 schneidet. Bereits in früheren Berichten wurde beobachtet, dass Sheddingprozesse von der intakten Membranstruktur abhängig sind, da durch Solubilisierung des membranständigen Substrates oder der beteiligten Protease Sheddingprozesse vollständig inhibiert werden können (Roberts *et al.*, 1994; Parvathy *et al.*, 1997). Deshalb wurde ein Assay entwickelt, in dem das Shedding des endogenen TfR in nicht solubilisierter, membranständiger Form untersucht werden kann. Als Untersuchungsobjekt wurden HL60-Zellen ausgewählt, da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass sie den bei Arg-100 geschnittenen sTfR<sub>101</sub> in relativ hoher Konzentration ins Zellkulturmedium freisetzen (s. Abbildung 3).

#### 3.2.1 Nachweis von TfR-Fragmenten in HL60-Zellmembranen

TfR-enthaltende mikrosomale Membranen von HL60-Zellen wurden entweder bei 4 °C oder bei 37 °C für 18 h inkubiert und gelelektrophoretisch unter reduzierenden oder nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Anschließend wurde TfR im Westernblot mit OKT9, der gegen die extrazelluläre Domäne gerichtet ist, oder H68.4, der die intrazelluläre Domäne erkennt, detektiert (Abbildung 14).

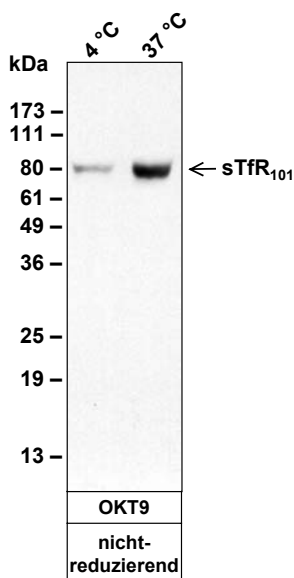


**Abbildung 14: Sechs TfR-Formen erscheinen in mikrosomalen Membranen von HL60-Zellen.** (A) mikrosomale Membranfraktionen von HL60-Zellen wurden für 18 h bei 4 °C oder 37 °C inkubiert, mittels SDS-PAGE unter nichtreduzierenden oder reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und im Westernblot mit gegen die extrazelluläre Domäne (OKT9) oder cytoplasmatische Domäne (H68.4) gerichteten Antikörpern analysiert. (B) Schematische Darstellung der detektierten TfR-Formen.

Insgesamt konnten sechs TfR-Formen nachgewiesen werden, die nach ihren apparenten molekularen Massen und ihren Sensitivitäten gegenüber den epitopspezifischen Antikörpern OKT9 und H68.4 folgendermaßen zugeordnet werden können: ~190 kDa Dimer des TfR (TfR:TfR), ~110 kDa Dimer des TfR, dem eine extrazelluläre Domäne fehlt (TfR:mfTfR), ~90 kDa Monomer des TfR (TfR), ~80 kDa löslicher TfR (sTfR<sub>101</sub>), ~25 kDa Dimer des TfR, dem beide extrazellulären Domänen fehlen (mfTfR:mfTfR) und ~13 kDa monomeres Membranfragment (mfTfR). sTfR wurde nicht von H68.4 detektiert, was zeigt, dass dieses Fragment N-terminal verkürzt ist. Die TfR-Formen dagegen, die nur Membranfragment enthalten, sind C-terminal verkürzt, da diese nicht mit OKT9 zu detektieren waren. Nach Inkubation bei 37 °C verringerte sich erwartungsgemäß die Menge der TfR-Formen, die unverkürzten TfR enthalten (TfR:TfR, TfR:mfTfR und TfR), während gleichzeitig der Anteil an gespaltenen TfR-Fragmenten (sTfR, mfTfR:mfTfR und mfTfR) zunahm.

### 3.2.2 TfR-Freisetzungssassay

Zur Untersuchung, welche der oben nachgewiesenen TfR-Formen von den Membranen nach Inkubation bei 37 °C freigesetzt werden, wurden die HL60-Membranen für 18 h bei 4 °C oder 37 °C inkubiert, anschließend durch Zentrifugation pelletiert und der Überstand im Westernblot analysiert (Abbildung 15).

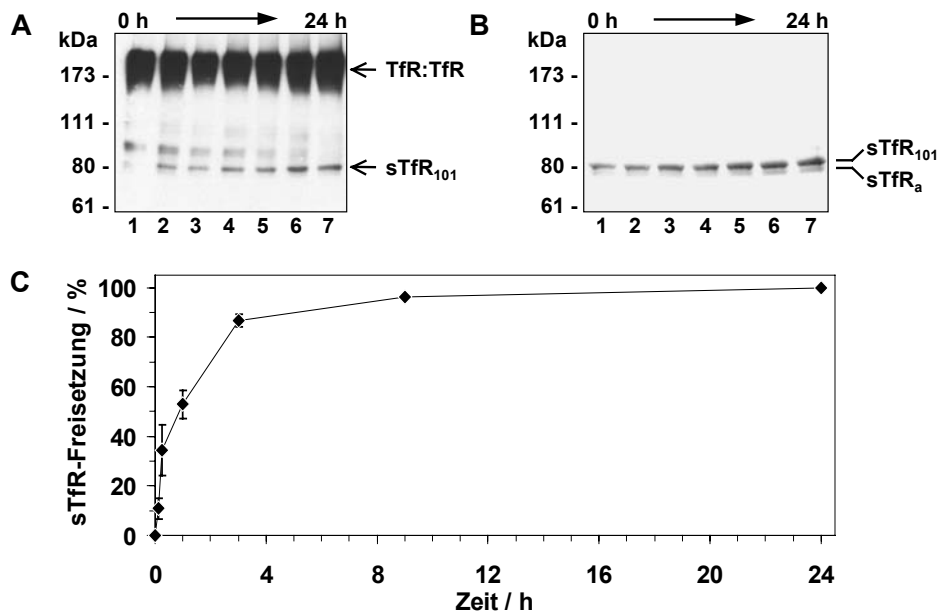


**Abbildung 15: sTfR-Freisetzungssassay.** Mikrosomale HL60-Zellmembranen wurden für 18 h bei 4 °C und 37 °C inkubiert, anschließend durch Zentrifugation (20 800 × g, 15 min, 4 °C) die Membranen pelletiert und der Überstand mittels SDS-PAGE unter nichtreduzierenden Bedingungen aufgetrennt und mit OKT9 im Westernblot detektiert.

Von allen TfR-Formen, die in HL60-Membranen detektiert wurden (Abbildung 14), konnte im Überstand der inkubierten Membranen einzig der sTfR<sub>101</sub> und sTfR<sub>a</sub> nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass der sTfR<sub>101</sub> tatsächlich eine lösliche Form des TfR darstellt, während alle anderen nachgewiesenen Formen membrangebunden sind. Bereits bei einer 4 °C-Inkubation konnte eine Freisetzung des sTfR<sub>101</sub> festgestellt werden, die bei 37 °C um ungefähr das Fünffache anstieg. Zur Bestimmung der exakten Spaltstelle wurde der sTfR<sub>101</sub> aus dem Überstand von bei 37 °C inkubierten HL60-Zellmembranen mittels Affinitäts-

chromatographie an Transferrinsepharose gereinigt. Der N-Terminus konnte durch Aminosäuresequenzierung, beginnend mit Leu-101, bestimmt werden. Dies beweist die Identität des sTfR<sub>101</sub> mit der Hauptform des sTfR im humanen Serum, welche durch eine Spaltung zwischen Arg-100 / Leu-101 generiert wird (Shih *et al.*, 1990). Aus diesem Grund stellt der sTfR-Freisetzungssassay eine ideale Methode dar, um die TfR-Sheddingprotease in einem zellnahen System zu untersuchen. Hierbei sind einige Vorteile des sTfR-Freisetzungssassays gegenüber einem Zellsystem herauszustellen. Die Untersuchung der TfR-Sheddingprotease kann ohne Einfluss auf die Synthese und das intrazelluläre *Trafficking* des TfR erfolgen, so dass eine beobachtete Inhibition der sTfR-Freisetzung direkt auf eine Inhibition der TfR-Sheddingprotease oder eines möglichen Kofaktors zurückgeführt werden kann. Weiterhin ist das am TfR-Shedding beteiligte Enzymsystem besser zugänglich für Inhibitoren als ein Zellsystem.

Freigesetzter sTfR<sub>101</sub> wurde anhand der Chemolumineszenzsignale des Westernblots lumino-metrisch quantifiziert. Für die Auswertung wurde die sTfR-Freisetzung bei 4 °C als 0 % festgelegt und die sTfR-Freisetzung nach 37 °C-Inkubation der Kontrolle als 100 %. Zunächst wurde die zeitabhängige Freisetzung des sTfR<sub>101</sub> bei 37 °C in einem Zeitraum von 0 bis 24 h bestimmt. Anschließend wurden entweder direkt die inkubierten Membranen (Abbildung 16A) oder der Überstand der pelletierten Membranen (Abbildung 16B) in einer nichtreduzierenden SDS-PAGE aufgetrennt und TfR mit OKT9 im Westernblot detektiert. Die Quantifizierung der sTfR-Freisetzung erfolgte nach Pelletierung der inkubierten Membranen durch Messung der Chemolumineszenz (Abbildung 16C).



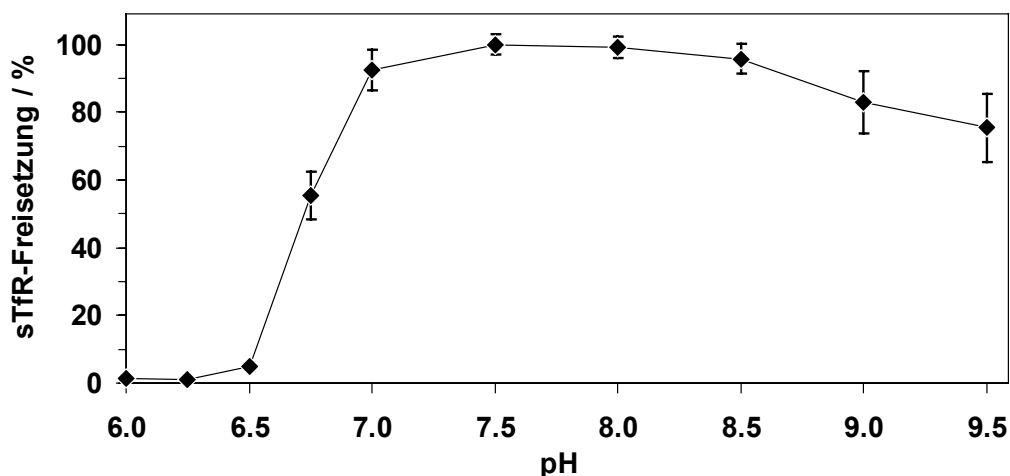
**Abbildung 16: Kinetik der sTfR-Freisetzung.** HL60-Zellmembranen wurden bei 37 °C über einen Zeitraum von 0 bis 24 h inkubiert. (A) Inkubierte HL60-Membranen wurden unter nichtreduzierenden Bedingungen gelelektrophoretisch aufgetrennt und TfR im Westernblot mit OKT9 detektiert. (B) Der Überstand aus inkubierten HL60-Membranen wurde nach Zentrifugation (20 800 × g, 15 min, 4 °C) wie unter A analysiert. (C) Die Freisetzung des sTfR<sub>101</sub> wurde durch Detektion der Chemolumineszenz mit Hilfe eines FujiFilm LAS-1000 Systems quantifiziert. Die dargestellten Daten beziehen sich auf zwei unabhängige Experimente mit S.A.M.

Die Bestimmung der zeitlichen Abhängigkeit der sTfR-Freisetzung aus HL60-Zellmembranen zeigt, dass bereits nach einer Stunde die Hälfte des innerhalb von 24 h freigesetzten sTfR<sub>101</sub> freigesetzt wurde. Die Freisetzung strebt im Weiteren sehr schnell einem Grenzwert zu, obwohl die Menge an zellgebundenem TfR über diesen Zeitraum nicht abnimmt, wie Abbildung 16A zeigt. Die TfR-Sheddingprotease besitzt bei 37 °C folglich nur eine limitierte Stabilität in den HL60-Zellmembranen.

Neben der Hauptform des sTfR (sTfR<sub>101</sub>) wurde ein TfR-Fragment detektiert, welches eine etwas kleinere apparente molekulare Masse als der sTfR<sub>101</sub> zeigte (Abbildung 16B). Dieser „alternative“ sTfR (sTfR<sub>a</sub>) erschien in der Regel analog zum sTfR<sub>101</sub>, aber in einem wesentlich kleineren Anteil. Er wurde bei der Quantifizierung des sTfR-Freisetzung jedoch nicht berücksichtigt.

### 3.2.3 pH-Abhängigkeit des TfR-Sheddingprozesses

Die pH-Abhängigkeit des TfR-Sheddingprozesses wurde untersucht, indem isolierte HL60-Zellmembranen mit 20 800 × g pelletiert, in Puffern verschiedener pH-Werte resuspendiert und für 18 h bei 37 °C inkubiert wurden. Anschließend wurde die sTfR-Freisetzung wie im Abschnitt 3.2.2 beschrieben quantifiziert (Abbildung 17).



**Abbildung 17: pH-Abhängigkeit des TfR-Sheddingprozesses.** HL60-Zellmembranen wurden mittels Zentrifugation (20 800 × g, 15 min, 4 °C) pelletiert, in Puffern der angegebenen pH-Werte resuspendiert und für 18 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die sTfR-Freisetzung wie im Abschnitt 3.2.2 beschrieben analysiert und quantifiziert. Die Daten wurden aus vier unabhängigen Experimenten mit S.A.M. ermittelt.

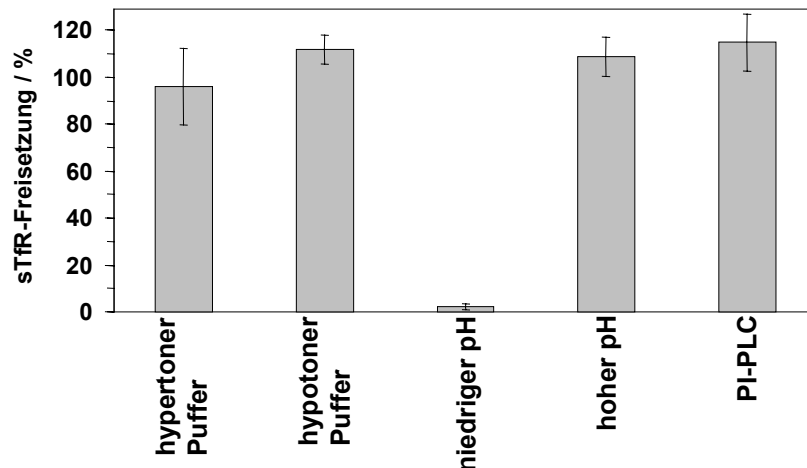
Die ermittelte pH-Abhängigkeit der sTfR-Freisetzung zeigt, dass im sauren pH unterhalb von 6,5 die TfR-Sheddingprotease praktisch nicht aktiv ist; oberhalb von pH 6,5 steigt die Aktivität bis zu einem Optimum bei pH 7,5 stark an und fällt dann im basischen pH-Bereich wieder leicht ab. Die maximale Aktivität bei pH 7,5 deutet an, dass der Sheddingprozess entweder in einem neutralen Zellkompartiment oder auf der Zelloberfläche stattfindet und gibt einen Hinweis, zu welcher Proteaseklasse die TfR-Sheddingprotease gehören könnte. So sind Aspartylproteasen im Allgemeinen im sauren pH-Bereich aktiv, Metalloproteasen dagegen im

neutralen oder basischen pH, während Serin- und Cysteinproteasen über einen weiten pH-Bereich aktiv sein können (Barrett *et al.*, 1998).

### 3.2.4 Integral vermittelte Membranverankerung

Nach mehreren Waschschritten der HL60-Zellmembranen mit detergensfreiem Puffer blieb die sTfR-Freisetzung der Membranen vollständig erhalten. Die TfR-Sheddingprotease und auch mögliche Kofaktoren sind folglich fest an die Membranen gebunden.

Um die Art der Verankerung zu bestimmen, wurden HL60-Zellmembranen unter Bedingungen inkubiert, die zu einer Freisetzung entweder peripherer Membranproteine (hypertoner Puffer, hypotoner Puffer, niedriger oder hoher pH) oder Glycosylphosphatidylinositol-(GPI-) verankerter Membranproteine (phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (PI-PLC)) führten. Anschließend wurden die Membranen gewaschen und die sTfR-Freisetzung wie im Abschnitt 3.2.2 beschrieben quantifiziert (Abbildung 18).



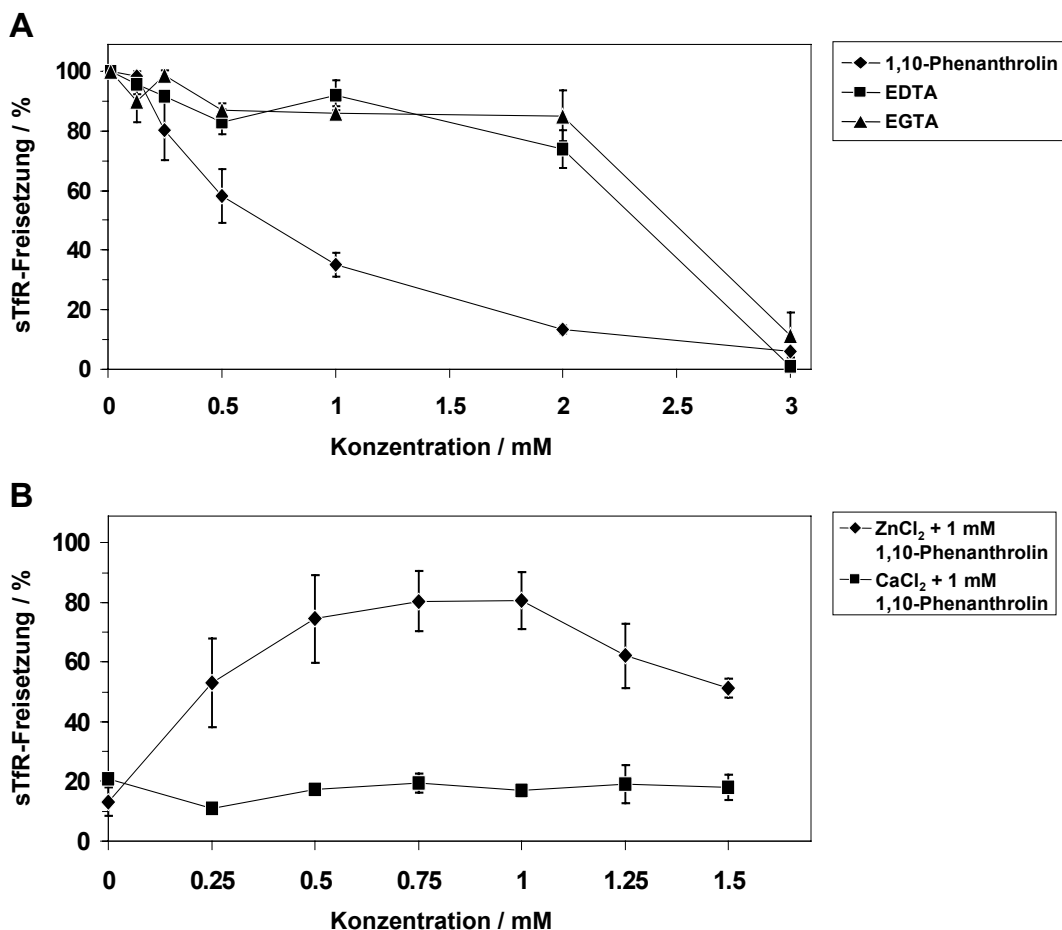
**Abbildung 18: Die Membranverankerung der TfR-Sheddingprotease ist integral vermittelt.** HL60-Zellmembranen wurden für 30 min bei 4 °C entweder in hypertonischem Puffer (1 M NaCl), hypotonischem Puffer (0,015 M NaCl), bei pH 3,3 oder 9,5 inkubiert oder für 30 min bei 37 °C in Gegenwart von phosphatidylinositol-spezifischer Phospholipase C (PI-PLC). Anschließend wurden die Membranen mit PBS gewaschen und die sTfR-Freisetzung im sTfR-Freisetzungssassay quantifiziert. Messwerte wurden gegen Kontrollen, die in PBS unter den entsprechenden Temperaturen und Inkubationszeiten mitgeführt wurden, normiert. Die Daten wurden aus vier unabhängigen Experimenten ermittelt. Eine Ausnahme bildeten die Daten der Messung bei pH 3,3, die aus zwei Experimenten resultieren.

Lediglich die Vorinkubation der Membranen bei niedrigem pH verringerte die sTfR-Freisetzung deutlich. Der Grund hierfür liegt vermutlich eher darin, dass die TfR-Sheddingprotease bei niedrigem pH irreversibel inaktiviert wird, wie es ebenfalls aus den pH-Untersuchungen hervorgeht (s. Abschnitt 3.2.3), als dass die Protease von der Membran gelöst wird, denn unter keiner der anderen Freisetzungsbedingungen wurde eine Verringerung der sTfR-Freisetzungaktivität beobachtet.



### 3.2.5 Inhibition der TfR-Sheddingprotease

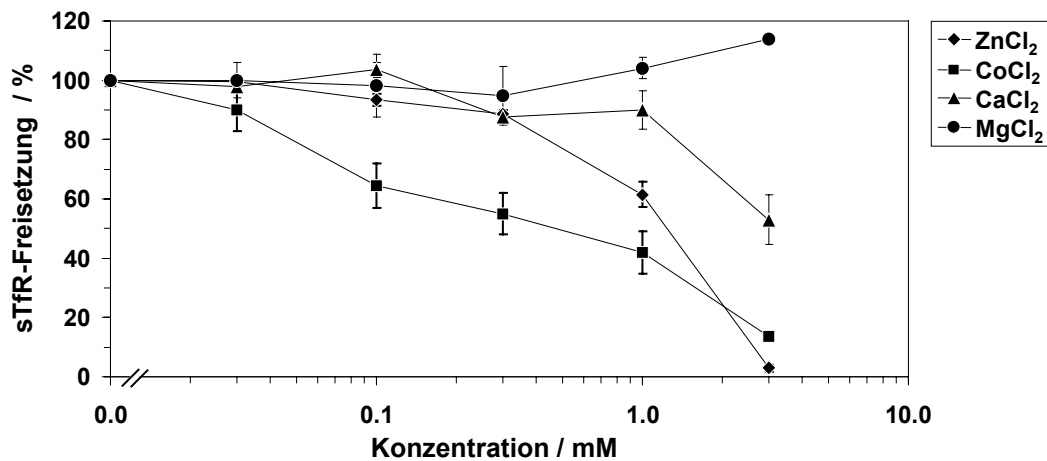
Zur weiteren Charakterisierung der TfR-Sheddingprotease wurde die Wirkung von Proteaseinhibitoren auf die Freisetzung von sTfR<sub>101</sub> aus den HL60-Zellmembranen im sTfR-Freisetzungssassay getestet. Metalloproteasen, deren proteolytische Aktivität durch ein Metallkation im katalytischen Zentrum vermittelt wird, lassen sich durch chelatierende Reagenzien inhibieren, die das Metallkation wirksam zu komplexieren vermögen. Je nach Spezifität der verwendeten Chelatoren, kann man auf die Art der Metalloprotease schließen. EDTA ist ein relativ unspezifischer Metallionenchelator mit sehr ähnlichen Komplexbildungskonstanten für die meisten zweiwertigen Metallkationen. EGTA zeigt gegenüber EDTA eine erhöhte Spezifität für große zweiwertige Metallkationen wie Ca<sup>2+</sup>, während 1,10-Phenanthrolin eine höhere Spezifität gegenüber Übergangsmetallkationen besitzt (Auld, 1995). Die Wirkung dieser Chelatoren wurde konzentrationsabhängig im sTfR-Freisetzungssassay getestet (Abbildung 19A).



**Abbildung 19: Inhibition durch Metallchelatoren.** HL-60 Membranen wurden für 18 h bei 37 °C in Dulbecco's-PBS<sup>++</sup> inkubiert und die sTfR-Freisetzung wie zuvor beschrieben quantifiziert. (A) Chelatoren wurden in den angegebenen Konzentrationen zugesetzt. Die Daten wurden für EDTA und EGTA aus zwei und für 1,10-Phenanthrolin aus drei unabhängigen Experimenten ermittelt. (B) Die Membranen wurden für 5 min bei 4 °C mit 1 mM 1,10-Phenanthrolin vorinkubiert und anschließend ZnCl<sub>2</sub> und CaCl<sub>2</sub> in den angegebenen Konzentrationen zugesetzt. Die Daten für ZnCl<sub>2</sub> stammen aus vier und die für CaCl<sub>2</sub> aus zwei unabhängigen Experimenten mit S.A.M.

Zur Kontrolle, ob die inhibierende Wirkung von 1,10-Phenanthrolin tatsächlich auf seiner komplexierenden Eigenschaften gegenüber Übergangsmetallkationen beruht, wurden Membranen, die mit 1 mM 1,10-Phenanthrolin vorinkubiert wurden, mit verschiedenen Konzentrationen  $\text{ZnCl}_2$  oder  $\text{CaCl}_2$  versetzt und im sTfR-Freisetzungssassay getestet (Abbildung 19B).

Für den generellen Metalloproteaseinhibitor 1,10-Phenanthrolin konnte gezeigt werden, dass dieser die sTfR-Freisetzung dosisabhängig inhibiert. Die weniger spezifischen Metalloproteaseinhibitoren EDTA und EGTA hemmten die sTfR-Freisetzung erst oberhalb einer Konzentration von 2 mM. Diese Konzentration entspricht ungefähr der Gesamtkonzentration von  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen im Inkubationspuffer. Dies zeigt, dass EDTA und EGTA ihre inhibierende Wirkung erst auf die sTfR-Freisetzung ausüben, sobald alle  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen komplexiert sind und EDTA und EGTA nun zusätzlich Übergangsmetallkationen effektiv zu komplexieren vermögen. Die inhibierende Wirkung der getesteten Chelatoren beruht tatsächlich auf ihrer Fähigkeit Übergangsmetalle zu komplexieren, da die Inhibition durch 1,10-Phenanthrolin mit  $\text{Zn}^{2+}$  fast vollständig aufgehoben werden konnte, während eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Zugabe dieses nicht vermochte (Abbildung 19B). Die Beobachtung, dass  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen im Überschuss gegenüber 1,10-Phenanthrolin die sTfR-Freisetzung hemmen, ließ vermuten, dass  $\text{Zn}^{2+}$  selbst als Inhibitor der sTfR-Freisetzung wirken könnte. Um dieses zu untersuchen wurden HL60-Membranen mit  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$  und  $\text{MgCl}_2$  in verschiedenen Konzentrationen versetzt und im sTfR-Freisetzungssassay untersucht (Abbildung 20).

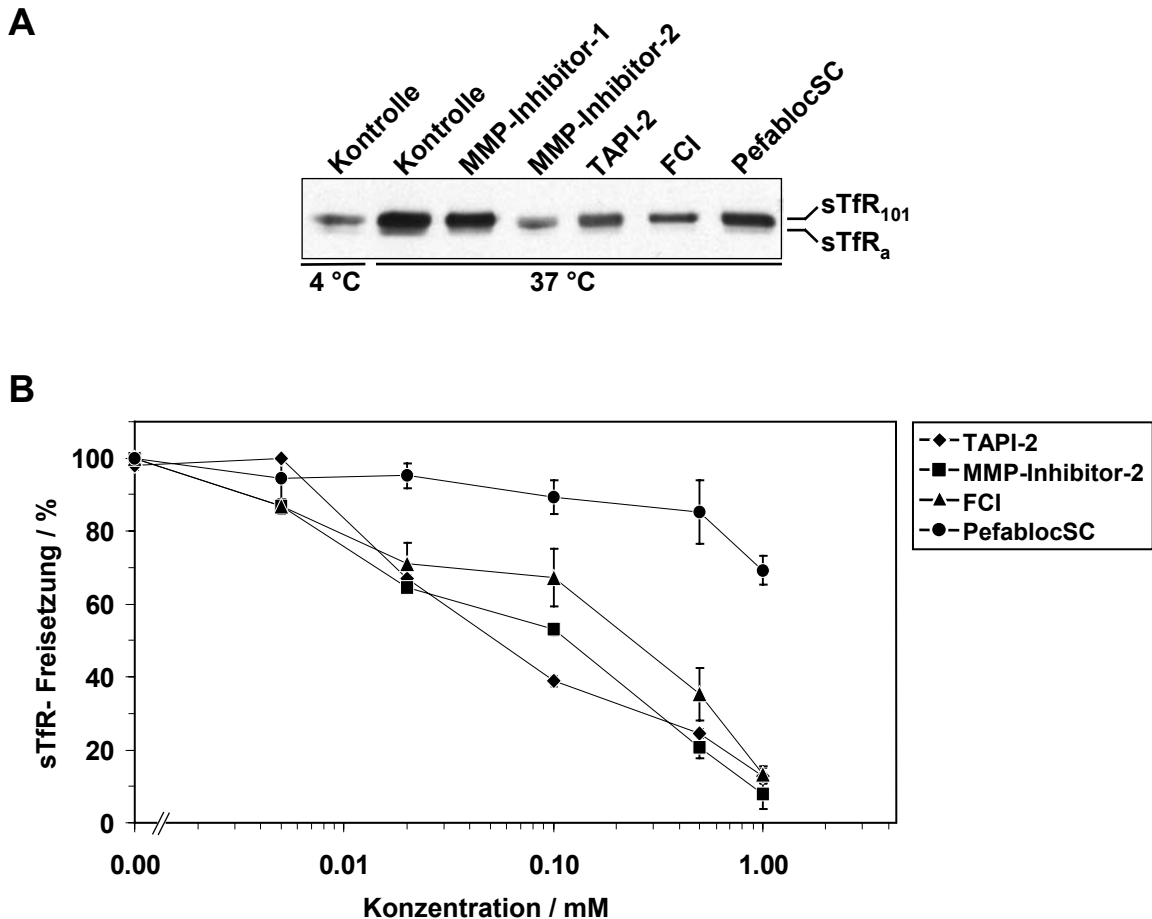


**Abbildung 20: Inhibition der sTfR-Freisetzung durch Übergangsmetalle.** HL60-Zellmembranen wurden für 18 h bei 37 °C in Gegenwart von  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$  und  $\text{MgCl}_2$  in den gekennzeichneten Konzentrationen inkubiert und die sTfR-Freisetzung wie oben beschrieben quantifiziert. Die Daten wurden aus zwei unabhängigen Experimenten mit S.A.M. ermittelt.

Die Daten zeigen, dass  $\text{Zn}^{2+}$ - und  $\text{Co}^{2+}$ -Ionen einen inhibierenden Effekt auf die sTfR-Freisetzung haben, während  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen erst bei hohen Konzentrationen deutlich inhibierend wirken und  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen sogar eine geringfügig stimulierende Wirkung auf die sTfR-Freisetzung ausüben. Die Tatsache, dass  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen in millimolaren Konzentrationen

Metalloproteasen zu inhibieren vermögen, bestätigt die vorhergehenden Experimente (s. Abbildung 19). Diese Wirkung von  $Zn^{2+}$  ist bekannt und im Fall der Carboxypeptidase A wurden die strukturellen Ursachen genau untersucht (Gomez-Ortiz *et al.*, 1997).

Zur weiteren Charakterisierung der TfR-Sheddingprotease als potentielle Metalloprotease wurden spezifischere Proteaseinhibitoren im sTfR-Freisetzungssassay getestet (Abbildung 21).

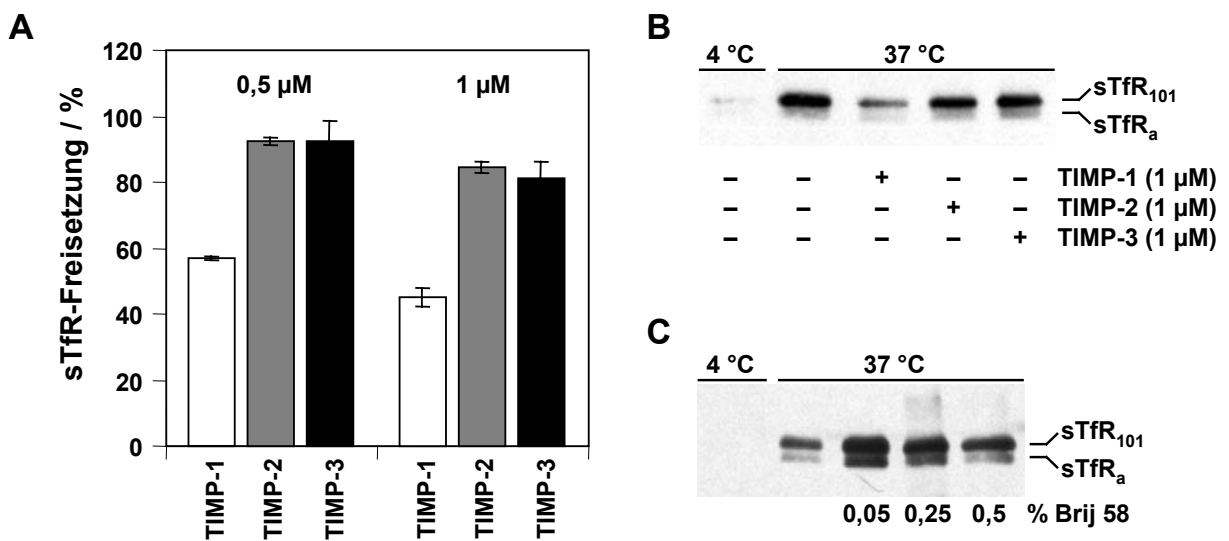


**Abbildung 21: Inhibition der sTfR-Freisetzung mit spezifischen Proteaseinhibitoren.** HL60-Zellmembranen wurden in Gegenwart der bezeichneten Proteaseinhibitoren für 18 h bei 4 °C oder 37 °C inkubiert. (A) Überstände der inkubierten Membranen (Inhibitoren mit 0,1 mM Konzentration) wurden unter nichtreduzierenden Bedingungen im SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot mit OKT9 analysiert. (B) PefablocSC, FCI, MMP-Inhibitor-2 und TAPI-2 wurden in den bezeichneten Konzentrationen im sTfR-Freisetzungssassay getestet. Die Daten wurden aus zwei unabhängigen Experimenten mit S.A.M. ermittelt.

Ein Inhibitor, der für die Blockierung von Matrixmetalloproteinasen entwickelt wurde (MMP-Inhibitor-1), zeigte keinen signifikanten Effekt, während MMP-Inhibitor-2 und TAPI-2, ein Inhibitor, der das Shedding von  $TNF\alpha$  hemmt, die sTfR-Freisetzung aus HL60-Membranen dosisabhängig reduzierten. Die aktive Gruppe des MMP-Inhibitor-2 und des TAPI-2 besteht aus einer Hydroxamsäure, die an das aktive  $Zn^{2+}$  von Metalloproteasen der MMP- oder ADAM-Familie bindet (Pikul *et al.*, 1998; Ramchandran und Sen, 1995). Da einige MMPs und ADAMs durch Furin oder eine andere furinähnliche Proproteinconvertase aktiviert werden können, wurde ein Furinproproteinconvertase-Inhibitor (FCI) auf seinen

Einfluss auf die sTfR-Freisetzung aus HL60-Zellmembranen getestet. FCI zeigte im sTfR-Freisetzungssassay ebenfalls eine dosisabhängige Inhibition der sTfR-Freisetzung. Der allgemeine Serinproteaseinhibitor PefablocSC zeigte dagegen erst bei höheren Konzentrationen eine inhibierende Wirkung. Dies könnte darin begründet sein, dass Serinproteaseinhibitoren wie DFP und PMSF, die ein ähnliches Inhibitionsspektrum besitzen wie PefablocSC, einen geringfügigen Effekt auf Furin haben (Hatsuzawa *et al.*, 1992).

Da die oben beschriebenen Inhibitionsexperimente auf eine Beteiligung von Metalloproteasen aus den Familien der MMPs oder ADAMs hinwiesen, wurden spezifische, natürliche Inhibitoren dieser Proteasfamilien – die so genannten TIMPs (*tissue inhibitor of metalloproteinases*) – auf ihre Wirkung im sTfR-Freisetzungssassay getestet (Abbildung 22).



**Abbildung 22: Inhibition der sTfR-Freisetzung durch TIMP-1.** HL60-Zellmembranen wurden für 18 h bei 4 °C oder 37 °C inkubiert und die Überstände in der nichtreduzierenden SDS-PAGE und einem nachfolgenden Westernblot mit OKT9-Detektion analysiert. (A) Die sTfR-Freisetzung erfolgte in Gegenwart von TIMPs in den bezeichneten Konzentrationen und wurde im sTfR-Freisetzungssassay quantifiziert. Die Daten wurden aus zwei unabhängigen Experimenten mit S.A.M. ermittelt. Jeweils ein Westernblot für ein Freisetzungsexperiment (B) mit TIMPs in 1 µM Konzentration und (C) in Gegenwart von Brij 58 in den bezeichneten Konzentrationen ist beispielhaft gezeigt.

TIMP-1 zeigte in diesen Freisetzungsexperimenten einen signifikanten, inhibierenden Effekt, der in einer Konzentration von 0,5 µM ungefähr 45 % beträgt und bei 1 µM ungefähr 55 %. Für TIMP-2 und TIMP-3 wurde dagegen nur ein geringfügig inhibierender Effekt festgestellt. Die hier dargestellten Daten wurden für jeweils eine bestimmte TIMP-Charge ermittelt, da verschiedene TIMP-Chargen in unterschiedlichen Proteinkonzentrationen in einem detergenshaltigen Puffer kommerziell bereitgestellt werden. Das bedeutet, dass zur Erzielung einer bestimmten TIMP-Konzentration je Experiment verschiedene Detergenskonzentrationen in den Versuchsansätzen vorliegen. Aus einer Versuchsreihe, in der niedrige Konzentrationen des Detergens' Brij 58 eingesetzt wurden (Abbildung 22C), zeigte sich, dass diese in einem Bereich, wie sie in den TIMP-Inhibitionsversuchen vorliegen (0,05 %), die sTfR-Freisetzung

aus den Zellmembranen deutlich stimulieren. Die Ergebnisse aus allen Inhibitorexperimenten sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

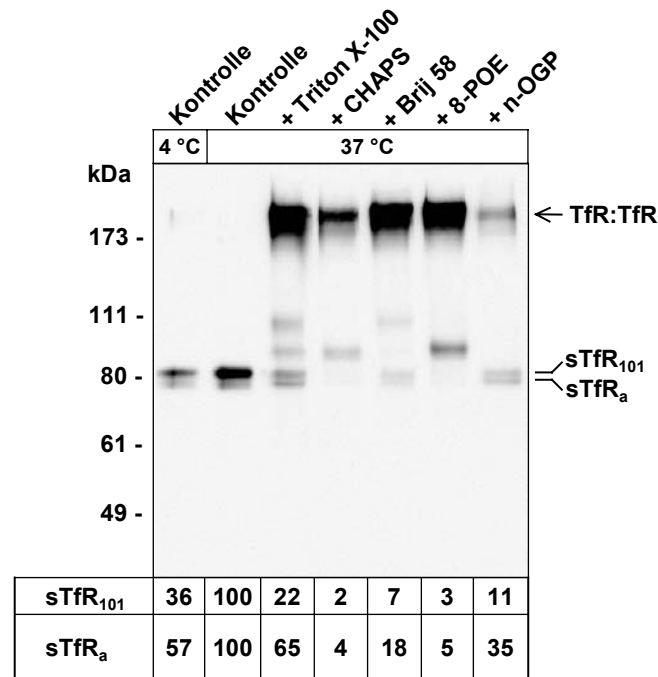
**Tabelle 2: Inhibition der sTfR-Freisetzungsaktivität**

	Konzentration	Inhibition / % ± S.A.M. <sup>a)</sup>	inhibierte Proteasen
Pepstatin A	1 mM	0	verschiedene Aspartylproteasen
E64	85 µM	0	allgemeiner Inhibitor von Cysteinproteasen
Antipain	1 mM	0	Cysteinproteasen und schwächer gegenüber Serinproteasen
Chymostatin	1 mM	0	Serinproteasen aus der Chymotrypsinfamilie und lysosomale Cysteinproteasen
PefablocSC	1 mM	31 ± 4	allgemeiner Inhibitor von Serinproteasen
Leupeptin	1 mM	0	Serinproteasen der Trypsinfamilie
FCI	1 mM	87 ± 2	Proproteinconvertasen
1,10-Phenanthrolin	3 mM	94 ± 4	Metalloproteasen
EDTA	3 mM	99 ± 0	Metalloproteasen
EGTA	3 mM	88 ± 7	Metalloproteasen
Phosphoramidon	100 µM	0	Thermolysin und andere bakterielle Metalloproteasen sowie Kollagenase
MMP-Inhibitor-1	1 mM	0	MMPs (MMP-1, MMP-3, MMP-8 und MMP-9)
MMP-Inhibitor-2	1 mM	92 ± 4	MMPs (MMP-1, MMP-3, MMP-7 und MMP-9)
TAPI-2	1 mM	87 ± 2	TNFα-Sheddingproteasen
TIMP-1	1 µM	55 ± 3	MMPs und ADAMs
TIMP-2	1 µM	15 ± 2	MMPs und ADAMs
TIMP-3	1 µM	19 ± 5	MMPs und ADAMs

<sup>a)</sup> in Relation zur Kontrolle ohne Inhibitor

### 3.2.6 Solubilisierung der sTfR-Freisetzungsaktivität

Eine Voraussetzung für eine mögliche Reinigung der sTfR-Sheddingprotease ist, dass die Zellmembranen, in denen die Protease verankert ist, solubilisiert vorliegen. Da die Effektivität der Reinigung jedoch mittels der Aktivität der Protease verfolgt werden muss, ist eine zweite Voraussetzung für die Reinigung, dass die sTfR-Sheddingprotease im solubilierten Zustand aktiv ist. Zur Untersuchung der sTfR-Freisetzungsaktivität im solubilierten Zustand wurden HL60-Zellmembranen mit verschiedenen Detergenzien solubilisiert und ihre Aktivität bestimmt (Abbildung 23).



**Abbildung 23: Solubilisierung der sTfR-Freisetzungaktivität.** HL60-Zellmembranen wurden mit jeweils 1 % der bezeichneten Detergenzien solubilisiert und für 18 h bei 37 °C inkubiert. Alle Proben wurden bei 20 800 × g zentrifugiert, die Überstände mittels nichtreduzierender SDS-PAGE aufgetrennt und TfR im Westernblot mit OKT9 nachgewiesen. sTfR<sub>101</sub> und sTfR<sub>a</sub> wurden durch Chemolumineszenz-Detektion mit Hilfe eines FujiFilm LAS-1000 Systems quantifiziert und die Kontrollen bei 37 °C zu jeweils 100 % gesetzt. n-OGP, n-Octylglycopyranosid; 8-POE, Octylpolyoxyethylen; CHAPS, 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat.

Die Solubilisierung der HL60-Zellmembranen zeigte, dass die sTfR-Freisetzungaktivität in Abhängigkeit des verwendeten Reagenzes im Vergleich zur nicht solubilisierten Kontrolle deutlich bis vollständig reduziert wurde. Bei in Triton X-100 solubilisierten Proben blieb die Aktivität noch am stärksten erhalten, gefolgt von n-Octylglycopyranosid (n-OGP) und Brij 58, während die Solubilisierung mit Octylpolyoxyethylen (8-POE) und 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS) die sTfR-Aktivität vollständig inhibierte. In den solubilisierten Proben erscheinen ebenfalls membrangebundene TfR-Formen, da diese durch Zentrifugieren nicht pelletiert werden können. Bemerkenswerterweise wurde die Freisetzung des sTfR<sub>a</sub> durch Solubilisierung mit Triton X-100 und n-OGP nicht in dem Maße beeinträchtigt wie die des sTfR<sub>101</sub>. Die Aktivität der Protease, die den sTfR<sub>a</sub> freisetzt, scheint folglich nicht von einer intakten Membranstruktur abhängig zu sein. Im Gegensatz dazu wird die TfR-Sheddingprotease, die den sTfR<sub>101</sub> freisetzt, durch Solubilisierung der Membran offenbar in ihrer Aktivität wesentlich beeinträchtigt.

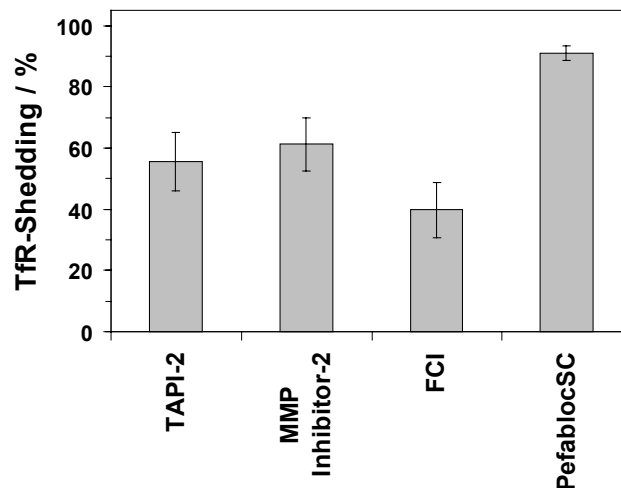
### 3.3 TfR-Shedding durch leukozytäre Zelllinien

Im Überstand von leukozytären Zelllinien konnte sTfR durch Immunpräzipitation nachgewiesen werden (s. Abschnitt 3.1.1). Dies zeigt, dass diese Zelllinien fähig sind, TfR zu shedden, und sich deshalb zur Untersuchung des TfR-Sheddingprozesses im Zellkulturmodell

eigenen. Frühere Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe (Grandke, 2000) ließen vermuten, dass die Freisetzung des sTfR von Leukozyten konstitutiv abläuft und mit der Proliferation der Zellen in direktem Zusammenhang steht. Ein zur Quantifizierung von sTfR aus dem Zellkulturüberstand entwickelter ELISA wurde optimiert und stellte sich als geeignet für die folgenden Untersuchungen heraus.

### 3.3.1 Inhibition des TfR-Sheddings

Mit Hilfe des sTfR-Freisetzungssassays konnten spezifische Inhibitoren ermittelt werden, welche die Freisetzung von sTfR aus HL60-Zellmembranen effektiv inhibierten (s. Abschnitt 3.2.5). Von diesen Inhibitoren wurden in der folgenden Untersuchung PefablocSC, FCI, MMP-Inhibitor-2 und TAPI-2 bezüglich ihrer Wirkung auf die sTfR-Freisetzung aus HL60-Zellen getestet (Abbildung 24). Der generelle Metalloproteaseinhibitor 1,10-Phenanthrolin wurde hier nicht berücksichtigt, da sich herausstellte, dass dieser das Zellwachstum hemmt und somit indirekt das TfR-Shedding inhibiert, da dieses sich, wie oben beschrieben, proportional zur Zellproliferation verhält.

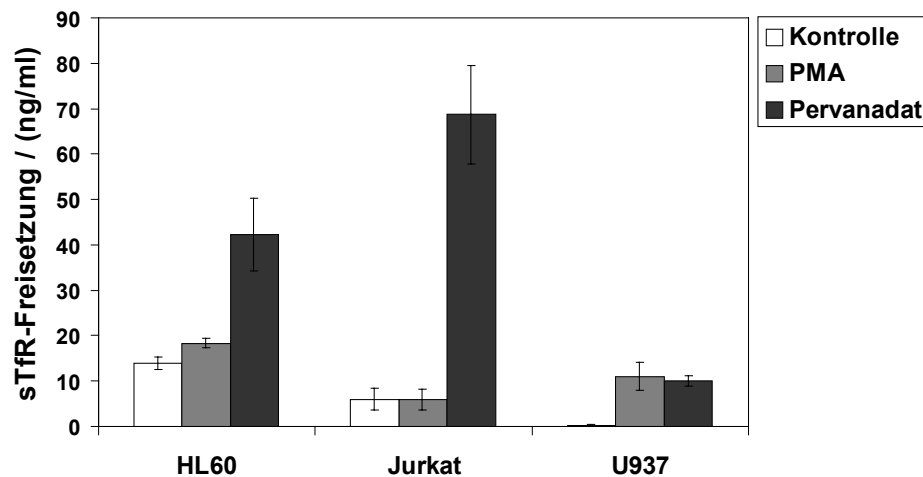


**Abbildung 24: Inhibition des TfR-Sheddings von HL60-Zellen.** HL60-Zellen wurden im Zellkulturmedium kultiviert ( $1,5 \times 10^6$  / ml), auf eine Endkonzentration von 50  $\mu$ M der bezeichneten Inhibitoren eingestellt und für 24 h im CO<sub>2</sub>-Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Der sTfR wurde im Zellüberstand mittels sTfR-ELISA quantifiziert und die Kontrolle ohne Inhibitoren zu 100 % gesetzt. Die Daten wurden aus vier unabhängigen Experimenten mit S.A.M. ermittelt.

Für die getesteten Inhibitoren konnte keine Beeinflussung des Zellwachstums in der untersuchten Inhibitorkonzentration von 50  $\mu$ M festgestellt werden, so dass sich diese zur Charakterisierung der TfR-Sheddingprotease eigneten. Der Serinproteaseinhibitor PefablocSC zeigte hierbei mit ungefähr 10 % den geringsten inhibierenden Effekt, TAPI-2 und MMP-Inhibitor-2 inhibierten um ungefähr 40 bis 50 % und FCI um ungefähr 60 %. Dieser Versuch bestätigt, dass die im sTfR-Freisetzungssassay beobachteten Wirkungen der spezifischen Proteaseinhibitoren (s. Abschnitt 3.2.5) auf das Zellsystem übertragen werden können.

### 3.3.2 Regulation des TfR-Sheddings

Da bisher sehr wenig über die Regulation des TfR-Sheddings bekannt ist, wurden einige leukozytäre Zelllinien mit Reagenzien behandelt, die verschiedene Sheddingprozesse anderer Membranproteine zu stimulieren vermögen. Neben dem Proteinkinase-C-Aktivator PMA wurde der Einfluss des Tyrosinphosphataseinhibitors Pervanadat auf die sTfR-Freisetzung durch die Zelllinien HL60, Jurkat und U937 getestet (Abbildung 25).



**Abbildung 25: Stimulation des TfR-Sheddings.** Jeweils  $1,5 \times 10^6$  HL60-, Jurkat- oder U937-Zellen wurden in 1 ml frischem Zellkulturmedium in Gegenwart von 160 nM PMA oder 10  $\mu$ M Pervanadat für 5 h bei 37 °C im CO<sub>2</sub>-Brutschrank inkubiert. Der sTfR wurde im Zellüberstand mittels sTfR-ELISA quantifiziert. Die Daten wurden aus drei unabhängigen Experimenten mit S.A.M. ermittelt.

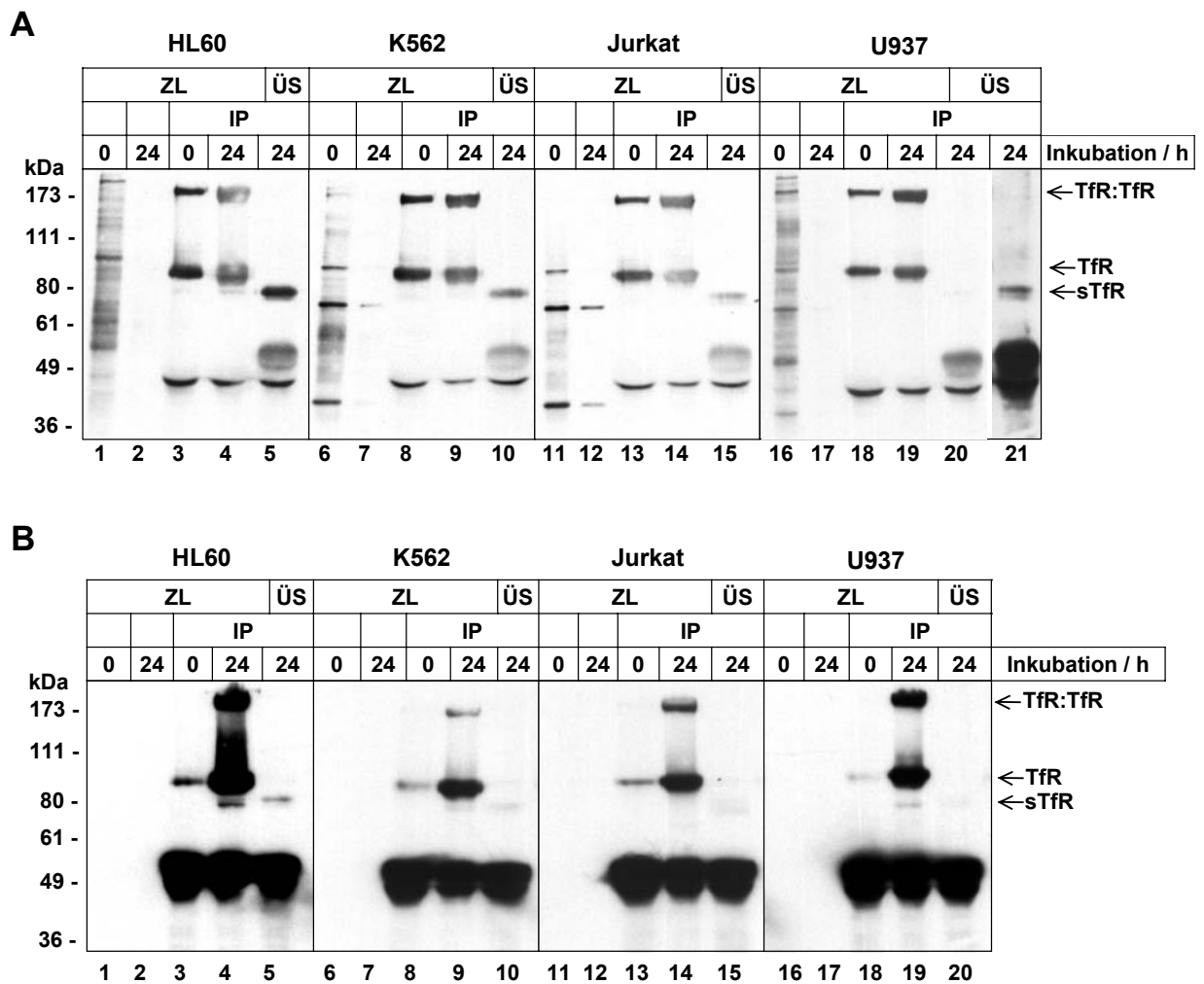
Die Inkubationen der Zelllinien ohne Reagenzien zeigten, dass HL60-Zellen das höchste konstitutive TfR-Shedding besitzen, Jurkat-Zellen ungefähr die Hälfte des Sheddings der HL60-Zellen aufweisen und U937-Zellen fast keinen detektierbaren sTfR über einen Zeitraum von 5 h freisetzen. Auf das TfR-Shedding der Zelllinie HL60 hatte PMA nur einen geringen und auf das von Jurkat-Zellen keinen stimulierenden Effekt. Dagegen ließ sich das TfR-Shedding von U937-Zellen durch PMA ungefähr auf das Niveau des konstitutiven Sheddings der HL60-Zellen stimulieren. Der Tyrosinphosphataseinhibitor Pervanadat stimulierte dagegen das TfR-Shedding in allen Zelllinien bis zum Mehrfachen der beobachteten konstitutiven Freisetzung. Die Analyse weiterer Reagenzien, die in die Signaltransduktion der Zellen eingreifen wie die Kinaseinhibitoren Chelerythrin, SB 203580 oder PD 89059, oder der apoptoseinduzierenden Reagenzien Staurosporin und Ionomycin, konnte nicht durchgeführt werden, da diese wie bei dem Proteaseinhibitor 1,10-Phenanthrolin beschrieben (s. 3.2.5) zu einer verringerten Zellproliferation führten.

### 3.3.3 Lokalisierung des TfR-Sheddings

Da die Lokalisierung des Sheddingprozesses noch nicht eindeutig geklärt ist und es Hinweise dafür gibt, dass der TfR nicht auf dem Biosyntheseweg gesheddet wird, wurde im folgenden



Experiment untersucht, ob bereits auf der Zelloberfläche lokalisierter TfR abgespalten wird. Hierzu wurden Zelloberflächenproteine von leukozytären Zelllinien biotinyliert, die Zellen für 24 h rekultiviert und TfR mit OKT9 aus Zelllysaten und Zellüberstand immunpräzipitiert. Die Immunkomplexe wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und biotinylierte Proteine im Westernblot mit einem Antikörper gegen Biotin (Abbildung 26A) oder gegen TfR (OKT9) (Abbildung 26B) nachgewiesen.



**Abbildung 26: Zellbiotinylierung.** Oberflächenproteine von HL60-, Jurkat-, K562- und U937-Zellen wurden mit Biotin-LCS-NHS markiert und jeweils ein Fünftel der Ansätze lysiert (ZL, Spuren 1, 6, 11 und 16). Vier Fünftel der Ansätze wurden für 24 h rekultiviert und die Zellen lysiert (Spuren 2, 7, 12 und 17). Aus den Zelllysaten wurde TfR direkt nach Biotinylierung zum Zeitpunkt 0 (Spuren 3, 8, 13 und 18), nach 24 h (Spuren 4, 9, 14 und 19) und aus den Zellkulturüberständen (ÜS) nach 24 h Rekultivierung (Spuren 5, 10, 15 und 20) mit OKT9-Sepharose immunpräzipitiert (IP), in der reduzierenden SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot (A) biotinylierte Proteine mit Anti-Biotin-Antikörper oder (B) TfR mit OKT9 nachgewiesen. Spur 21 zeigt eine längere Expositionszeit des Westernblots gegenüber Spur 20.

In allen untersuchten Zelllinien konnte biotinylierter sTfR 24 h nach Rekultivierung in den Zellkulturüberständen nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass zumindest ein Teil des TfR erst nach Erreichen der Zelloberfläche gesheddet wird. Weiterhin nimmt der Anteil an biotinyliertem TfR in den Zelllysaten innerhalb von 24 h in den stärker TfR-sheddenden

Zelllinien HL60, K562 und Jurkat deutlich ab, während die schwach sheddende Zelllinie U937 keine signifikante Abnahme von biotinyliertem TfR in den Zellysaten zeigt. Dies ist ein Hinweis darauf, dass der Sheddingprozess den Hauptabbauweg des TfR darstellen könnte. Detektiert man den TfR dagegen mit OKT9-Antikörper, erscheint der Anteil des TfR in den Zellysaten direkt nach Biotinylierung wesentlich kleiner als nach 24 h Rekultivierung. Dies ist vermutlich auf eine verringerte Empfindlichkeit des biotinylierten TfR gegenüber dem OKT9-Antikörper zurückzuführen. Daraus folgt, dass innerhalb von 24 h entweder eine entsprechende Menge an TfR neu synthetisiert wird oder die Biotinylierung abgebaut wird, so dass OKT9 den TfR wieder zu binden vermag. Gegen einen Abbau der Biotinylierung spricht jedoch die Beobachtung, dass biotinylierter sTfR nach 24 h offensichtlich schlecht von OKT9 detektiert wird (Abbildung 26B, Spuren 5, 10, 15 und 20), im Vergleich zur Detektion derselben Banden mit Anti-Biotin-Antikörper (Abbildung 26A, Spuren 5, 10, 15 und 20). Die Feststellung, dass der auf der Zelloberfläche biotinylierte TfR dem Shedding unterliegt, führt nicht zwangsläufig zu dem Schluss, dass dieser dann auch auf der Zelloberfläche abgespalten wird. Vielmehr muss berücksichtigt werden, dass der TfR ebenfalls in einem intrazellulären Kompartiment gespalten werden kann, da ein TfR-Molekül vielfach von der Zelloberfläche in das Zellinnere internalisiert wird und dort entweder in den Recyclingweg zur Abgabe der über Transferrin gebundenen Eisenionen oder in den retrograden Transport zum Golgi eintritt.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass mit Hilfe des sTfR-Freisetzungssassays neue Erkenntnisse über die Abspaltung des sTfR gewonnen werden konnten, die das Verständnis des bislang wenig untersuchten TfR-Sheddingprozesses grundlegend verbessern.