

4 DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die TfR-Sheddingprotease(n) zu identifizieren und hinsichtlich ihrer Inhibitorsensitivität und ihrer strukturellen und funktionellen Eigenschaften wie Membranverankerung, pH-Sensitivität und Schnittstellenspezifität zu charakterisieren. Des Weiteren sollte der Sheddingprozess des TfR bezüglich seiner Regulation und Lokalisierung untersucht werden.

4.1 Isolierung und Charakterisierung TfR-spezifischer Serinproteasen

In der vorliegenden Arbeit konnten lösliche Formen des TfR, deren apparente molekulare Massen mit einer Spaltung des TfR im *Stalk*-Bereich korrelieren, im Kulturüberstand der leukozytären Zelllinien HL60 und U937 mittels Immunpräzipitation nachgewiesen werden. Mit Hilfe epitopspezifischer Antikörper wurde gezeigt, dass alle löslichen TfR-Formen die extrazelluläre Domäne nicht jedoch die intrazelluläre Domäne des TfR beinhalten (Abbildung 3). Der N-Terminus des aus HL60-Zellkulturüberstand isolierten sTfR wurde durch Edman-Abbau zu LAG(T)ES bestimmt (s. Abschnitt 3.1.1). Das Signal für Thr-104 war in der Sequenzierung sehr schwach, was vermutlich auf die beschriebene O-Glykosylierung an dieser Stelle zurückzuführen ist (Do und Cummings, 1992; Hayes *et al.*, 1992). Der identifizierte N-Terminus stimmt folglich mit dem N-Terminus des sTfR überein, der aus humanem Serum isoliert wurde (Shih *et al.*, 1990) und wonach eine Spaltung des TfR zwischen Arg-100 und Leu-101 stattgefunden hat. Im Überstand von U937-Zellen wurde der sTfR als Doppelbande detektiert, deren obere, prominente Bande mit einem N-Terminus mit der Sequenz XPGED bestimmt werden konnte (s. Abschnitt 3.1.1). Dies deutet auf eine Spaltung im *Stalk*-Bereich des TfR zwischen Glu-110 und Glu-111 hin. Der Nachweis von verschiedenen sTfR-Formen in den Kulturüberständen der HL60- und U937-Zellen zeigte zum einen, dass diese Zelllinien in der Lage sind sTfR freizusetzen und somit alle für das Shedding notwendigen Enzyme und Kofaktoren besitzen und zum anderen, dass sich Zellen in ihren Sheddingmechanismen unterscheiden können – beispielsweise durch die Aktion verschiedener Proteasen.

Zum Nachweis dieser potentiellen TfR-Sheddingproteasen wurde ein Assay entwickelt, in dem diese TfR-spaltenden Proteasen nachgewiesen werden können (s. Abschnitt 3.1.2). Für Zellfraktionen von HL60-Zellen konnten mit Hilfe dieses TfR-Verdauassays keine proteolytischen Aktivitäten festgestellt werden, während Membranfraktionen von U937-Zellen ein TfR-Fragment von ungefähr 80 kDa generierten (Abbildung 5). Inhibitorversuche zeigten, dass die Bildung dieses Fragmentes effektiv durch Serinproteaseinhibitoren blockiert wird (Abbildung 9). Bereits in früheren Veröffentlichungen, in denen vergleichbare Assays wie der in dieser Arbeit eingesetzte TfR-Verdauassay verwendet wurden, konnte eine Inhibition des

TfR-Sheddings durch Serinproteaseinhibitoren nachgewiesen werden. In einer dieser Untersuchungen wird die proteolytische Spaltung von gereinigtem, plazentalem TfR durch Zellfraktionen von HL60-Zellen mittels der Serinproteaseinhibitoren DFP oder PMSF, nicht aber durch die als Metalloproteaseinhibitoren wirkenden Chelatoren EDTA oder 1,10-Phenanthrolin blockiert (Baynes *et al.*, 1993). In einem weiteren Assay, in dem immobilisierter Schafs-TfR durch eine Fraktion humaner weißer Blutzellen proteolytisch prozessiert wird, konnte die TfR-spezifische Aktivität mit PMSF inhibiert werden (Johnstone, 1996).

Zur Identifizierung der Protease, die das 80-kDa-TfR-Fragment (sTfR₁₀₉) generiert (A80-Aktivität), wurde eine Reinigung zunächst mittels einer Anionenaustauschchromatographie durchgeführt (Abbildung 6) und aktive Fraktionen aus dieser für eine Hydrophobe-Interaktionschromatographie (HIC) eingesetzt (Abbildung 7). In Fraktionen der HIC-Chromatographie, in denen die A80-Aktivität mit Hilfe des TfR-Verdauassays nachgewiesen wurde, konnte im Silbergel eine prominente Doppelbande, die eine molekulare Masse von ca. 27 kDa zeigte, detektiert werden. Die Markierung dieses Proteins mit dem radioaktiven, irreversiblen Serinproteaseinhibitor [³H]-DFP zeigte, dass es sich bei diesem Protein tatsächlich um eine Serinprotease handelt (Abbildung 8). Die direkte Identifizierung der A80-Aktivität entweder mittels N-terminaler Sequenzierung oder mittels Massenspektrometrie (MALDI-TOF) erbrachte jedoch keine eindeutigen Ergebnisse.

Im Durchlauf und in einer früh eluierenden Fraktion der HIC-Chromatographie konnte eine zweite TfR-spaltende, proteolytische Aktivität (A85-Aktivität) nachgewiesen werden, die im TfR-Verdauassay ein ungefähr 85 kDa großes TfR-Fragment (sTfR₉₆) generiert (Abbildung 7). In der Anionenaustauschchromatographie eluieren beide Aktivitäten gemeinsam, so dass die A80-Aktivität die Entstehung des sTfR₉₆ durch die A85-Aktivität vollständig überlagern konnte. Die HIC-Chromatographie war dagegen in der Lage beide Aktivitäten zu trennen, da die A85-Aktivität deutlich schwächer an das HIC-Säulenmaterial bindet als die A80-Aktivität. Mittels N-terminaler Sequenzierung der beiden TfR-Fragmente ergab sich für die A80-Aktivität eine Schnittstelle zwischen Val-108 / Arg-109 und für die A85-Aktivität eine Schnittstelle zwischen Lys-95 / Thr-96 im TfR-*Stalk* (Abbildung 27).

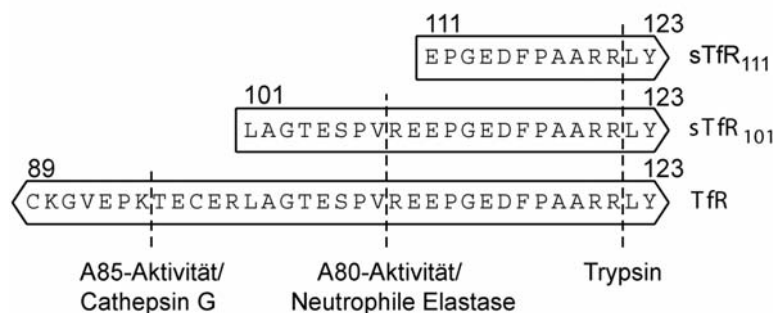


Abbildung 27: Schematische Darstellung der nachgewiesenen sTfR-Formen und der beteiligten Proteasen.

Obwohl der Unterschied der beiden sTfR-Formen somit lediglich 13 Aminosäuren beträgt, zeigte das Laufverhalten in der Gelelektrophorese einen molekularen Gewichtsunterschied

von ungefähr 5 kDa an. Diese Diskrepanz kann erklärt werden durch die Anwesenheit eines O-Glykans am Thr-104, welches integraler Bestandteil des sTfR₉₆, nicht aber des sTfR₁₀₉ ist (Do und Cummings, 1992; Hayes *et al.*, 1992).

Zur weiteren Charakterisierung der A80-Aktivität wurden Inhibitorversuche durchgeführt. Während Inhibitoren für Aspartat-, Cystein- und Metalloproteasen erwartungsgemäß keinen inhibitorischen Einfluss auf die Bildung des sTfR₁₀₉ hatten, blockierten Serinproteaseinhibitoren die Bildung dieses Fragmentes effektiv. Der Inhibitor mit der höchsten Spezifität war Elastatinal, das Serinproteasen der Elastasefamilie inhibiert (Abbildung 9).

Da die Spezifitäten der Proteasen, die zur Elastasefamilie gehören, gut untersucht sind, wurde zur weiteren Identifizierung der A80-Aktivität der *ProteaseSpot*-Assay der Firma Jerini Biotools durchgeführt, der die exakte Feststellung der Schnittstellenspezifität von Proteasen erlaubt. Ein wesentlicher Vorteil gegenüber Tests mit chromogenen Substraten wie z. B. p-Nitroanilid-Derivaten ist die Möglichkeit neben P-Aminosäuren auch P'-Aminosäuren (siehe Glossar, Abschnitt 7.2) des Substrates zu variieren. Mit Hilfe dieses Assays konnte die Schnittstellenspezifität der A80-Aktivität bestimmt werden (Abbildung 10). Diese ist gekennzeichnet durch ein Prolin in P2-Position und Valin oder Isoleucin in P1, während Arginin in P1' durch Lysin und eventuell Histidin ersetzt werden kann. Glutamat in P2' ist weniger wichtig für die Schnittstellenspezifität der A80-Aktivität, da es fast ohne Aktivitätsverlust durch verschiedene Aminosäuren substituiert werden kann. Die Bedeutung von Prolin in P2- und Valin in P1-Position zeigt sich darin, dass gute Elastasesubstrate genau diese Struktur besitzen (Blow, 1977; Yasutake und Powers, 1981). Interessanterweise konnte durch Einführen der vier Aminosäuren der Positionen P2 bis P2' in das Peptid P94/13, das die Schnittstelle bei Arg-100 umfasst und nicht durch A80 gespalten wird, keine Aktivität erzeugt werden. Dies zeigt, dass weitere Aminosäuren außerhalb von P2 bis P2' eine wichtige Rolle für die Schnittstellenspezifität der A80-Aktivität spielen. Die Beobachtung, dass Positionen über P2 hinaus wichtig für die Substraterkennung von Neutrophiler Elastase sind, wurde in einer Studie festgestellt, in der P3 und P4 in einem Elastasesubstrat variiert wurden (Yasutake und Powers, 1981).

Ein weiterer Hinweis, dass es sich bei der A80-Aktivität um Neutrophile Elastase handeln könnte, zeigte sich darin, dass kommerziell erhältliche Neutrophile Elastase dieselbe sTfR-Form im TfR-Verdauassay generierte wie die A80-Aktivität (Abbildung 11), was durch N-terminale Sequenzierung des Spaltproduktes eindeutig bewiesen werden konnte. Die Aktivität sowohl von A80 als auch der Neutrophilen Elastase in diesem Assay konnte zudem mit einem spezifischen Antikörper, der gegen die katalytische Domäne der Neutrophilen Elastase gerichtet ist und diese deshalb zu blockieren vermag, inhibiert werden. Weiterhin konnte mit Hilfe desselben Antikörpers die Aktivität von A80 direkt im

ProteaseSpot-Assay gegenüber dem Peptid P103/13 deutlich gesenkt werden oder indirekt durch Immunpräzipitation die A80-Aktivität depletiert werden (Abbildung 12).

Zur 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 sTfR₉₆ beobachten müssen, da die Überlagerung der A85-Aktivität durch die A80-Aktivität aufgehoben worden wäre. Die Schnittstellenspezifität, welche sich durch Sequenzierung des sTfR₉₆ ergab, zeigt, dass Lysin in P1-Position offensichtlich eine wichtige Rolle spielt, während dagegen Arginin in P1-Position nicht wichtig ist, da bei Arg-100 kein Spaltprodukt des TfR im TfR-Verdauassay detektiert wurde. Die Bevorzugung der basischen Aminosäure Lysin in P1-Position gegenüber der ähnlichen Aminosäure Arginin ist generell ungewöhnlich für Serinproteasen, wurde jedoch für die Serinprotease Cathepsin G beschrieben (Powers *et al.*, 1989). Zur Verifizierung dieser Vermutung wurde kommerziell erhältliches Cathepsin G im TfR-Verdauassay eingesetzt und festgestellt, dass dieses dieselbe sTfR-Form generiert wie die A85-Aktivität (Abbildung 11). Dies konnte ebenfalls durch N-terminale Sequenzierung verifiziert werden. Für Cathepsin G war ein polyklonaler Antikörper erhältlich, mit dem im Westernblot in der mikrosomalen Membranfraktion von U937-Zellen zwei Banden mit derselben molekularen Masse wie von gereinigtem Cathepsin G nachzuweisen waren. In entsprechenden Membranen von HL60-Zellen konnte dagegen erwartungsgemäß kein Cathepsin G nachgewiesen werden, da diese im TfR-Verdauassay keine spezifische proteolytische Aktivität zeigten (Abbildung 13).

Insgesamt wird die Identifizierung der A80-Aktivität als Neutrophile Elastase zum einen und der A85-Aktivität als Cathepsin G zum anderen von folgenden Ergebnissen klar unterstützt: (i) die A80- und A85-Aktivität wurden von Serinproteaseinhibitoren, aber nicht von Inhibitoren anderer Proteaseklassen gehemmt. So inhibierte der generelle Serinproteaseinhibitor PefablocSC, der natürliche Serinproteaseinhibitor Aprotinin und der für Serinproteasen der Elastasefamilie spezifische Inhibitor Elastatinal. (ii) Neutrophile Elastase und Cathepsin G produzieren dieselben N-Termini beim Verdau des humanen plazentalen TfR wie jeweils die A80- und A85-Aktivität, was durch N-terminale Aminosäuresequenzierungen bestätigt wurde. (iii) Die A80-Aktivität konnte mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper, der gegen die katalytische Domäne von Neutrophiler Elastase gerichtet ist, zum einen direkt inhibiert werden und zum anderen aus einer aktiven Fraktion immunpräzipitiert werden. Für Cathepsin G war ein polyklonaler Inhibitor erhältlich, mit dem im Westernblot in mikrosomalen Membranen von U937-Zellen Cathepsin G nachzuweisen war.

Sowohl Neutrophile Elastase als auch Cathepsin G wurden in membrangebundener Form in U937-Zellen nachgewiesen (Abbildungen 12 und 13), obwohl sie keine Transmembrandomäne besitzen. Ihre mögliche Lokalisierung auf der Zelloberfläche in Form peripherer Membranproteine wurde jedoch bereits früher für Neutrophile (Owen *et al.*, 1995) und Monozyten (Allen und Tracy, 1995) beschrieben. Als Substrate der Neutrophilen Elastase wurden neben Elastin eine Reihe weiterer Proteine der Extrazellulären Matrix, wie Kollagene der Typen I bis IV und IX bis XI (Pipoly und Crouch, 1987; Gadher *et al.*, 1989; Kittelberger *et al.*, 1992), Fibronektin und Laminin (Heck *et al.*, 1990) beschrieben. Neutrophile Elastase vermag ebenfalls indirekt den Abbau von Proteinen der Extrazellulären Matrix durch proteolytische Aktivierung der MMPs zu modulieren (Rice und Banda, 1995). Weiterhin inaktiviert Neutrophile Elastase verschiedene Gerinnungsfaktoren (Anderssen *et al.*, 1993) und Proteaseinhibitoren wie Antithrombin, α 2-Antiplasmin oder α 1-Antichymotrypsin (Jordan *et al.*, 1989). Für Cathepsin G sind im Gegensatz zur Neutrophilen Elastase bisher nur wenige Substrate bekannt geworden, jedoch könnte Cathepsin G ebenso vielfältige Funktionen ausüben wie Neutrophile Elastase. Beide Proteasen spielen eine wichtige Rolle in der immunologischen Abwehr von parasitären Infektionen, da sie in hohen Konzentrationen in azurophilen Granula von neutrophilen Granulozyten lokalisiert sind. Diese Granula verschmelzen entweder mit den so genannten Phagosomen, die phagozytierte Fremdkörper enthalten und enzymatisch verdaut werden, oder der Inhalt der Granula wird sezerniert, so dass die Proteasen ihre enzymatische Wirkung in der Zellumgebung ausüben können (Owen und Campbell, 1999). Die in dieser Arbeit beobachtete mögliche Rolle von Neutrophiler Elastase am alternativen Shedding des TfR wird unterstützt durch frühere Experimente, bei denen eine Beteiligung der Neutrophilen Elastase an Sheddingprozessen im Falle der Freisetzung der extrazellulären Domänen des Komplementrezeptors-1 und des Sialophorins (CD43) beschrieben wurde (Sadallah *et al.*, 1999; Remold-O'Donnell und Parent, 1995).

4.2 Charakterisierung einer bei Arg-100 TfR-spaltenden Metalloprotease

In einer mikrosomalen Membranfraktion aus sheddingaktiven HL60-Zellen konnte erstmals die Existenz aller theoretisch beim Sheddingprozess auftretenden TfR-Formen nachgewiesen werden (Abbildung 14). Da die Lokalisierung des Sheddingprozesses noch weitgehend unbekannt ist, sind die membrangebundenen TfR-Formen von besonderer Bedeutung (4.5). In früheren Berichten wurde unter nichtreduzierenden Bedingungen eine 105 kDa große Form des TfR in Zellmembranen von HL60- und K562-Zellen gefunden. Diese Form wurde als TfR-Dimer angesehen, dem eine extrazelluläre Domäne fehlt (Baynes *et al.*, 1994) und die in der vorliegenden Arbeit ebenfalls in HL60-Zellmembranen als ungefähr 110 kDa große TfR-Form (TfR:mfTfR) detektiert wurde. Weiterhin konnte erstmals das kleine membrangebundene TfR-Fragment in HL60-Zellmembranen nachgewiesen werden, das eindeutig dem

Teil des TfR zuzuordnen ist, der nach Abspaltung der extrazellulären Domäne in der Zellmembran verbleibt. Das Dimer dieses kleinen Fragmentes (mfTfR:mfTfR) ließ sich zur monomeren Form (mfTfR) reduzieren.

Die Identität des 80 kDa großen Fragmentes des TfR mit der löslichen Form des TfR, die im humanen Serum nachgewiesen werden konnte (sTfR₁₀₁) (Shih *et al.*, 1990), wurde durch folgende Ergebnisse klar gezeigt: sTfR₁₀₁ konnte mit einem Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne, nicht aber mit einem Antikörper gegen die intrazelluläre Domäne des TfR detektiert werden und die apparente molekulare Masse blieb unter reduzierenden oder nicht-reduzierenden Bedingungen unverändert (Abbildung 14). Weiterhin war der sTfR₁₀₁ die einzige TfR-Form die im Überstand der bei 37 °C inkubierten HL60-Zellmembranen nachgewiesen werden konnte, was zeigt, dass dieser TfR-Form die Membranverankerung durch die Transmembrandomäne fehlt (Abbildung 13). Der endgültige Nachweis, dass der TfR tatsächlich an der Hauptschnittstelle zwischen Arg-100 / Leu-101 zum sTfR gespalten wurde, konnte schließlich durch N-terminale Sequenzierung des 80-kDa-Fragment erbracht werden. Hierzu wurde der sTfR₁₀₁ mittels einer Affinitätschromatographie an Transferrinsepharose gereinigt, was zeigt, dass von den HL60-Zellmembranen freigesetzter sTfR₁₀₁ seine transferrinbindende Funktion immer noch auszuüben vermag.

Die Anteile von gespaltenen TfR-Formen – insbesondere des sTfR₁₀₁ – in HL60-Membranen nahmen nach Inkubation bei 37 °C zu, die von nichtgespaltenen TfR-Formen dagegen ab (Abbildung 14). Dies zeigt, dass die für das TfR-Shedding verantwortliche Protease in diesen Membranen in aktiver Form vorliegt. Die Protease ist membranständig, da auch durch mehrmaliges Waschen der Membranen mit detergensfreiem Puffer die sTfR-Freisetzung aktivität nicht signifikant reduziert wurde. Auch durch Inkubation der Membranen unter Bedingungen, die entweder periphere Membranproteine oder GPI-verankerte Proteine von den Membranen lösen, wurde die membrangebundene sTfR-Freisetzung aktivität nicht reduziert (Abbildung 18). Dies zeigt, dass es sich bei der TfR-Sheddingprotease wahrscheinlich um ein integrales Membranprotein handelt.

Die begrenzte Stabilität der Aktivität im sTfR-Freisetzungsassay (Abbildung 15) ist vermutlich auf eine Degradation der Protease durch andere Proteasen oder aber auf eine Freisetzung der TfR-Sheddingprotease aus den Membranen selbst zurückzuführen, wie es bereits für die MT5-MMP (Pei, 1999) und Furin (Vey *et al.*, 1994; Vidricaire *et al.*, 1993) beschrieben wurde. Diese Schlussfolgerung impliziert, dass die freigesetzte, lösliche TfR-Sheddingprotease nicht mehr in der Lage ist, membrangebundenen TfR proteolytisch zu spalten. Diese Folgerung wird unterstützt durch die Beobachtung, dass die Solubilisierung der HL60-Zellmembranen die sTfR-Freisetzung fast vollständig unterbindet (Abbildung 23). Hieraus folgt, dass die TfR-Sheddingprotease und ihr Substrat, der TfR, entweder beide in membrangebundener Form vorliegen müssen oder zumindest ein Reaktionspartner membran-

ständig sein muss. Für andere Sheddingprozesse ist diese Tatsache bereits bekannt, denn sowohl für das APP- als auch für das ACE-Shedding wurde gezeigt, dass eine Solubilisierung der Membranen den entsprechenden Sheddingprozess inhibiert (Roberts *et al.*, 1994; Parvathy *et al.*, 1997).

Da der generelle Metalloproteaseinhibitor 1,10-Phenanthrolin auf der einen Seite einen deutlichen inhibierenden Einfluss auf die Freisetzung des sTfR aus HL60-Zellmembranen hatte (Abbildung 19), und auf der anderen Seite fast alle getesteten Inhibitoren anderer Proteaseklassen keinen Effekt aufwiesen (Abbildung 21 und Tabelle 2), kann man schließen, dass die TfR-Sheddingprotease in die Klasse der Metalloproteasen einzuordnen ist. Die Sensitivität der sTfR-Freisetzung gegenüber Inhibitoren, deren Aktivität durch eine Hydroxamsäuregruppe vermittelt wird, gibt weitere Hinweise zur Charakterisierung der TfR-Sheddingprotease. Die Hydroxamsäuregruppe komplexiert das katalytische Zn^{2+} -Ion der Metalloprotease und bildet zwei Wasserstoffbrücken zu jeweils einem Glutamat- und einem Alaninrest aus. Die Selektivität dieser Inhibitoren wird durch Variation der Gruppen erreicht, die an die S1'- und S2'-Tasche der Zielprotease binden. Der MMP-Inhibitor-2 wurde als potenter Inhibitor von MMP-1, MMP-3, MMP-7 und MMP-9 beschrieben (Pikul *et al.*, 1998), jedoch könnten andere, ähnliche Proteasen ebenfalls inhibiert werden. TAPI-2 wurde ursprünglich entwickelt, um die zelluläre $TNF\alpha$ -Freisetzung zu inhibieren (Mohler *et al.*, 1994). Später konnte gezeigt werden, dass TAPI-2 die Spaltung des 80-kDa- $TNF\alpha$ -Rezeptors (Crowe *et al.*, 1995), des EGF-Rezeptors HER-2 (Codony-Servat *et al.*, 1999) und sowohl das konstitutive als auch das PMA-stimulierte Shedding von proTGF α , L-Selektin, IL-6-Rezeptor und APP (Arribas *et al.*, 1996) blockiert. Des Weiteren inhibiert TAPI-2 das apoptoseinduzierte Shedding der extrazellulären Domäne von E-Cadherin in Epithelzellen (Steinhusen *et al.*, 2001). Da sowohl TACE als auch ADAM-10 am $TNF\alpha$ -Shedding beteiligt sind (Black *et al.*, 1997; Moss *et al.*, 1997; Lunn *et al.*, 1997), sind diese Proteasen wahrscheinlich ebenfalls in die oben genannten – durch TAPI-2 zu inhibierenden – Sheddingprozesse involviert.

Die in dieser Arbeit beobachtete Sensitivität der TfR-Sheddingprotease gegenüber TIMP-1, aber nicht TIMP-2 oder TIMP-3, gibt weitere Hinweise auf die Identität der Protease. Die Unterfamilie der membranständigen MMPs, die so genannten MT-MMPs (*membrane-type matrixmetalloproteinases*), besteht aus einer Gruppe integraler Membranproteine (MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP und MT5-MMP) und einer GPI-membranverankerter Proteine (MT4-MMP und MT6-MMP). Die erstgenannten MT-MMPs werden durch TIMP-2 und TIMP-3 inhibiert, nicht aber durch TIMP-1 (Will *et al.*, 1996; Kinoshita *et al.*, 1996; Butler *et al.*, 1997; Shimada *et al.*, 1999), während die zweite Gruppe der MT-MMPs sensitiv für alle drei TIMPs sind (Kolkenbrock *et al.*, 1999; English *et al.*, 2000; English *et al.*, 2001). Diese Inhibitorprofile und der Ausschluss einer GPI-Verankerung der TfR-Sheddingprotease in dieser Arbeit (Abbildung 23) sprechen gegen eine membranständige MMP als TfR-Sheddingprotease. Von den ADAMs ist bekannt, dass TACE durch TIMP-3, aber nicht TIMP-1 oder

TIMP-2 blockiert wird (Amour *et al.*, 1998). ADAM-10 dagegen wird durch TIMP-1 und im geringeren Ausmaß durch TIMP-3, aber nicht TIMP-2 inhibiert (Amour *et al.*, 2000). Für weitere proteolytisch aktive ADAMs wurde einzig ADAM-28 und die lösliche freigesetzte Form der ADAM-12 (ADAM-12S) in ihren Sensitivitäten gegenüber TIMPs getestet. ADAM-28 wird weder durch TIMP-1 noch TIMP-2 inhibiert (Howard *et al.*, 2001), während ADAM-12S durch TIMP-3 inhibiert werden kann (Loechel *et al.*, 2000). Diese beobachteten TIMP-Sensitivitäten von ADAMs weisen auf ADAM-10 als TfR-Sheddingprotease hin. Jedoch könnten auch weitere ADAMs, die bisher nicht in ihrer Sensitivität gegenüber TIMPs getestet wurden, am TfR-Shedding beteiligt sein.

Proteasen der MMP- und ADAM-Familien werden als inaktive Proenzyme synthetisiert, in denen die N-terminale Prodomäne mit einem ungepaarten Cystein an das zentrale Zn^{2+} -Ion der katalytischen Domäne bindet und diese hierdurch effektiv blockiert. Eine proteolytische Spaltung zwischen Prodomäne und katalytischer Domäne ermöglicht einen so genannten „Cystein-switch“-Mechanismus, der schließlich zur Aktivierung der Protease führt. Die membranständigen Formen der MMPs (MT-MMPs) (Sternlicht und Werb, 2001) und die meisten der proteolytisch aktiven ADAMs (ADAM-9 (Roghani *et al.*, 1999), ADAM-10 (Howard *et al.*, 1996), ADAM-12 (Loechel *et al.*, 1998), ADAM-15 (Lum *et al.*, 1998), ADAM-17 / TACE (Black *et al.*, 1997; Moss *et al.*, 1997) und ADAM-19 (Inoue *et al.*, 1998)) besitzen die Furinerkennungssequenz R-X-K/R-R zwischen ihrer Prodomäne und der katalytischen Domäne. Diese ermöglicht die Aktivierung dieser Proteasen durch furinähnliche Proproteinconvertasen bereits in der Zelle auf dem sekretorischen Weg. Die Beobachtung, dass der Furininhibitor FCI sowohl die sTfR-Freisetzung aus HL60-Zellmembranen als auch von HL60-Zellen inhibierte (Abbildungen 21 und 24), gibt einen Hinweis darauf, dass die TfR-Sheddingprotease durch eine furinähnliche Proproteinconvertase aktiviert wird. Diese Vermutung wird unterstützt durch eine Studie, in der die Aktivierung von ADAM-10 durch Furin und Proproteinconvertase-7 (PC-7) im Detail untersucht wurde. Insbesondere konnte die Aktivierung von ADAM-10 in HEK-Zellen durch FCI inhibiert werden (Anders *et al.*, 2001).

4.3 Analyse des alternativen sTfR

In der vorliegenden Arbeit konnten zwei Proteasen identifiziert werden, die den TfR an zwei bisher nicht beschriebenen Schnittstellen im TfR-*Stalk* spalten. Neutrophile Elastase schneidet den TfR zwischen Val-108 / Arg-109 und Cathepsin G zwischen Lys-95 / Thr-96. Diese Schnittstellen liegen folglich nur wenige Aminosäuren von der Hauptschnittstelle des TfR zwischen Arg-100 / Leu-101 entfernt, welche durch N-terminale Sequenzierung eines aus humanem Serum isolierten sTfR bestimmt wurde (Shih *et al.*, 1990). Wird gereinigter TfR mit Trypsin proteolytisch gespalten erhält man ein 70-kDa-TfR-Fragment, welches aus einer Spaltung des TfR zwischen Arg-121 / Leu-122 resultiert (Turkewitz *et al.*, 1988). Da Trypsin

ein Verdauungsenzym ist und von der Bauchspeicheldrüse in den Zwölffingerdarm sezerniert wird, kommt es *in vivo* unter physiologischen Bedingungen nicht mit dem TfR in Kontakt. Im Gegensatz hierzu sind Neutrophile Elastase und Cathepsin G leukozytäre Proteasen, die in azurophilen Granula von Neutrophilen gespeichert und ins extrazelluläre Medium sezerniert werden können. Im TfR-Freisetzungssassay aus HL60-Zellmembranen wurde neben der Hauptbande des sTfR₁₀₁ bei 80 kDa ein TfR-Fragment mit einer etwas geringeren apparenten molekularen Masse detektiert, welches in variierenden Anteilen auftrat, jedoch immer deutlich schwächer als der sTfR₁₀₁ (Abbildungen 16, 21 und 23). Aufgrund der apparenten molekularen Masse dieses alternativen sTfR (sTfR_a) könnte dieser durch Prozessierung des membrangebundenen TfR durch Neutrophile Elastase entstehen. Gegen eine Beteiligung der Neutrophilen Elastase spricht jedoch die Beobachtung von Dassler *et al.* (2003), dass in CHO-Zellen (*chinese hamster ovary*) eine alternative Form des sTfR nicht durch Serinproteaseinhibitoren inhibiert werden konnte, sondern Metalloproteaseinhibitoren wirksam waren. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die exakte Spaltstelle dieses sTfR_a nicht bekannt ist und dass verschiedene Zelllinien verwendet wurden, bei denen folglich auch unterschiedliche Proteasen zum TfR-Shedding beitragen könnten.

Die Vermutung, dass alternative Schnittstellen des TfR von Proteasen auch *in vivo* genutzt werden können, wird durch die Detektion von zwei sTfR-Formen im Überstand von U937-Zellen gestützt. Beide sTfR-Formen unterscheiden sich nur geringfügig in ihren apparenten molekularen Massen (Abbildung 3). Der N-Terminus der sTfR-Form mit der höheren apparenten molekularen Masse konnte durch Aminosäuresequenzierung als Glu-111 bestimmt werden. Diese Form könnte durch Spaltung des TfR durch Neutrophile Elastase und einer anschließenden weiteren Prozessierung durch eine Dipeptidylpeptidase, die zwar in den Zellen nicht aber in den gereinigten Fraktionen der A80-Aktivität vorhanden ist, entstanden sein.

Das Auftreten alternativer Sheddingprodukte ist im Fall der Freisetzung von TNF α bereits beschrieben worden. Insgesamt drei verschiedene Spaltstellen konnten in einem Abstand von wenigen Aminosäuren im proTNF α -*Stalk* identifiziert werden (Tabelle 1). Die Hauptschnittstelle wird durch TACE, ADAM-10 oder Matrilysin generiert, während die Nebenschnittstellen durch die MT4-MMP oder Proteinase-3 prozessiert werden. Die physiologische Bedeutung für das Auftreten dieser verschiedenen Spaltstellen ist jedoch bisher nicht geklärt.

Auch über die Funktion alternativer sTfR-Formen kann zum jetzigen Zeitpunkt nur spekuliert werden. So könnte die Nutzung alternativer TfR-Sheddingproteasen eine zusätzliche Möglichkeit der Regulation der Oberflächenexpression von membrangebundenen TfR und damit der Regulation der Eisenaufnahme darstellen. Des Weiteren könnten die alternativen N-Termini der sTfR-Formen oder die alternativen C-Termini der in der Membran verbleibenden TfR-Fragmente verschiedene Funktionen als Signalübermittler entweder als

freigesetzte Cytokine bzw. als membrangebundene Rezeptoren übernehmen. Eine derartige Funktion als Signaltransduktor ist bislang jedoch weder für den sTfR₁₀₁ noch für das membrangebundene TfR-Fragment bekannt.

4.4 TfR-Shedding durch leukozytäre Zelllinien

Vergleicht man die Kinetik der Freisetzung des sTfR mit dem Wachstumsverlauf von HL60-Zellen, stellt man fest, dass beide Prozesse direkt proportional zueinander verlaufen (Grandke, 2000). Dies steht in Übereinstimmung mit der Tatsache, dass pathologische Veränderungen in der Erythropoese und damit in der Zellproliferation erythroider Zellen mit veränderten Serumkonzentrationen von sTfR einhergehen. So führt eine gesteigerte Erythropoese bei autoimmunhämolytischen Anämien und Polycythaemien (Kohgo *et al.*, 1988), bei akuten lymphatischen und myeloischen Leukämien (Kato *et al.*, 1992) und bei erythroider Hyperplasie (Huebers *et al.*, 1990) zu einer erhöhten Konzentration von sTfR im Serum. Erniedrigte sTfR-Konzentrationen wurden dagegen an Patienten mit erythroider Hypoplasie, die mit einer verringerten Erythropoese einhergeht, festgestellt (Huebers *et al.*, 1990). Somit kann eine verringerte sTfR-Freisetzung von HL60-Zellen entweder auf eine direkte Inhibition des Sheddingprozesses oder auf eine verringerte Zellproliferation zurückgeführt werden. Letzteres wurde beobachtet, wenn HL60-Zellen mit Kinaseinhibitoren oder apoptose-induzierenden Reagenzien behandelt werden (Abschnitt 3.3.2.). Auch Proteaseinhibitoren können einen Einfluss auf die Zellproliferation ausüben, was im Fall von 1,10-Phenanthrolin bestätigt wurde. Dieser wachstumsinhibierende Einfluss ist wahrscheinlich auf dessen komplexierende Eigenschaft gegenüber Übergangsmetallionen zurückzuführen, da somit essentielle Metallionen nicht mehr von den Zellen aus dem Kulturmedium aufgenommen werden können.

Die Untersuchung der inhibierenden Wirkung von Proteaseinhibitoren wurde an der leukozytären Zelllinie HL60 getestet, für die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden konnte, dass der TfR an der Hauptschnittstelle zwischen Arg-100 / Leu-101 zum sTfR₁₀₁ proteolytisch gespalten wird. Für die Inhibitoren, die an HL60-Zellen getestet wurden (PefablocSC, FCI, MMP-Inhibitor-2 und TAPI-2), konnte kein poliferationsinhibierender Effekt in der jeweils getesteten Konzentration von 50 µM festgestellt werden, so dass deren Wirkung direkt auf den TfR-Sheddingprozess zurückgeführt werden kann (Abbildung 24). Für die getesteten Proteaseinhibitoren konnte eine ähnliche Wirksamkeit festgestellt werden wie bei der Untersuchung der sTfR-Freisetzungaktivität von isolierten HL60-Zellmembranen. Auffällig war jedoch, dass der Furininhibitor FCI einen stärker inhibierenden Einfluss auf das TfR-Shedding von HL60-Zellen hat als die Metalloproteaseinhibitoren MMP-Inhibitor-2 und TAPI-2. Dies lässt vermuten, dass der Aktivierung der am TfR-Shedding beteiligten Metalloprotease ein entscheidender Einfluss auf die TfR-Sheddingrate zukommt. Entweder ist die TfR-Sheddingprotease sehr instabil, so dass laufend neu synthetisierte und

aktivierte Protease nachgeliefert werden muss, oder der TfR-Sheddingprozess findet im gleichen Zellkompartiment wie die Aktivierung der TfR-Sheddingprotease statt und die aktivierte Protease entfernt sich schnell vom Ort des TfR-Sheddings.

Da der Proteinkinase C stimulierende Phorbolster PMA bei vielen Sheddingprozessen als Aktivator wirkt, wurde dieser in seiner Wirkung auf die leukozytären Zelllinien HL60, Jurkat und U937 getestet (Abbildung 25). Während für HL60- nur ein geringer und für Jurkat-Zellen kein stimulierender Effekt durch PMA festgestellt werden konnte, zeigten U937-Zellen einen starken Anstieg ihrer Sheddingaktivität, die zu einer sTfR-Freisetzung im Bereich der konstitutiven sTfR-Freisetzung der HL60- und Jurkatzellen führte. Da PMA jedoch ebenfalls eine Internalisierung des TfR bewirkt, könnte der TfR vom Ort des Sheddings entfernt werden. Da andererseits aber auch keine Inhibition des TfR-Sheddings beobachtet wurde, kann man folgern, dass (i) das TfR-Shedding unabhängig von einer PKC-Aktivierung ist und (ii) die TfR-Verteilung zwischen Zelloberfläche und Endosomen für das TfR-Shedding keine Rolle spielt (der Einfluss von PMA auf die Lokalisierung des TfR-Sheddings wird in Abschnitt 4.5 diskutiert). Das einzige Reagenz, das einen signifikant stimulierenden Effekt auf das TfR-Shedding aller drei untersuchten leukozytären Zelllinien hatte, war der Tyrosinphosphataseinhibitor Pervanadat. Für zwei Sheddingprozesse wurde die Stimulierung durch Pervanadat bereits gezeigt. In der Brustkrebszelllinie BT-474 konnte die Freisetzung der extrazellulären Domäne des HER-2-Rezeptors durch Pervanadat erheblich gesteigert werden, während PMA dagegen keinen Effekt zeigte. Dieser Prozess ließ sich durch TIMP-1 aber nicht TIMP-2 inhibieren (Codony-Servat *et al.*, 1999). Die Freisetzung von TRANCE, einem Mitglied der TNF-Familie, wird durch mindestens zwei Proteasen bewirkt, von denen eine durch Pervanadat zu aktivieren ist und durch TIMP-2, aber nicht durch TIMP-1 inhibiert wird (Schlöndorff *et al.*, 2001). Die Inhibition der pervanadatstimulierten Sheddingprozesse von HER-2 und TRANCE durch TIMP-1 bzw. TIMP-2 zeigt, dass vermutlich verschiedene Proteasen aus der Metzincin-Superfamilie, zu der sowohl MMPs als auch ADAMs gehören, für das beobachtete Shedding verantwortlich sind. Jedoch kann in beiden Fällen eine Beteiligung von TACE ausgeschlossen werden, da TACE ausschließlich durch TIMP-3 inhibiert wird (Amour *et al.*, 1998).

4.5 Lokalisierung des TfR-Sheddings

Der Nachweis von spezifisch gespaltenen TfR-Fragmenten in HL60-Zellmembranen zeigt (Abbildung 14), dass das TfR-Shedding entweder intrazellulär oder auf der Plasmamembran von HL60-Zellen stattfindet. Dies steht nicht im Widerspruch zu der Exosomentheorie von Ahn und Johnstone, da diese den Sheddingprozess anhand von Retikulozyten studierten, welche die letzte Stufe der Differenzierung der Erythrozyten darstellen und deshalb bereits viele Zellfunktionen nicht mehr ausüben vermögen (Ahn und Johnstone, 1993; Johnstone, 1996). Da die in der vorliegenden Arbeit untersuchte mikrosomale Membranfraktion von

HL60-Zellen neben Plasmamembranen ebenfalls Endosomen- und Vesikelmembranen enthalten, ist es wahrscheinlich, dass diese auch die von Baynes *et al.* (1994) postulierten multivesikulären Endosomen enthalten, in denen das TfR-Shedding stattfinden soll. In dieser Veröffentlichung konnte ein einfach gespaltenes TfR-Dimer in K562- und HL60-Zellmembranen detektiert werden, jedoch nicht ein kleines membrangebundenes TfR-Fragment, welches durch Abspaltung beider extrazellulärer Domänen des TfR entstehen würde. Stattdessen wurde ein entsprechendes kleines TfR-Fragment in Exosomen im Kulturüberstand der K562- und HL60-Zellen nachgewiesen. Im Gegensatz hierzu wurde in der vorliegenden Arbeit eindeutig gezeigt, dass in HL60-Zellmembranen ein kleines, membrangebundenes TfR-Fragment lokalisiert ist, welches ein spezifisches Spaltprodukt der TfR-Sheddingprotease darstellt, da dessen Konzentration nach Inkubation der Membranen bei 37 °C gleichzeitig mit der Freisetzung des sTfR aus den Membranen zunahm (Abbildung 14). Eine Verunreinigung der HL60-Membranpräparationen mit Exosomen aus dem Zellkulturüberstand kann ausgeschlossen werden, da die HL60-Zellen vor der Homogenisierung intensiv mit PBS gewaschen wurden.

Zur Untersuchung in welchem Zellkompartiment das TfR-Shedding stattfindet, wurden Oberflächenproteine von leukozytären Zelllinien biotinyliert und die Zellen für 24 h rekultiviert. In allen untersuchten leukozytären Zelllinien wurde biotinylierter sTfR fast ausschließlich im Zellkulturüberstand nachgewiesen (Abbildung 26). Dies beweist, dass TfR zunächst an der Zelloberfläche erscheint, bevor er als sTfR proteolytisch abgespalten wird. Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Rutledge *et al.*, die mittels *Pulse-chase*-Untersuchungen zeigten, dass der sTfR nicht auf dem Biosyntheseweg proteolytisch abgespalten wird, sondern erst nach Erreichen der Zelloberfläche. Weiterhin wurde in dieser Studie gezeigt, dass das Shedding des TfR wahrscheinlich in einem endosomalen Kompartiment stattfindet, auch wenn die Spaltungseffizienz unabhängig von der Ansäuerung der Endosomen war (Rutledge *et al.*, 1994a). Die Beobachtung, dass die sauren Endosomen tatsächlich keine Rolle beim TfR-Shedding spielen, konnte ebenfalls in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, da die sTfR-Freisetzungseffizienz in isolierten Zellmembranen von HL60-Zellen ein pH-Optimum im neutralen Bereich hat und bei einem pH unterhalb von 6,5 praktisch vollständig verschwindet (Abbildung 17).

Weitere Hinweise zur Lokalisierung des TfR-Sheddings erbrachten Zellstimulationen mit PMA, das zum einen die Internalisierung des TfR bewirkt, aber zum anderen auch allgemeine Sheddingprozesse aktiviert. Die beobachtete geringfügige Aktivierung des TfR-Sheddings bei HL60-Zellen durch PMA (Abbildung 25) steht im Gegensatz zu einer Untersuchung von Chitambar und Zivkovic-Gilgenbach (1990), die eine Reduktion des TfR-Sheddings bei HL60-Zellen nach PMA-Behandlung beobachteten. Der Grund hierfür könnte in den unterschiedlichen Detektionsverfahren für den freigesetzten sTfR liegen. Während Chitambar und Zivkovic-Gilgenbach Dotblot-Analysen des Zellkulturüberstandes eingesetzt haben,

wurde in der vorliegenden Arbeit ein TfR-spezifischer ELISA zur Analyse der sTfR-Freisetzung verwendet. Chitambar und Zivkovic-Gilgenbach folgern aus ihren Untersuchungen, dass der sTfR von der Zelloberfläche abgespalten wird, da durch PMA-induzierte TfR-Internalisierung die sTfR-Freisetzung von HL60-Zellen reduziert wird. Aus den HL60-Zellstimulierungsversuchen der vorliegenden Arbeit lässt sich dagegen schließen, dass sowohl die Verringerung des TfR auf der Zelloberfläche als auch die Konzentrierung des TfR in den Endosomen keinen Einfluss auf die Sheddingaktivität haben und damit diese beiden Zellkompartimente vermutlich keine Rolle beim TfR-Shedding spielen. Man muss jedoch berücksichtigen, dass die PMA-induzierte Veränderung in der Zelllokalisierung des TfR möglicherweise durch einen aktivierenden Effekt des PMA auf die TfR-Sheddingprotease überlagert sein könnte. Zudem kann die Lokalisierung der beteiligten TfR-Sheddingprotease in der Zelle durch PMA verändert sein, wie es im Fall von TACE gezeigt wurde, welches durch PMA-Stimulierung in ein endosomales Kompartiment internalisiert wird (Doedens und Black, 2000).

Eine mögliche Lokalisierung des TfR-Sheddings könnte im Golgi-Apparat oder einem Golgi-ähnlichen Kompartiment liegen, da ein geringer Teil des endozytierten TfR (5–15 %) nicht in die sauren Endosomen gelangt, sondern zum Golgi wandert und mittels sekretorischer Vesikel wieder zurück zur Zelloberfläche (Woods *et al.*, 1986; Fishman und Fine, 1987). Diese sekretorischen Vesikel könnten die multivesikulären Endosomen darstellen, welche als Ort des TfR-Sheddings postuliert werden (Baynes *et al.*, 1994). Eine Voraussetzung für diesen postulierten TfR-Sheddingmechanismus ist jedoch, dass ein retrograder Recyclingweg des TfR – von der Zelloberfläche zum Golgi und wieder zurück – existiert, der jedoch nicht mit dem Biosyntheseweg des TfR zusammenläuft, da ein Shedding auf diesem Weg nicht stattfindet (Rutledge *et al.*, 1994a). Die mögliche Lokalisierung des TfR-Sheddings im Golgi-Apparat wird unterstützt durch die Tatsache, dass ADAM-Proteasen im Golgi zu ihrer aktiven Form prozessiert werden, wie es für ADAM-9 (Roghani *et al.*, 1999), ADAM-10 (Lammich *et al.*, 1999), ADAM-15 (Lum *et al.*, 1998), ADAM17 / TACE (Schlöndorff *et al.*, 2000) und ADAM-19 (Shirakabe *et al.*, 2001) beobachtet wurde. Für die proteolytische Prozessierung der Vorläufer von TNF α und Neuregulin- β 1 (ein Mitglied der EGF-Familie) zu ihren aktiven Formen durch TACE bzw. ADAM-19 wurde zudem gezeigt, dass das Shedding nach der Synthese der Vorläufer vermutlich im Golgi-Apparat oder einem anderen sekretorischen Kompartiment stattfindet (Solomon *et al.*, 1997; Shirakabe *et al.*, 2001). Die Spaltung von APP an der α -Sekretase-Schnittstelle wird ebenfalls durch aktive Formen von TACE und / oder ADAM-10 im Golgi-Apparat durchgeführt (Skovronsky *et al.*, 2001).

4.6 Ausblick

Die diskutierten Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass es sich bei der in der humanen leukozytären Zelllinie HL60 nachgewiesenen, den TfR freisetzenden Protease um eine

Metalloprotease handelt, die zu den integralen Membranproteinen zu zählen ist und vermutlich der Familie der ADAM-Proteasen angehört. Dieser Befund lässt vermuten, dass diese erst vor wenigen Jahren entdeckte Proteasefamilie eine weitreichende biologische Bedeutung besitzt, da sie nicht nur an den Sheddingprozessen von relevanten Proteinen wie $\text{TNF}\alpha$, APP und L-Selektin beteiligt ist, sondern auch in einem wichtigen Stoffwechselweg – dem Eisenstoffwechsel – eine bedeutende Rolle spielt.

Die Identifizierung der TfR-Sheddingprotease legt die Grundlage für weitere Untersuchungen dieses Sheddingprozesses. Eine zentrale Frage betrifft die noch ungeklärte biologische Funktion des TfR-Sheddings. Eine naheliegende Vermutung ist die Möglichkeit der schnellen Verminderung der Eisenaufnahme durch Abspalten der transferrinbindenden Domäne des TfR von der Zelloberfläche, da die Halblebenszeit des TfR mit etwa 10–16 h (Ward *et al.*, 1982; Snider und Rogers, 1985; Lesley *et al.*, 1989) vergleichsweise hoch ist. Dieser Vermutung widersprechen jedoch *in-vivo*-Studien, nach denen unter Eisenmangelzuständen die sTfR-Konzentration im Blut nicht sinkt, sondern im Gegenteil ansteigt. Dies wird auf eine unter dieser Bedingung erhöhte Expressionsrate des TfR zurückgeführt, die somit zu einer gleichfalls erhöhten sTfR-Freisetzung führt (Skikne *et al.*, 1990). Zudem wurde beobachtet, dass die Zelle bereits über einen Mechanismus zur Herabregulation der Eisenaufnahme über den TfR auf Proteinebene mit Hilfe des mit Transferrin kompetierenden HFE-Proteins verfügt (Parkkila *et al.*, 1997; Bennett *et al.*, 2000). Über andere Funktionen des TfR-Sheddings – wie Cytokinfunktionen des freigesetzten sTfR oder die Signaltransduktion durch das verbleibende membrangebundene TfR-Fragment – kann derzeit nur spekuliert werden. Diese Funktionen bieten deshalb ein spannendes Feld für weitere Studien.

Ein weiteres Ziel zukünftiger Untersuchungen liegt in der Feststellung der exakten Lokalisierung des TfR-Sheddings. So können die hierzu durchgeführten *Pulse-Chase*-Untersuchungen (Rutledge *et al.*, 1994a) und die in dieser Arbeit durchgeführten Biotinylierungsversuche zwar belegen, dass das TfR-Shedding nicht auf dem Biosyntheseweg eintritt, sondern erst nachdem der TfR die Zelloberfläche erreicht hat, aber nicht, in welchem Zellkompartiment das Shedding schließlich tatsächlich stattfindet. Für diese Versuche bietet sich der Einsatz von Reagenzien an, die in Proteinwanderungswege eingreifen und so eine Unterscheidung der beteiligten Zellkompartimente möglich machen.

Eine weitere interessante Fragestellung ergibt sich aus der Beobachtung dieser Arbeit, dass ein natürlicher Inhibitor für Metalloproteasen, TIMP-1, in der Lage ist, die sTfR-Freisetzung aus isolierten Zellmembranen zu hemmen. Insbesondere könnte ein direkter Zusammenhang zwischen der proliferationsstimulierenden Wirkung von TIMP-1, das ursprünglich als Wachstumsfaktor (*erythroid-potentiating activity*, EPA) entdeckt und beschrieben wurde (Golde *et al.*, 1980; Docherty *et al.*, 1985), und seiner inhibitorischen Wirkung auf die TfR-Sheddingprotease bestehen.