

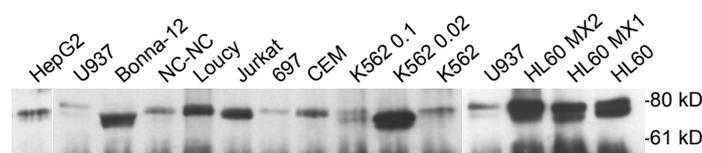
## 3 ERGEBNISSE

### 3.1 Serumtransferrinrezeptor-Freisetzung in Zelllinien

Da bei der Entwicklung von erythroiden Vorläuferzellen zu roten Blutkörperchen ein besonders hoher Eisenbedarf für die Synthese von Hämoglobin besteht, wird in diesen Zellen sehr viel TfR exprimiert, der in einem kleinen Anteil durch konstitutives Shedding in das Blut freigesetzt wird. Die Konzentration an sTfR korreliert deshalb mit der erythropoetischen Aktivität. Um zu überprüfen, ob die Freisetzung des sTfR ein universeller Vorgang jeder TfR-exprimierenden Zelle ist oder ob er auf die Erythropoese beschränkt ist, wurden verschiedenste Zelllinien auf sTfR-Freisetzung untersucht.

#### 3.1.1 Nachweis des Serumtransferrinrezeptors

Zum Nachweis des freigesetzten sTfR aus den verschiedenen Zelllinien wurde dieser durch Immunpräzipitation mit dem gegen die extrazelluläre Domäne des TfR gerichteten Antikörper OKT9 aus dem Zellkulturüberstand isoliert und angereichert. Die Detektion des immunpräzipitierten sTfR erfolgte nach Auftrennung durch SDS-PAGE im Westernblot ebenfalls mit dem Antikörper OKT9 (Abbildung 3-1).

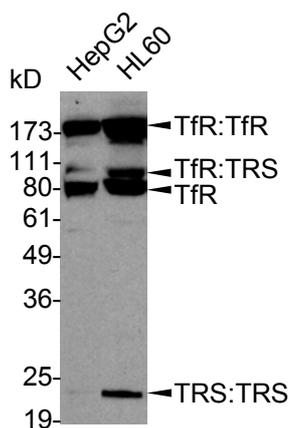


**Abbildung 3-1: Nachweis des sTfR im Überstand von Zelllinien.** Zum Nachweis des sTfR wurden  $5 \times 10^6$  Zellen der verschiedenen Zelllinien für 8 Tage kultiviert (für HepG2  $1,5 \times 10^6$  Zellen für 4 Tage) und der akkumulierte sTfR aus dem Zellmedium durch Immunpräzipitation isoliert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunoblot mit OKT9 detektiert. K562 0.1, K562 0.02, HL60 MX1 und HL60 MX2 sind *multi drug* resistente Abkömmlinge von den Zelllinien K562 und HL60. U937-Zellen sind in beiden Blots als interner Standard aufgetragen. Am untersten Blotrand sind die schweren Ketten der Immunglobuline aus der Immunpräzipitation zu erkennen.

In allen untersuchten Zelllinien, sowohl in myeloiden (K562) und promyeloiden Zellen (HL60) als auch in lymphatischen Vorläuferzellen (BONNA-12), Monocyten (U937), T-Zellen (Loucy, Jurkat, CEM) und B-Vorläuferzellen (697) sowie in hepatocytären Zellen (HepG2), wurde ein TfR-Fragment mit einer molekularen Masse von ca. 80 kD in den Zellüberstand freigesetzt. Die Menge an sTfR unterscheidet sich jedoch von Zelllinie zu Zelllinie erheblich. Nicht nur myeloide Vorläuferzellen, wie K562, besitzen die Fähigkeit sTfR freizusetzen, sondern TfR-exprimierende Zellen des gesamten Blutsystems. Bemerkenswert ist, dass für die adhärenente hepatocytäre Zelllinie HepG2 ebenfalls Sheddingaktivität nachgewiesen werden konnte. Damit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass auch Gewebezellen sTfR bilden. Neben den Unterschieden in der proteolytischen Freisetzungsaktivität unterscheidet sich auch die molekulare Masse des sTfR von Zelllinie zu Zelllinie (Bonna-12 deutlich kleiner als 80 kD und Loucy knapp über 80 kD). Bei einigen Zelllinien erscheint der sTfR auch als Doppelbande. Diese Unterschiede weisen auf unterschiedliche Glycosylierungen und alternative Spaltstellen hin.

### 3.1.2 Nachweis zellulärer Transferrinrezeptor-Fragmente

Nach Spaltung des TfR in der *stalk*-Region und Freisetzung der extrazellulären Domäne als sTfR, verbleibt in der Zelle der membranständige Teil des Rezeptors (TRS für TfR-Segment). Die entstehenden zellulären TfR-Fragmente wurden in HL60- und HepG2-Zellen nachgewiesen (Abbildung 3-2). Nach Auftrennung der Zelllysate mittels SDS-PAGE wurden die TfR-Fragmente im Immunoblot mit dem gegen die cytosolische Domäne des TfRs gerichteten Antikörper H68.4 detektiert. Sowohl in HL60- als auch in HepG2-Zellen konnte der vollständige TfR als Dimer (180 kD) und als Monomer (90 kD) nachgewiesen werden.



**Abbildung 3-2: Zelluläre TfR-Fragmente in HL60- und HepG2-Zellen.** Zelllysate (25 µg Gesamtprotein) von HepG2- und HL60-Zellen wurden im 12 % SDS-Gel nicht reduzierend aufgetrennt und anschließend der TfR im Immunoblot mit H68.4 nachgewiesen. TfR:TfR, TfR-Dimer; TfR, TfR-Monomer; TfR:TRS, Dimer aus TfR und dem verbleibenden Fragment des TfR nach Abspaltung des sTfR (TRS); TRS:TRS, Dimer des TRS.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Freisetzung des sTfR ein Prozess ist, von dem alle TfR-tragenden Zellen betroffen sind. Die proteolytische Spaltung erfolgt am TfR-Dimer, wobei zunächst ein TfR-Molekül gespalten wird und dann das andere. In der Membran verbleibt nach Proteolyse ein membranständiges Fragment. Dies konnte sowohl in HepG2- als auch in HL60-Zellen gezeigt werden. Diese Zelllinien wurden im Folgenden ausgewählt, um ein Modellsystem für das TfR-Shedding zu entwickeln.

## 3.2 Entwicklung von Modellsystemen

Über den Mechanismus und die Regulation der sTfR-Freisetzung war bisher wenig bekannt. Mit Hilfe von Sheddinganalysen und Mutationsuntersuchungen am TfR sollten neue Kenntnisse über diese Vorgänge erlangt werden. Dazu war es notwendig, ein geeignetes System zu finden, mit dessen Hilfe die Wirkung der Mutationen untersucht und analysiert werden kann.

### 3.2.1 Charakterisierung von TRVb-Zellen

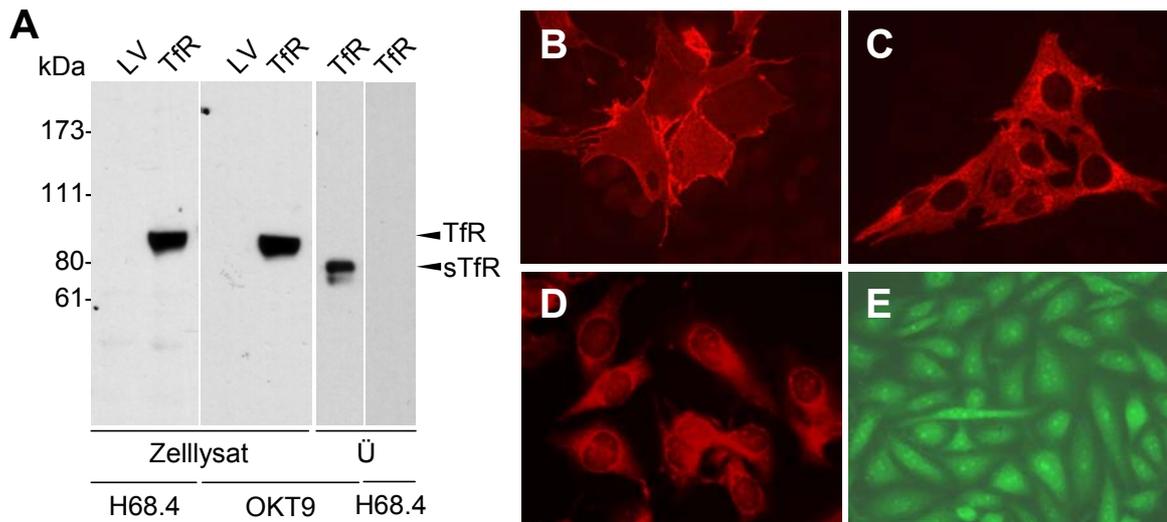
Die TRVb-Zellen bieten den Vorteil, dass sie keine endogene TfR-Aktivität besitzen. Die von CHO-Zellen abstammende Zelllinie ist hervorragend für die Expression von Proteinen geeignet und lässt sich sehr gut transfizieren. TRVb-Zellen stellen somit ein ausgezeichnetes Modell dar, um Mutationen im TfR zu analysieren.

#### 3.2.1.1 Transferrinrezeptor-Expression in TRVb-Zellen

Die TRVb-Zellen (freundlicherweise von Dr. Timothy. E. McGraw, Cornell University, New York zur Verfügung gestellt) wurden mit der cDNA des humanen TfR (freundlicherweise von Marino Zerial, Max Planck Institut für Molekulare Genetik, Dresden, zur Verfügung gestellt) im Vektor pcDNA6 transfiziert, mit Blasticidin selektioniert und die Expression des TfR nach Auftrennung der Zelllysate durch SDS-PAGE im Immunoblot mit den Antikörpern H68.4 und OKT9 überprüft. Als Vergleich wurden Zelllysate von Leervektor (LV) transfizierten TRVb-Zellen aufgetragen (Abbildung 3-3A). Wie erwartet, weisen TRVb-Zellen keinen endogenen TfR auf, während die transfizierten Zellen TfR mit einem Molekulargewicht von 90 kD exprimieren. Dieser kann sowohl vom Antikörper H68.4 als auch von OKT9 erkannt werden. In Immunfluoreszenzanalysen mit dem Antikörper OKT9 zeigt sich, dass der TfR auf der Zelloberfläche exprimiert wird (Abbildung 3-3B) und auch seine intrazelluläre endosomale Verteilung der von endogenem TfR in HepG2-Zellen entspricht (Vergleiche Abbildung 3-3C mit E). Weiterhin können die TfR transfizierten TRVb-Zellen auch mit ferri-Tf-FITC angefärbt werden (Abbildung 3-3D). Diese Untersuchungen zeigen, dass der transfizierte TfR korrekt exprimiert wird und die wesentlichen Charakteristika für eine vollständige Funktionalität besitzt.

#### 3.2.1.2 Transferrinrezeptor-Shedding in TRVb-Zellen

Zunächst war zu überprüfen, ob der sTfR von TRVb-Zellen in ähnlicher Weise in den Zellkulturüberstand freigesetzt wird wie von anderen Zellen (vergleiche Abbildung 3-1). Tatsächlich konnte durch Transferrinaffinitätspräzipitation aus dem Zellüberstand ein Protein isoliert und aufkonzentriert werden, das durch OKT9 im Immunoblot anfärbbar ist, nicht jedoch mit H68.4, und vom Molekulargewicht dem sTfR entspricht (Abbildung 3-3A). Auffällig ist, dass dieser sTfR, genauso wie der von HL60 und U937-Zellen, als Doppelbande erscheint, was auf unterschiedliche Spaltprodukte hindeutet.



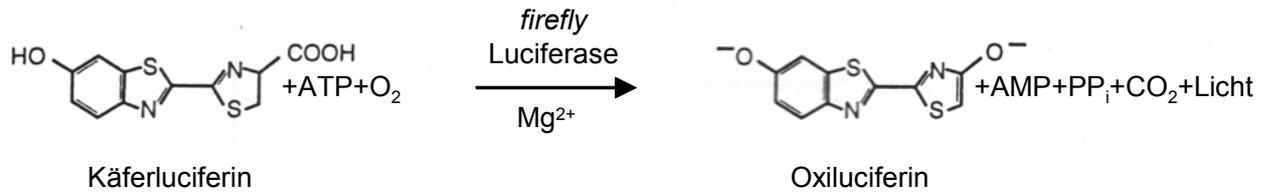
**Abbildung 3-3: Tfr-Expression in TRVb-Zellen.** (A) Zelllysate von transfizierten TRVb-Zellen (25  $\mu$ g Gesamtprotein) wurden im reduzierenden 7,5 % SDS-Gel aufgetrennt und im Immunoblot mit H68.4 und OKT9 analysiert. In Immunfluoreszenzanalysen wurden nicht permeabilisierte (B) und permeabilisierte (C) Zellen mit OKT9 und Rhodamin konjugiertem GAM gefärbt. Zur Kontrolle wurden in gleicher Weise permeabilisierte HepG2-Zellen behandelt (D). (E) Nicht fixierte TRVb-Zellen wurden für 1 h mit ferri-Tf-FITC gefärbt.

### 3.2.2 Sheddingreporterassay

Zur Untersuchung von Sheddingmechanismen und ihrer Regulation wurden Mutationen in den Tfr eingebracht, die Einfluss auf den Sheddingvorgang nehmen. Um einerseits Effekte solcher Mutationen möglichst schnell und einfach zu analysieren und andererseits den mutierten Tfr vom endogenen Tfr in HepG2-Zellen und HL60-Zellen zu unterscheiden, wurde ein Tfr-Sheddingreporter konstruiert werden. Die Idee des Tfr-Sheddingreporters entstand in Anlehnung an klassische Reporterassays zum Nachweis von Promotoraktivierung, jedoch wurde hier der Tfr direkt mit einem Reporterenzym gekoppelt exprimiert werden. Bei Sheddingaktivität wird das Reporterenzym in den Zellüberstand freigesetzt. Damit hätte man ein System, mit dem es möglich wäre, erstens die Expression des Tfr-Sheddingreporters und der Mutanten in den Zellen nachzuweisen und zu quantifizieren, zweitens die Sheddingaktivität hoch sensitiv und dennoch einfach und direkt zu quantifizieren und drittens den Einfluss von Tfr-Mutationen, Shedding beeinflussenden Reagenzien und Proteaseinhibitoren zu analysieren.

#### 3.2.2.1 Firefly-Luciferase

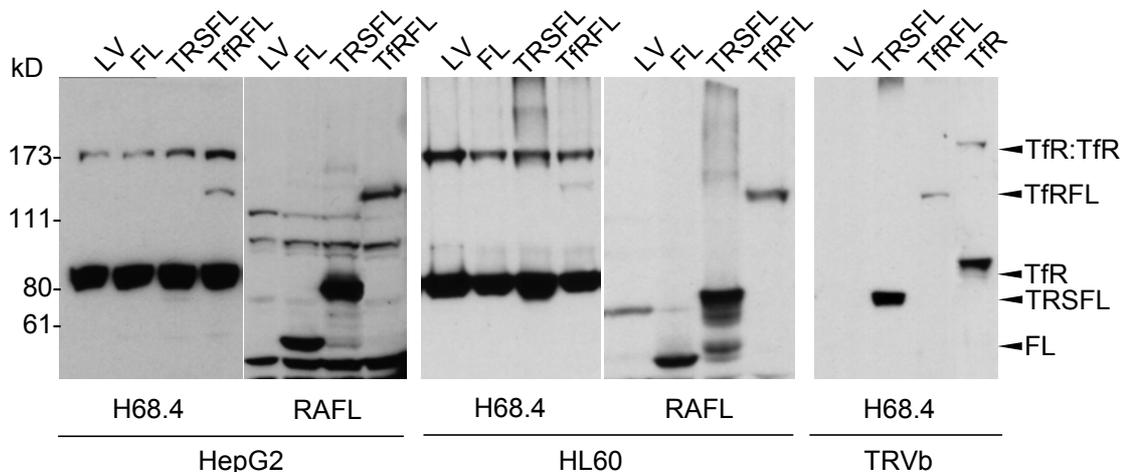
Als Reporterenzym wurde zunächst *firefly*-Luciferase ausgewählt. Ihre Enzymaktivität lässt sich hochsensitiv nachweisen (Abbildung 3-4). Das bei der Umsetzung von Luciferin zu Oxoluciferin freigesetzte Licht kann im Luminometer nachgewiesen und quantifiziert werden.



**Abbildung 3-4: *firefly*-Luciferasereaktion**

Die cDNA von *firefly*-Luciferase (FL) aus dem Vektor pGL3c wurde allein oder 3'-seitig des TfR oder 3'-seitig von verkürzten TfR-Segmenten (TRS) in die eukaryontischen Expressionsvektoren pcDNA3 und pcDNA6 kloniert (siehe Anhang). Damit erhält man TfR gekoppelt mit Luciferase (TfRFL) oder TfR, dessen Ectodomäne durch *firefly*-Luciferase ersetzt wurde, der aber noch über den gesamten *stalk*-Bereich verfügt (TRSFL).

Die Konstrukte wurden sowohl in HepG2-Zellen und HL60-Zellen als auch in TRVb-Zellen, die keinen endogenen TfR besitzen, transfiziert. Nach Selektion der transfizierten Zellen mit Geniticin für pcDNA3 oder Blasticidin für pcDNA6 wurde die Expression der Proteine in Totallysaten der Zellen mittels SDS-PAGE und anschließendem Immunoblot nachgewiesen (Abbildung 3-5).

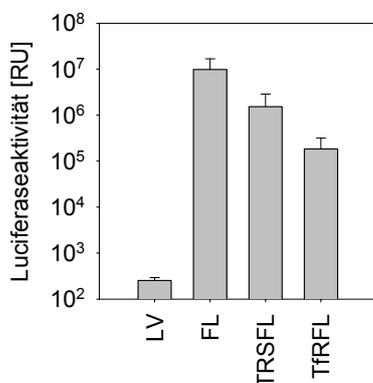


**Abbildung 3-5: Nachweis der *firefly*-Luciferasekonstrukte in transfizierten HepG2-, HL60- und TRVb-Zellen.** Zelllysate der transfizierten Zellen (25  $\mu$ g Gesamtprotein) wurden im reduzierenden 7,5 % SDS-Gel aufgetrennt und im Immunoblot mit den Antikörpern H68.4 gegen TfR und RAFL gegen *firefly*-Luciferase gefärbt.

Mit dem polyklonalen Antikörper gegen *firefly*-Luciferase (RAFL) ließen sich Banden in Höhe von 60 kD für FL, bei 85 kD für TRSFL und bei 150 kD für TfRFL anfärben, die den erwarteten Molekulargewichten der Proteine entsprechen (Abbildung 3-5). Die TfR-Konstrukte können ebenfalls mit H68.4 detektiert werden, nicht jedoch *firefly*-Luciferase allein. Mit dem Antikörper lassen sich auch die endogenen TfR-Formen nachweisen. Das TfR-Dimer ist, wie zu erwarten, bei 180 kD detektierbar und das TfR-Monomer bei 90 kD. Das Molekulargewicht von TRSFL unterscheidet sich nur um 5 kD von dem des TfR-

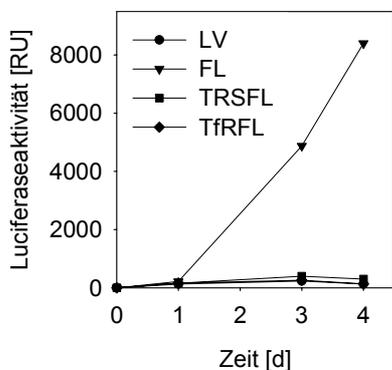
Monomers. In HepG2-Zellen ist deshalb die zum TRSFL gehörige Bande nur schwach mit H68.4 direkt unter der des TfR-Monomers detektierbar, bei HL60 Zellen verschmelzen diese beiden Banden. Der Unterschied zu den anderen TfR-Banden ist jedoch deutlich erkennbar. TRVb-Zellen exprimieren keinen endogenen TfR, deshalb wurden zum Vergleich Zellysate von Zellen aufgetragen, die mit humanem TfR transfiziert wurden. Auch in diesen Zellen konnten die TfR-Konstrukte mit den erwarteten Molekulargewichten nachgewiesen werden.

Um zu überprüfen, ob die *firefly*-Luciferase in den Konstrukten aktiv vorliegt, wurde ein Luciferaseassay (2.11.2) durchgeführt, bei dem die Aktivität des Enzyms im Zellysate bestimmt wurde (Abbildung 3-6). Alle TfR-*firefly*-Luciferasekonstrukte besitzen eine hohe Enzymaktivität. Im Vergleich ist die Aktivität von TRSFL erhöht gegenüber TfRFL, jedoch wird das kleinere TRSFL-Konstrukt auch stärker exprimiert. Freie *firefly*-Luciferase weist das höchste Signal auf.



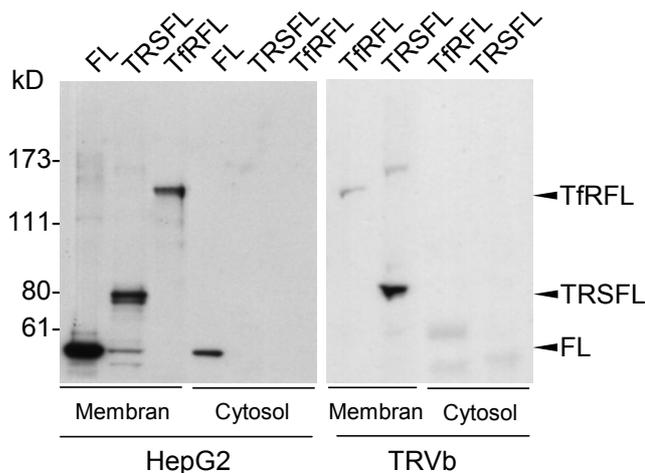
**Abbildung 3-6: Die Enzymaktivität von TfR-*firefly*-Luciferasekonstrukten.** Die *firefly*-Luciferaseaktivität der Konstrukte wurde in transfizierten HepG2-Zellen ( $3 \times 10^4$ ) mittels Luciferaseassay quantifiziert. Die Daten stellen Mittelwerte mit S.A.M. dar und resultieren aus vier unabhängigen Experimenten.

Zur letztendlichen Bestimmung der Sheddingaktivität der TfR-Konstrukte wurden transfizierte HepG2-Zellen für vier Tage in phenolrotfreiem Medium kultiviert und nach einem, drei und vier Tagen der Zellüberstand abgenommen und auf *firefly*-Luciferaseaktivität überprüft (Abbildung 3-7). Keines der TfR-Konstrukte wies eine nennenswerte Aktivität im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen auf. Überraschend war, dass die alleinige Expression der *firefly*-Luciferase zu einer geringen Aktivität im Überstand führte.



**Abbildung 3-7: *firefly*-Luciferaseaktivität im Zellüberstand.** Transfizierte HepG2-Zellen ( $5 \times 10^4$  Zellen / ml) wurden für vier Tage in phenolrotfreiem Medium kultiviert und anschließend die *firefly*-Luciferaseaktivität in 10  $\mu$ l der gesammelten Zellüberstände mittels Luciferaseassay vermessen.

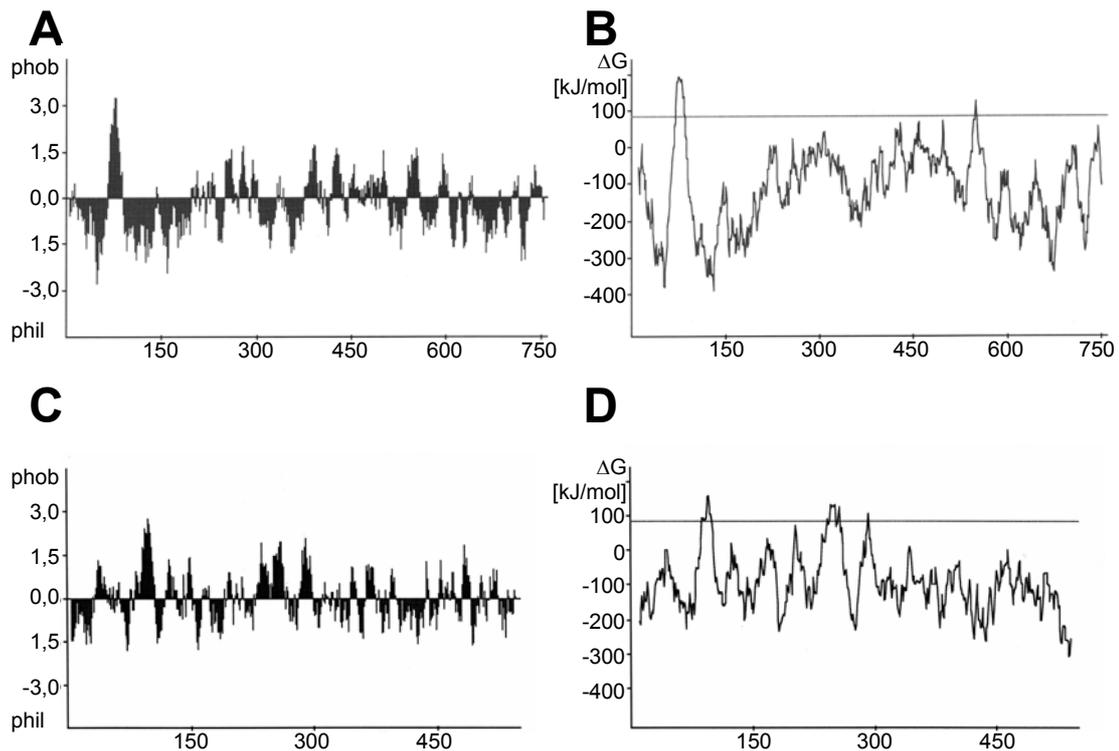
Da in Zelllysaten eine *firefly*-Luciferaseaktivität messbar war, muss das Enzym in seiner aktiven Form in den Zellen vorliegen, unabhängig davon, ob es an TfR und TRS gebunden oder frei ist. Eine Ursache für die fehlende Sheddingaktivität könnte eine unkorrekte Lokalisation innerhalb der Zelle sein. Um zu überprüfen, ob die *firefly*-Luciferasekonstrukte in die Zellmembran integriert sind, wurde eine Membranisolierung über differentielle Zentrifugation durchgeführt (2.11.12). Membran- und Cytosolfraction wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunoblot mit RAFL gefärbt (Abbildung 3-8). Alle Konstrukte können mit dem erwarteten Molekulargewicht in den Membranfraktionen nachgewiesen werden, während *firefly*-Luciferase auch im Cytosol detektierbar ist.



**Abbildung 3-8: Membranintegration der *firefly*-Luciferasekonstrukte.** Aus transfizierten HepG2- und TRVb-Zellen wurden durch differentielle Zentrifugation der Cytosolanteil und mikrosomale Membranfraktionen isoliert, diese in einem 7,5 % SDS-Gel aufgetrennt und die *firefly*-Luciferasekonstrukte im Immunoblot mit RAFL-Antikörper nachgewiesen.

Da die Konstrukte Membran gebunden vorliegen, die *firefly*-Luciferase jedoch durch Proteolyse nicht freigesetzt werden kann, ist anzunehmen, dass die Konstrukte nicht korrekt in die Membran integriert werden. Wie in der Einleitung erwähnt, ist der TfR ein Typ-II-Membranprotein. Nach Translation seiner cytosolischen Domäne wird der Membranbereich durch die Membrantransfersequenz in die Membran integriert und anschließend die Ectodomäne Stück für Stück translatiert und durch die Membran geschoben.

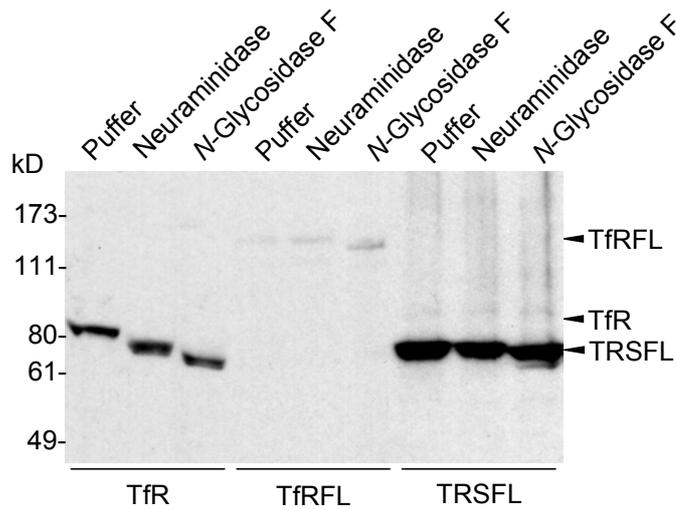
Betrachtet man Hydrophobizitäts- und Transferenergiediagramme vom TfR (Abbildung 3-9A und B), so kann man deutlich erkennen, dass der membranständige Teil (AS 68–88) die höchste Hydrophobizität und eine für den Membrandurchgang notwendige Transferenergie von über 80 kJ/mol aufweist. Im Vergleich dazu besitzt auch *firefly*-Luciferase stark hydrophobe Sequenzen (Abbildung 3-9C und D). Einige AS-Bereiche erreichen Transferenergien über 80 kJ/mol. Diese Daten weisen darauf hin, dass die Integration in die Membran tatsächlich falsch ablaufen könnte. Möglicherweise erfolgt die Translation durch die Membran nur bis zu dem hydrophoben Bereich AS 92–101 der *firefly*-Luciferase, der dann in der Membran verbleibt. Der restliche Teil des Proteins wird cytosolisch exprimiert.



**Abbildung 3-9: Hydrophobizitäts- und Transferenergiediagramm von TfR und *firefly*-Luciferase.** Hydrophobizitäts- (A und C) und Transferenergiediagramm (B und D) für die AS-Sequenz von TfR (A und B) und *firefly*-Luciferase (C und D).

Diese Hypothese konnte durch Glycosylierungsuntersuchungen bestätigt werden. Der TfR ist ein Glycoprotein, das sowohl über *N*- (AS N251, N317 und N727) als auch über *O*-Glycosylierungen (T104) verfügt. Sowohl die komplexe *N*-Glycosylierung als auch die *O*-Glycosylierung enthalten Sialinsäurereste, die durch Neuraminidase entfernt werden können. Die gesamten Asparagin gebundenen Glycanketten sind mit *N*-Glycosidase F abspaltbar, wodurch in beiden Fällen die Mobilität in der SDS-PAGE verändert wird. Um zu untersuchen, ob die Konstrukte glycosyliert und auch sialyliert sind, wurden die Lysate der transfizierten Zellen mit *N*-Glycosidase F und Neuraminidase inkubiert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit dem Antikörper H68.4 im Immunoblot detektiert (Abbildung 3-10).

Wie zu erwarten, weist der TfR ein deutlich verändertes Laufverhalten nach Neuraminidasebehandlung auf, die Inkubation mit *N*-Glycosidase F erhöht seine Mobilität noch zusätzlich. Bei dem Konstrukt TfRFL ist dagegen keine Änderung nach Neuraminidasebehandlung erkennbar. *N*-Glycosidase F führt jedoch zu einer etwas erhöhten Mobilität, die aber im Vergleich zur Mobilitätsänderung des TfR nach *N*-Glycosidase F-Behandlung deutlich geringer ausfällt. Das Konstrukt TRSFL besitzt aufgrund der fehlenden Ectodomäne des TfR keine *N*-Glycosylierungsstellen. Ein Neuraminidaseverdau müsste dennoch die sialylierte *O*-Glycosylierung am T104 angreifen. Im Gel konnte jedoch keine Veränderung der Mobilität beobachtet werden. Beide Konstrukte sind demzufolge nicht sialyliert und damit nicht korrekt glycosyliert. TfRFL weist jedoch *N*-Glycosylierungen auf, was darauf hindeutet, dass der TfR-Anteil bei der Translation durch die Membran geschleust wird.



**Abbildung 3-10: Sialylierung und N-Glykosylierung der *firefly*-Luciferase-konstrukte.** Zellysate (25 µg Gesamtprotein) aus transfizierten TRVb-Zellen wurden für 10 h ohne oder mit 1,25 mU/µl Neuraminidase oder 5 mU/µl N-Glykosidase F inkubiert, anschließend im 7,5 % SDS-Gel aufgetrennt und im Immunoblot mit H68.4-Antikörper gefärbt.

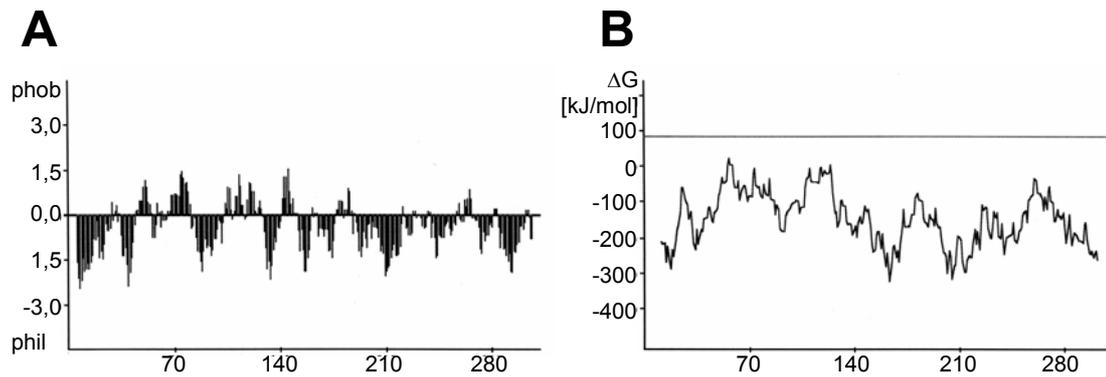
Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich die TfR-*firefly*-Luciferasekonstrukte gut in verschiedenen Zelllinien exprimieren lassen. Das Enzym liegt in den Zellen in seiner aktiven Form vor und behält diese bei Sekretion in den Zellüberstand. Die Konstrukte werden in die Membran integriert, jedoch kann die *firefly*-Luciferase nicht durch Shedding in den Überstand freigesetzt werden.

Die Fusion mit *firefly*-Luciferase verhindert die Sialylierung des TfR, vermutlich weil seine korrekte Struktur durch größere Hydrophobizitätsbereiche der *firefly*-Luciferase nicht ausgebildet werden kann. Zusammenfassend muss aus diesen Ergebnissen geschlossen werden, dass *firefly*-Luciferase als Reporterenzym für das TfR-Shedding ungeeignet ist.

### 3.2.2.2 *Renilla*-Luciferase

*Renilla*-Luciferase und *firefly*-Luciferase weisen auf Grund ihres evolutionären Ursprungs unterschiedliche Enzymstrukturen und verschiedene Substratanforderungen auf. Das 36 kD monomere Enzym aus *renilla reniformis* besitzt nur 14 % Homologie zur *firefly*-Luciferase.

Vergleicht man die Aminosäurezusammensetzung beider Enzyme, so fällt auf, dass *renilla*-Luciferase deutlich weniger hydrophobe Aminosäurebereiche aufweist und keine ausreichende Transferenergie besitzt (Abbildung 3-11). Sie hat somit die positiven Eigenschaften der *firefly*-Luciferase in Bezug auf die Nachweisbarkeit, könnte jedoch aufgrund ihrer AS-Zusammensetzung besser als Reporter geeignet sein.



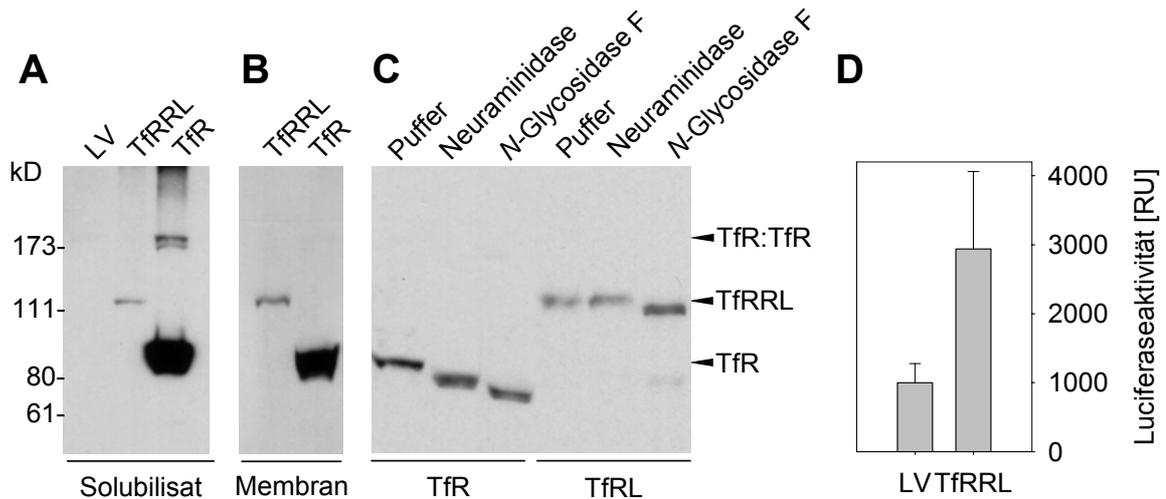
**Abbildung 3-11: Hydrophobizitäts- und Transferenergiediagramm von *renilla*-Luciferase.** Hydrophobizitäts- (A) und Transferenergiediagramm (B) für die AS-Sequenz von *renilla*-Luciferase.

Die cDNA der *renilla*-Luciferase aus dem Vektor pRLTK (Promega) wurde 3'-seitig der cDNA des TfR in den Vektor pcDNA6 kloniert (siehe Anhang) und dieser in HL60- und TRVb-Zellen transfiziert. Nach Selektion der transfizierten Zellen wurde die Proteinexpression in den Zellen durch gelelektrophoretische Auftrennung der Zelllysate und anschließendem Immunoblot mit dem Antikörper H68.4 nachgewiesen (Abbildung 3-12A). Das TfR-*renilla*-Luciferasekonstrukt (TfRRL) lässt sich mit einem Molekulargewicht von 120 kD detektieren, das mit dem theoretisch errechneten Wert (126 kD) gut übereinstimmt.

Weiterhin wurde überprüft, ob das Konstrukt in der Zelle membranständig exprimiert wird. Die Immunoblotanalyse der über differentielle Zentrifugation gewonnenen Membranfraktionen zeigt, dass TfRRL ebenso wie TfR membranständig exprimiert wird (Abbildung 3-12B).

Eine Untersuchung der Glycosylierung und Sialylierung erbrachte auch hier, ähnlich wie bei den firefly-Luciferasekonstrukten, dass das Fusionsprotein aus TfR und *renilla*-Luciferase zwar teilweise *N*-glycosyliert jedoch nicht sialyliert wird (Abbildung 3-12C) und somit wahrscheinlich in einem anderen Kompartiment exprimiert wird als der TfR. Zur Überprüfung der Enzymaktivität wurden Zelllysate im *renilla*-Luciferaseassay vermessen (Abbildung 3-12D).

Die an TfR gebundene *renilla*-Luciferase wird aktiv exprimiert, jedoch konnte im Zellüberstand keine *renilla*-Luciferaseaktivität gemessen noch durch Immunpräzipitation ein lösliches TfRRL-Fragment detektiert werden.



**Abbildung 3-12: Charakterisierung der TfR-*renilla*-Luciferase (TfRRL).** HL60- und TRVb-Zellen wurden mit TfRRL und TfR transfiziert. (A) Es wurden 25 µg Zellprotein im 7,5 % SDS-Gel aufgetrennt und der TfR mit H68.4-Antikörper im Immunoblot angefärbt. (B) Durch differentielle Zentrifugation wurden mikrosomale Membranfraktionen isoliert und aus ihnen TfR und TfRRL wie in A beschrieben detektiert. (C) Zelllysate (25 µg Gesamtprotein) aus transfizierten TRVb-Zellen wurden für 10 h ohne oder mit 1,25 mU/µl Neuraminidase oder 5 mU/µl N-Glycosidase F inkubiert und aus ihnen TfR und TfRRL wie in A beschrieben detektiert. (D) Die *renilla*-Luciferaseaktivität von TfRRL wurde mittels Luciferaseassay in Lysaten von transfizierten HL60-Zellen ( $3 \times 10^4$ ) quantifiziert. Die Daten stellen Mittelwerte mit S.A.M. dar und resultieren aus vier unabhängigen Experimenten.

Unter den gewählten Bedingungen war es möglich, TfR mit Reporterenzymen zu exprimieren und ihre Enzymaktivität nachzuweisen. Diese Konstrukte wurden jedoch sehr wahrscheinlich auf Grund fehlender Sialylierung und unvollständiger N-Glycosylierung nicht an der Zelloberfläche exprimiert und als Folge davon auch nicht in den Zellüberstand freigesetzt. Somit waren sowohl die *firefly*-Konstrukte als auch das *renilla*-Konstrukt als Sheddingreporter ungeeignet.

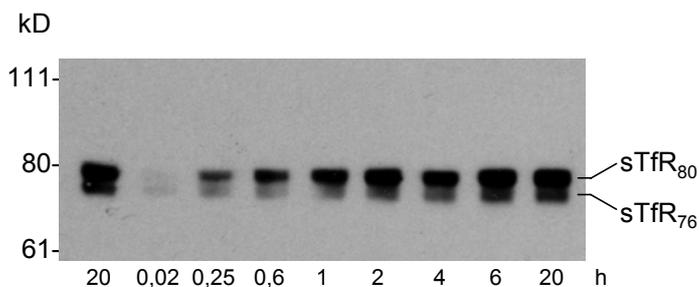
### 3.3 Die Transferrinrezeptor-Sheddingprotease in TRVb-Zellen

Zur Untersuchung der sTfR-Freisetzung mit Hilfe von Mutationsanalysen wurden die in Kapitel 3.2.1 beschriebenen TRVb-Zellen verwendet. Sie sind hervorragend für solche Untersuchungen geeignet, da nachgewiesen werden konnte, dass sie TfR-Sheddingaktivität besitzen und ihr Hauptspaltprodukt durch Proteolyse am R100 freigesetzt wird [173]. Die beteiligte Protease wurde jedoch bisher nicht charakterisiert. Für eine genaue Untersuchung des Sheddings in TRVb-Zellen wurden zunächst Inhibitionsanalysen durchgeführt. In früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass der sTfR-Freisetzungsprozess in HL60-Zellen durch eine membranständige Protease vermittelt, die sensitiv gegenüber den Metallo- und Matrixmetalloproteaseinhibitoren 1,10-Phenanthrolin, MMPi2 und TIMP1 ist, in hohen Konzentrationen jedoch auch gegenüber Serinproteaseinhibitoren wie PefablocSC (Vergleiche Tabelle 1-2) [102]. Für die Untersuchung von Inhibitoren ist es

sinnvoll ein möglichst zellnahes System zu nutzen, in dem jedoch cytotoxische Effekte der Inhibitoren nicht zum Tragen kommen. Ein Membranassay ist somit potentiell hervorragend geeignet für solche Experimente. Sowohl TfR als auch Protease sind in der Membran lokalisiert und unter den Assaybedingungen aktiv.

### 3.3.1 Serumtransferrinrezeptor-Freisetzung aus mikrosomalen Membranen von TRVb-Zellen

Die Freisetzung des sTfR kann nicht nur im Zellsystem, sondern in gleicher Weise auch in mikrosomalen Membranen beobachtet werden. Dies bietet neben den oben erwähnten Punkten den Vorteil, dass die Syntheserate von TfR und Protease unbeeinflusst bleibt und intrazelluläre Transportprozesse ausgeschlossen werden können. Zur Charakterisierung der sTfR-Freisetzung wurden Membranen aus TfR transfizierten TRVb-Zellen mittels differentieller Zentrifugation isoliert (2.11.12), in PBS resuspendiert und für Zeiträume von 5 min bis über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Membranen mittels Zentrifugation pelletiert und der Überstand hinsichtlich sTfR analysiert. Die zeitabhängige sTfR-Freisetzung ist im Immunoblot mit dem Antikörper OKT9 gezeigt (Abbildung 3-13). Die Ergebnisse zeigen, dass aus mikrosomalen Membranen von TfR transfizierten TRVb-Zellen sTfR freigesetzt wird. Die TfR-Sheddingprotease in TRVb-Zellen ist demnach in die Membran integriert oder mit ihr assoziiert. Die sTfR-Freisetzungstätigkeit nimmt innerhalb von 6 h zu und stagniert anschließend. Neben der Hauptbande in Höhe von 80 kD (sTfR<sub>80</sub>) tritt zusätzlich eine um 4 kD kleinere Nebenbande auf, die auf ein alternatives Sheddingprodukt des TfR (sTfR<sub>76</sub>) hindeutet.

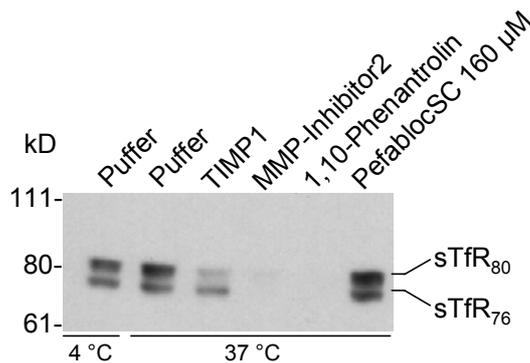


**Abbildung 3-13: Kinetik der sTfR-Freisetzung.** Überstände aus inkubierten, mikrosomalen Membranen TfR transfizierter TRVb-Zellen wurden im nicht reduzierenden 7,5 % SDS-Gel aufgetrennt und mit OKT9 im Immunoblot detektiert. Zur Kontrolle der Bloteffizienz wurden in der ersten und neunten Bahn gleiche Proben aufgetragen.

### 3.3.2 Inhibition der Serumtransferrinrezeptor-Freisetzung

Inkubiert man die mikrosomalen Membranen der TfR transfizierten TRVb-Zellen mit verschiedenen Proteaseinhibitoren und analysiert den freigesetzten sTfR im Überstand (Abbildung 3-14), so zeigt sich, dass die sTfR-Freisetzung bei niedrigen Temperaturen (4 °C) erwartungsgemäß schwächer ist als bei 37 °C.

Neben der Entstehung des Hauptspaltprodukts sTfR<sub>80</sub> konnte auch hier ein kleineres sTfR-Fragment sTfR<sub>76</sub> nachgewiesen werden. Die TfR-Protease aus TRVb-Zellen wird sowohl durch den allgemeinen Metalloproteaseinhibitor 1,10-Phenanthrolin inhibiert als auch durch die spezifischeren Metalloprotease-Inhibitoren wie TIMP1 und MMP-Inhibitor2. Der Serinproteaseinhibitor PefablocSC zeigt dagegen bei den verwendeten Konzentrationen keine Wirkung. Die Protease in TRVb-Zellen ist somit der Familie der Metalloproteasen zuzuordnen. Die Inhibitoren wirken unter den angewendeten Bedingungen gleich hinsichtlich der Entstehung von sTfR<sub>80</sub> und sTfR<sub>76</sub>.



**Abbildung 3-14: Inhibition der sTfR-Freisetzung aus TRVb-Zellmembranfraktionen.** Gereinigte Membranen aus TfR transfizierten TRVb-Zellen wurden für 12 h bei 4 °C (Spur 1) oder 37 °C (Spuren 2–7) in Gegenwart von Inhibitoren inkubiert. Dabei wurden folgende Konzentrationen verwendet: TIMP1 0,5 µM, MMP-Inhibitor2 0,5 mM, 1,10-Phenanthrolin 3 mM und PefablocSC 160 µM. Der sTfR im Überstand der Membranen wurde in einem nicht reduzierenden 7,5 % SDS-Gel aufgetrennt und mit OKT9 im Immunoblot nachgewiesen.

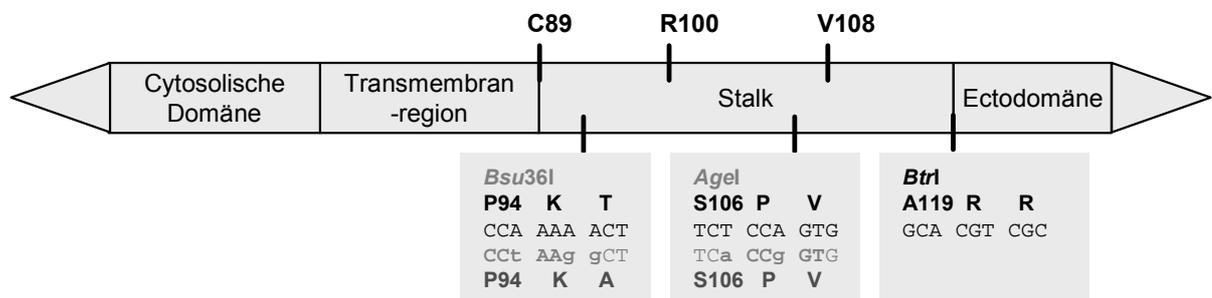
Die sTfR-Freisetzungaktivität in TRVb-Zellen entspricht in ihren Eigenschaften vollständig der Freisetzungaktivität in HL60-Zellen. Es können sowohl die Hauptform des sTfR als auch eine Nebenform nachgewiesen werden. Die Kinetik der Freisetzungaktivität aus Membranen entspricht der von HL60-Zellen. Die Protease in TRVb-Zellen reagiert sensitiv gegenüber den gleichen Inhibitoren wie die Protease aus HL60-Zellen. Die TRVb-Zellen sind somit hervorragend geeignet, um das Shedding des TfR zu untersuchen. Da sie keinen endogenen TfR besitzen, stellen sie ein ideales System dar, um die Auswirkungen von Mutationen im TfR auf seine Freisetzung zu analysieren.

### 3.4 Mutationsanalyse des Transferrinrezeptor-*stalk*

Obwohl bis jetzt zahlreiche Sheddingproteasen, Substrate und Spaltstellen identifiziert wurden, bleiben der Mechanismus der Substraterkennung und die Regulation des Sheddings unbekannt. Systematische Deletionsanalysen der Spaltstellen und ihr kompletter Austausch gegen Spaltstellen anderer Proteine erbrachte kein generelles Prinzip für Konsensussequenzen oder Targetmotive. Vermutlich ist eher die dreidimensionale Struktur als die Aminosäuresequenz entscheidend für die Substraterkennung sowie der Abstand zur Membran. Für den TfR ist bisher nur bekannt, dass die *O*-Glycosylierung, insbesondere die negative Ladung der Sialinsäure, das Shedding negativ beeinflusst.

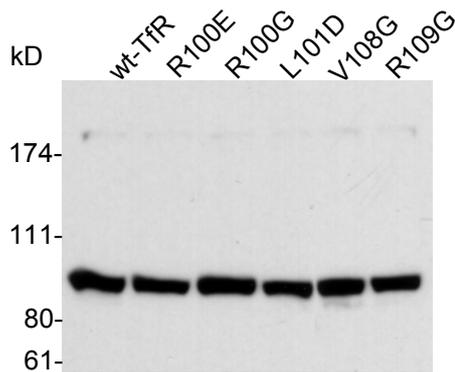
### 3.4.1 Punktmutanten

In HL60-Zellen wird der TfR an der Hauptsplattstelle C-terminal von R100 proteolytisch gespalten. Zusätzlich werden aber auch Spaltprodukte mit einer molekularen Masse gebildet, die der eines alternativen Spaltprodukts (V108) in U937-Zellen entspricht, das durch neutrophile Elastase generiert wird [101,102]. Mit TfR transfizierte TRVb-Zellen setzen vorwiegend das Hauptsplattprodukt (sTfR<sub>80</sub>) frei und weniger stark die alternative Form (sTfR<sub>76</sub>), ähnlich wie HL60-Zellen. Da die *O*-Glycosylierung am T104 die Mobilität im Gel stark beeinflusst, können das Hauptsplattprodukt, welches die Glycosylierungsstelle enthält, und die alternative Form ohne *O*-Glycosylierung gut im Gel unterschieden werden. Zur besseren Charakterisierung des Sheddingprozesses und vor allem der Freisetzung des sTfR<sub>76</sub> wurden TRVb-Zellen mit wt-TfR und TfR-Punktmutanten transfiziert werden. Um die Mutationen einfach und effizient in den *stalk* integrieren zu können, wurden Restriktionsschnittstellen für *Bsu36I* und *AgeI* in die DNA-Sequenz eingeführt (Abbildung 3-15). Damit war es möglich, die korrespondierende Aminosäuresequenz K95 bis P107 durch Ligation von synthetischen Oligonukleotiddimeren zu verändern. Die Proteinsequenzänderung, die durch das Einfügen der *Bsu36I*-Schnittstelle entsteht, wurde bei der Ligation wieder rückgängig gemacht. Die AS P107 bis A119 konnten mit *AgeI* und der natürlichen *BtrI*-Schnittstelle ausgetauscht werden.



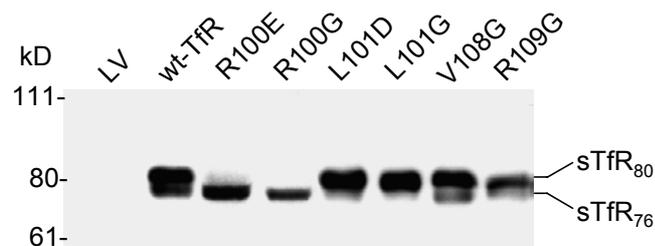
**Abbildung 3-15: Insertion von neuen Restriktionsschnittstellen in die *stalk*-Region der TfR-cDNA.** Zur Insertion der neuen Restriktionsschnittstellen *Bsu36I* und *AgeI* wurde die Nukleotidsequenz des wt-TfR (schwarz) durch Punktmutation so verändert (grau), dass sie den Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme entspricht. Die daraus resultierende AS-Sequenz ist in dunkelgrau dargestellt.

Als Punktmutationen wurden R100E, R100G, L101D und L101G für die Hauptsplattstelle bei R100 und die Mutationen V108G und R109G für die potentielle Nebensplattstelle bei V108 gewählt. Nach Transfektion des Vektors pcDNA6 mit wt-TfR-cDNA und mit mutierter TfR-cDNA in TRVb-Zellen und anschließender Selektion mit Blasticidin wurden die Zellen auf ihre Expression hin überprüft (Abbildung 3-16). Der Immunoblot mit OKT9 zeigt, dass alle Mutanten in der erwarteten Größe und mit nahezu gleicher Intensität exprimiert werden.



**Abbildung 3-16: Expression der Tfr-Mutanten.** Zellysate der transfizierten TRVb-Zellen (25 µg Gesamtprotein) wurden im reduzierenden 7,5 % SDS-Gel aufgetrennt und der wt-TfR und die Mutanten im Immunoblot mit OKT9 detektiert.

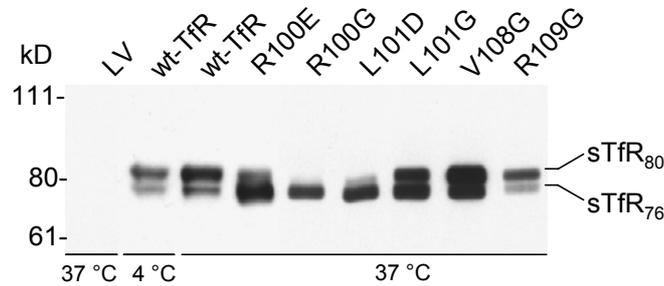
Zum Nachweis des sTfR wurden die transfizierten TRVb-Zellen für 4 Tage kultiviert, der sTfR durch Transferrinaffinitätspräzipitation aus dem Zellüberstand isoliert und aufkonzentriert und anschließend im Immunoblot mit OKT9 angefärbt (Abbildung 3-17). Der wt-TfR wird, wie schon zuvor beschrieben, in zwei Formen freigesetzt, eine prominente Hauptform (sTfR<sub>80</sub>) und eine Nebenform mit einer molekularen Masse von 76 kD (sTfR<sub>76</sub>). Im Vergleich führen die Mutationen bei R100 hauptsächlich zur Bildung der alternativen Form. Die Mutationen bei L101 dagegen führen vorwiegend zur Freisetzung der Hauptform des sTfR, außerdem unterscheidet sich auch die Menge an freigesetztem sTfR erheblich. Besonders die L101G-Mutante, aber auch L101D setzen besonders viel sTfR frei. Von diesen Mutanten wurde deshalb nur ein Viertel des Probenvolumens aufgetragen, da sonst das Gel überladen wäre. Die V108G- und die R109G-Mutation an der alternativen, bei U937-Zellen durch neutrophile Elastase gebildeten TfR-Spaltstelle zeigen weder ein verändertes Verhältnis zwischen Haupt- und Nebenprodukt noch einen Unterschied in der Menge an freigesetztem sTfR.



**Abbildung 3-17: TfR-Shedding aus TRVb-Zellen, die mit wt-TfR und stalk-Mutanten transfiziert wurden.** Die transfizierten TRVb-Zellen ( $5 \times 10^4$ ) wurden für 4 Tage kultiviert und der angereicherte sTfR mittels ferritin-Affinitätspräzipitation aus dem Zellüberstand isoliert, im nicht reduzierenden 7,5 % SDS-Gel aufgetrennt und im Immunoblot mit OKT9 detektiert. In den Spuren 5 und 6 wurde das Probenvolumen auf ein Viertel reduziert.

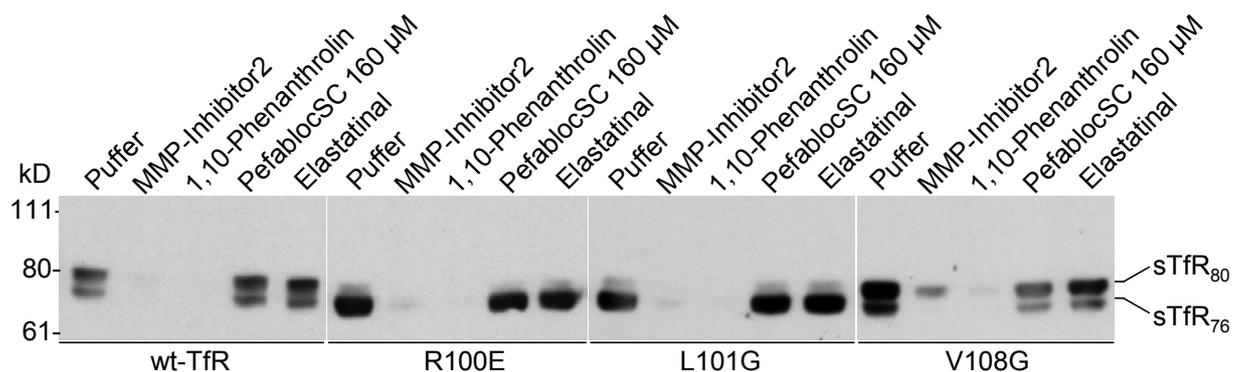
Zur weiteren Überprüfung der an den unterschiedlichen Spaltstellen wirkenden Sheddingproteasen wurden für die Freisetzung der sTfR-Mutanten die gleichen Inhibitoren überprüft werden, wie für das Shedding des wt-TfR. Zunächst wurde deshalb die sTfR-Freisetzungsaktivität der Mutanten im Membranassay analysiert (Abbildung 3-18). Die Sheddingprodukte von wt-TfR und von R100E, R100G, V108G und R109G sind bezüglich ihrer apparenten molekularen Masse identisch zu denen in lebenden Zellen. Im Gegensatz hierzu unterscheiden sich die Ergebnisse für die L101-Mutationen. L101D setzt im

Membranassay ausschließlich und L101G vorwiegend den sTfR<sub>76</sub> frei. Die Effektivität der Freisetzung ist deutlich geringer als im Zell basierten Assay und liegt hier im Bereich des wt-TfR.



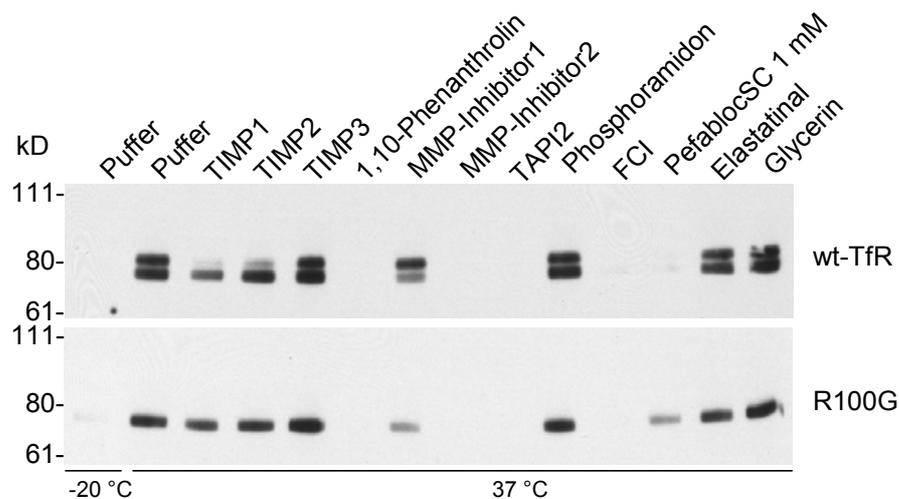
**Abbildung 3-18: Freisetzung des wt-TfR und der Mutanten aus TRVb-Zellmembranen.** Aus transfizierten TRVb-Zellen wurden durch differentielle Zentrifugation Membranen isoliert und bei 4 °C und 37 °C für 12 h inkubiert. Der in den Überstand freigesetzte sTfR wurde im nicht reduzierenden 7,5 % SDS-Gel aufgetrennt und im Immunoblot mit OKT9 detektiert.

Zur Charakterisierung der beteiligten Proteasen wurden im Membranassay des wt-TfR, der R100E-, der L101G- und der V108G-Mutante verschiedene Proteaseinhibitoren eingesetzt und auf ihre Wirkung überprüft (Abbildung 3-19). Dabei zeigte sich, dass ebenso wie beim wt-TfR der generelle Metalloproteaseinhibitor 1,10-Phenanthrolin und der spezifische Inhibitor für Matrixmetalloproteasen MMP-Inhibitor2 die Freisetzung sowohl von sTfR<sub>80</sub> als auch von sTfR<sub>76</sub> aller Mutanten nahezu vollständig inhibiert. Der Elastaseinhibitor Elastatinal weist dagegen weder eine Wirkung auf die Hauptspaltstelle noch auf die alternative Spaltstelle auf, obwohl letztere bei U937-Zellen durch Elastase erzeugt wird [101]. Besonders deutlich wird dies bei den Mutationen R100E und L101G, die vorwiegend das alternative Produkt (sTfR<sub>76</sub>) generieren. Der generelle Serinproteaseinhibitor PefablocSC erzielte in den verwendeten Konzentrationen (160 µM) keine Wirkung.



**Abbildung 3-19: Inhibition der sTfR-Freisetzung aus wt-TfR-TRVb-Membranen und den Membranen der TfR-Mutanten.** Die durch differentielle Zentrifugation isolierten Zellmembranen wurden bei 4 °C und 37 °C in Anwesenheit verschiedener Inhibitoren inkubiert und anschließend der freigesetzte sTfR im nicht reduzierenden 7,5 % SDS-Gel aufgetrennt und im Immunoblot mit OKT9 detektiert. Für die Inhibitoren wurden folgende Konzentrationen eingesetzt: MMP-Inhibitor2 0,5 mM, 1,10-Phenanthrolin 3 mM, PefablocSC 160 µM, Elastatinal 200 µM.

Die Inhibitionsuntersuchungen zeigen, dass die Freisetzung des sTfR-Hauptprodukts und der alternativen sTfR-Form das gleiche Inhibitionsprofil für die Mutanten aufweisen wie für den wt-TfR. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass die Spaltprodukte sTfR<sub>80</sub> und sTfR<sub>76</sub> des wt-TfR mit denen der Mutanten übereinstimmen. In allen Fällen kann die Freisetzungstätigkeit einer oder mehreren membranständigen Metalloproteasen zugewiesen werden. Zur Überprüfung spezifischerer Inhibitoren für solche membranständigen Metalloproteasen, die vor allem in den Familien der Matrixmetalloproteasen und der ADAMs zu finden sind, wurde deshalb nur noch TfR mit der R100-Mutation für die alternative Freisetzung mit dem wt-TfR verglichen (Abbildung 3-20). Dabei zeigte sich, dass MMP-Inhibitor2 und TAPI2 beide Sheddingprozesse inhibieren. Der Furininhibitor FCI und hohe Konzentrationen des allgemeinen Serinproteaseinhibitors PefablocSC üben ebenfalls eine hemmende Wirkung aus. Interessant ist, dass die Bildung des sTfR<sub>76</sub> teilweise durch andere Inhibitoren beeinflusst wird als die von sTfR<sub>80</sub>. Beispielsweise weist MMP-Inhibitor1 keine Wirkung auf die Bildung des sTfR<sub>80</sub> auf, während er die Spaltung des sTfR<sub>76</sub> deutlich inhibiert. Im Gegensatz dazu zeigt TIMP1 genau die umgekehrte Wirkung. Er inhibiert die Spaltung des Hauptprodukts sTfR<sub>80</sub>, beeinflusst jedoch nicht den sTfR<sub>76</sub>. Zusammenfassend kann gefolgert werden, dass die Spaltung des sTfR durch Metalloproteasen erfolgt und dass außerdem die Spaltung an den verschiedenen Schnittstellen durch unterschiedliche Proteasen dieser Familie vermittelt wird.

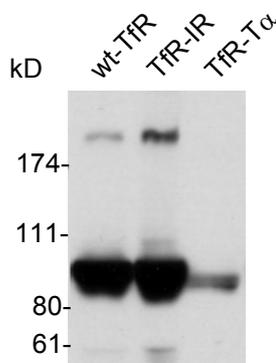


**Abbildung 3-20: Wirkung von spezifischen Inhibitoren auf die Hauptform und die alternative sTfR-Freisetzung.** Durch differentielle Zentrifugation isolierte Membranfraktionen aus TRVb-Zellen, die mit dem wt-TfR (Blot oben) und mit TfR R100G (Blot unten) transfiziert wurden, sind für 12 h bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  und  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  unter Zugabe von verschiedenen Inhibitoren inkubiert worden. Dabei wurden folgende Inhibitorkonzentrationen verwendet: TIMPs  $0,5\text{ }\mu\text{M}$ , 1,10-Phenanthrolin  $3\text{ mM}$ , MMP-Inhibitoren  $0,5\text{ mM}$ , TAPI2  $0,5\text{ mM}$ , Phosphoramidon  $0,82\text{ mM}$ , FCI  $1\text{ mM}$ , PefablocSC  $1\text{ mM}$  und Elastatinal  $0,2\text{ mM}$ . Glycerin in Spur 14 diente als Kontrolle, da TIMP3 in 50 % Glycerin vorliegt. Der sTfR aus dem Überstand der Membranen wurde anschließend im nicht reduzierenden 7,5 % SDS-Gel aufgetrennt und mit OKT9 im Immunoblot nachgewiesen.

### 3.4.2 Der *stalk*-Austausch

Die TNF $\alpha$ -Freisetzung gehört zu den am meisten untersuchten Sheddingprozessen. Für diesen Prozess konnte bereits 1997 eine Sheddingprotease identifiziert werden, das TNF $\alpha$ -konvertierende Enzym (TACE)[28,139]. Die 26 kD große Vorläuferform, das proTNF $\alpha$ , gehört wie der TfR zu den TypII-Membranproteinen. Die proteolytische Spaltung erfolgt zwischen A76 und V77 und resultiert in der Freisetzung des TNF $\alpha$ -Cytokins, das an einer Reihe inflammatorischer Prozesse beteiligt ist. Ein anderes gut untersuchtes Protein, welches einem Sheddingprozess unterliegt, ist der Interleukin6-Rezeptor. Die Freisetzung dieses TypI-Membranproteins wird ebenfalls durch TACE-Proteaseinhibitor (TAPI) inhibiert [13]. Für beide Proteine ist der *stalk* von besonderer Wichtigkeit für den Proteolyseprozess. Er entspricht in seiner Länge dem des TfR. Um Erkenntnisse über die TfR-Protease zu erlangen, wurde der TfR-*stalk* gegen die *stalk*-Bereiche der anderen beiden Membranproteine ersetzt.

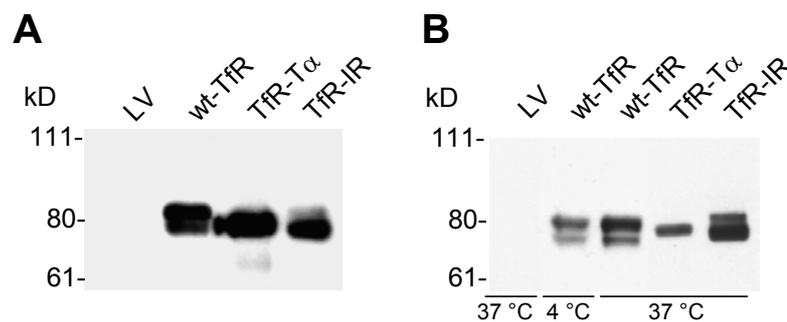
Zum Austausch des TfR-*stalk* gegen den *stalk* von proTNF $\alpha$  (T $\alpha$ ) und den des Interleukin6-Rezeptors (IR) wurde die cDNA des TfR wie bei der Einführung von Punktmutationen mit *Bsu36I* und *AgeI* enzymatisch verdaut und der entfernte Bereich durch hybridisierte Oligonukleotide ersetzt, die der Sequenz von T $\alpha$  und IR entsprechen (siehe Anhang). Die veränderte TfR-cDNA wurde in TRVb-Zellen transfiziert, die Zellen selektioniert und auf ihre TfR-Expression hin überprüft. Der Immunoblot mit OKT9 zeigt, dass beide Mutanten TfR mit einer apparenten molekularen Masse von ca. 90 kD exprimieren (Abbildung 3-21). Die detektierte Proteinmenge von TfR-T $\alpha$  ist gegenüber dem wt-TfR deutlich reduziert.



**Abbildung 3-21: Die Expression des wt-TfR und der *stalk*-Austauschmutanten.** Zelllysate (25  $\mu$ g Gesamtprotein) aus transfizierten TRVb-Zellen wurden mittels nicht reduzierender 7,5 % SDS-PAGE aufgetrennt und TfR im Immunoblot mit OKT9 detektiert.

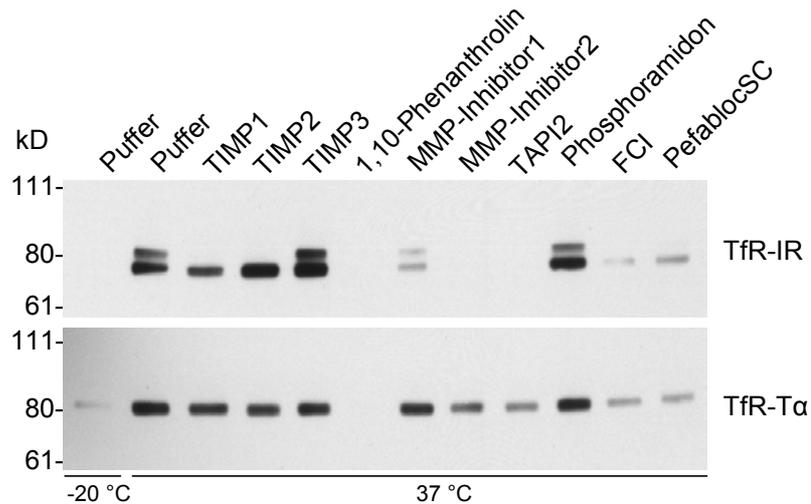
Der Nachweis des sTfR dieser Zellen erfolgte einerseits durch Transferrinaffinitätspräzipitation aus dem Zellüberstand und andererseits im Membranassay wie bereits oben beschrieben (Abbildung 3-22). Im Immunoblot mit OKT9 erkennt man, dass beide *stalk*-Mutanten sTfR in den Überstand freisetzen. Die T $\alpha$ -Mutante shedded jedoch erheblich mehr TfR (in der Abbildung ist das Probenvolumen für sTfR-T $\alpha$  um ein Zehntel reduziert). Dies erklärt auch die reduzierte TfR-T $\alpha$ -Proteinmenge in den Zelllysaten. Das abgespaltene Produkt sTfR-T $\alpha$  liegt in seiner molekularen Masse zwischen dem Hauptspaltprodukt des wt-TfR und dem alternativem Fragment. Da aber unklar ist, ob TfR-T $\alpha$  O-glycosyliert vorliegt, kann an Hand des Molekulargewichts kein Schluss auf die Spaltstelle gezogen werden. Im Gegensatz dazu werden von der TfR-IR-Mutante zwei Spaltprodukte freigesetzt, die das

gleiche Molekulargewicht aufweisen wie die Spaltprodukte des wt-TfR, jedoch ist das Verhältnis zwischen den beiden mehr zum kleineren Produkt hin verschoben. Die Ergebnisse im Membranassay stimmen mit dem Zellsystem überein. Auch im Membranassay wird die TfR-T $\alpha$ -Mutante verstärkt gesheddet und liegt mit ihrem apparenten Molekulargewicht zwischen dem Hauptspaltprodukt und der alternativen Form des wt-Typs. Der TfR-IR setzt ähnlich dem wt-Typ zwei Spaltprodukte frei, wobei das kleinere bei dieser Mutation überwiegt. Das Verhältnis zwischen den beiden Spaltprodukten ist im Vergleich zum Zellsystem etwas zum größeren Spaltprodukt hin verschoben. Der Membranassay spiegelt nahezu vollständig die Situation im Zellsystem wider und kann deshalb auch bei diesen Mutationen für Inhibitionsstudien herangezogen werden.



**Abbildung 3-22: Die sTfR-Freisetzung der *stalk*-Austauschmutanten.** (A) sTfR aus dem Zellüberstand. Die transfizierten TRVb-Zellen ( $5 \times 10^4$ ) wurden für 4 Tage kultiviert und der angereicherte sTfR mittels ferri-Tf-Affinitätspräzipitation aus dem Zellüberstand isoliert, im reduzierenden 7,5 % SDS-Gel aufgetrennt und mittels OKT9-Immunoblot detektiert. (B) sTfR aus dem Membranüberstand. Aus transfizierten TRVb-Zellen wurden durch differentielle Zentrifugation Membranen isoliert und bei 4 °C und 37 °C für 12 h inkubiert. Der in den Überstand freigesetzte sTfR wurde im reduzierenden 7,5 % SDS-Gel aufgetrennt und mittels OKT9-Immunoblot detektiert. Für die TfR-T $\alpha$ -Mutante wurde in A und B das Probenvolumen auf ein Zehntel reduziert.

Zum Vergleich der beteiligten Proteasen mit denen des wt-TfR-Sheddings wurden auch hier verschiedene Inhibitoren auf ihre Wirkung untersucht (Abbildung 3-23). Beachtet man, dass der sTfR mit der kleineren molekularen Masse beim TfR-IR dominant ist, so ist festzustellen, dass das Inhibitionsmuster für das TfR-IR-Shedding sehr ähnlich zum wt-TfR-Shedding ist. 1,10-Phenanthrolin, MMP Inhibitor2, TAPI2 hemmen nahezu vollständig den TfR-IR-Sheddingprozess. MMP Inhibitor1 inhibiert dagegen vorzugsweise die Entstehung des sTfR mit geringerem Molekulargewicht, sodass der sTfR mit höherem Molekulargewicht, welcher in der Kontrolle weniger freigesetzt wird, durch Zugabe von MMP Inhibitor 1 mit gleicher Intensität nachzuweisen ist wie der sTfR mit geringerem Molekulargewicht. Umgekehrt blockieren TIMP1 und 2 bevorzugt die Spaltung, die zur Entstehung des größeren sTfR führt. Im Gegensatz zum Shedding des TfR-IR zeigen TIMP1, TIMP2 sowie MMP-Inhibitor1 und 2 keinen Einfluss auf die Freisetzung der TfR-T $\alpha$ -Ectodomäne. Somit muss die am TfR-T $\alpha$ -Shedding beteiligte Protease sich von denen am wt-TfR-Shedding beteiligten Proteasen unterscheiden.



**Abbildung 3-23: Inhibition der sTfR-Freisetzung der *stalk*-Austauschmutanten.** Durch differentielle Zentrifugation isolierte Membranfraktionen aus TRVb-Zellen, die mit dem TfR-IR (Blot oben) und mit TfR-T $\alpha$  (Blot unten) transfiziert wurden, sind für 12 h bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  und  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  unter Zugabe von verschiedenen Inhibitoren inkubiert worden. Dabei wurden folgende Inhibitorkonzentrationen verwendet: TIMPs  $0,5\text{ }\mu\text{M}$ , 1,10-Phenanthrolin  $3\text{ mM}$ , MMP-Inhibitoren  $0,5\text{ mM}$ , TAPI2  $0,5\text{ mM}$ , Phosphoramidon  $0,82\text{ mM}$ , FCI  $1\text{ mM}$ , PefablocSC  $1\text{ mM}$  und Elastinal  $0,2\text{ mM}$ . Der sTfR aus dem Überstand der Membranen wurde anschließend im nicht reduzierenden  $7,5\%$  SDS-Gel aufgetrennt und mit OKT9 im Immunoblot nachgewiesen.

Der *stalk* des TfR ist von elementarer Bedeutung für das TfR-Shedding. Mutationen um die Hauptsplattstelle des TfR führen zur Inhibition der beteiligten Protease. Die Unterdrückung der Proteolyse an der Hauptsplattstelle kann durch die Protease kompensiert werden, welche die sTfR-Freisetzung an der alternativen Splattstelle vermittelt. Der gesamte Austausch des *stalk* gegen den von proTNF $\alpha$  und den von Interleukin6-Rezeptor führt zu einer Änderung der Sheddingaktivität. Der IR führt zur verstärkten Spaltung an der alternativen Splattstelle. Durch Einfügen von T $\alpha$  wird eine dritte Protease aktiv, deren Inhibitionsmuster sich von den Proteasen der Haupt- und der Nebensplattstelle unterscheidet.

Allen beteiligten Proteasen ist gemeinsam, dass sie sensitiv gegenüber dem allgemeinen Metalloproteaseinhibitor 1,10-Phenanthrolin reagieren. Da sie im Membranassay Aktivität aufweisen, können sie alle in die Familie der Membran gebundenen Metalloproteasen eingeordnet werden. Mit Hilfe der *stalk*-Mutationen konnten neue Erkenntnisse zur Identität der TfR-Proteasen erlangt werden. Die Mutationsuntersuchungen zeigen, dass der Sheddingprozess modulierbar ist. Unklar bleibt jedoch, ob die Freisetzung des sTfR auch durch Signalmoleküle reguliert werden kann, insbesondere solche, die den systemischen Eisenstatus widerspiegeln.

## 3.5 Regulation des Transferrinrezeptor-Sheddings

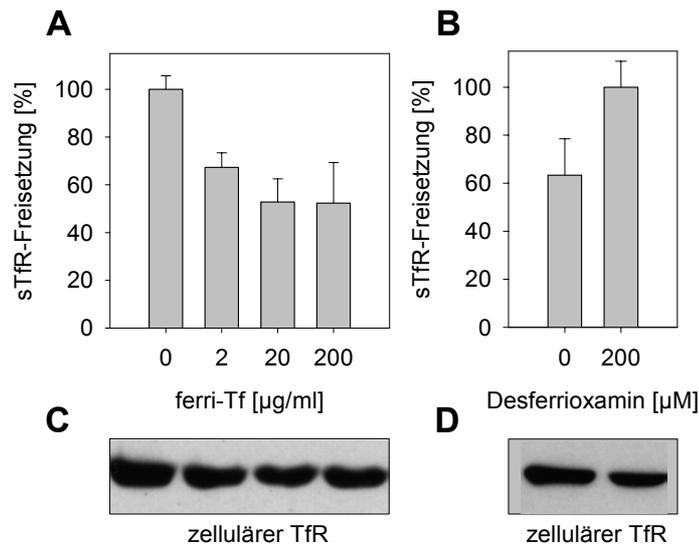
Die sTfR-Konzentration im humanen Serum reflektiert den Eisenbedarf aller proliferierenden Zellen des Körpers. Über Regulationen des TfR-Sheddings, die über die direkte Substratabhängigkeit hinausgehen, ist bisher wenig bekannt. Es ist jedoch nahe liegend, dass das TfR-Shedding durch Proteine reguliert werden könnte, die den aktuellen Eisenstatus reflektieren. Die Konzentration von Eisen beladenem Transferrin (ferri-Tf) ist hoch, wenn genügend Eisen zur Verfügung steht. Weil in dieser Situation der sTfR-Level niedrig ist, wird in dieser Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass ferri-Tf eine inhibitorische Wirkung auf das TfR-Shedding hat.

### 3.5.1 Einfluss von ferri-Transferrin auf das Transferrinrezeptor-Shedding

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde die sTfR-Freisetzung in den Zellüberstand von HL60-Zellen unter der Wirkung von ferri-Tf gemessen. Dazu wurde ein eigens dafür entwickelter ELISA [51] (2.11.7) verwendet, mit dem es möglich ist, humanen sTfR zu detektieren und zu quantifizieren. HL60-Zellen ( $1 \times 10^6$ ) wurden mit Dulbecco-PBS gewaschen und für 10 h mit 0, 2, 20 und 200  $\mu\text{g/ml}$  ferri-Tf in serumfreiem Kulturmedium kultiviert, anschließend abzentrifugiert und der Zellüberstand im ELISA vermessen. Die Zellen wurden lysiert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und im Immunoblot mit OKT9 analysiert.

In Abbildung 3-24 ist gezeigt, dass mit steigenden ferri-Tf-Konzentrationen das TfR-Shedding zunehmend sinkt und bei 200  $\mu\text{g/ml}$  auf 52 % reduziert ist. Im Gegensatz dazu wird die TfR-Expression in den Zellen innerhalb von 10 Stunden nur geringfügig beeinflusst (Abbildung 3-24C und D), wie auch von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden konnte [191]. Somit ist der beobachtete Rückgang des TfR-Sheddings nicht auf eine sinkende Rezeptorzahl in den Zellen zurückzuführen. Ferri-Tf hat demnach die Fähigkeit direkt oder indirekt das TfR-Shedding zu inhibieren.

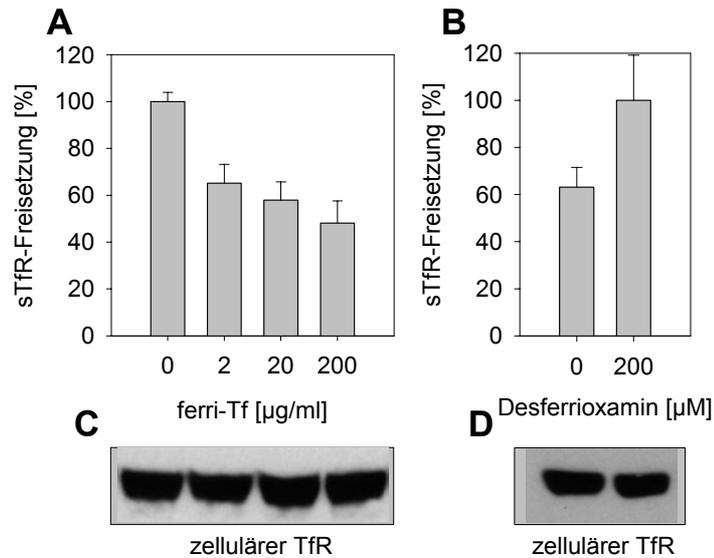
Einen umgekehrten Effekt weist der Eisen-III-Chelator Desferrioxamin auf. Die Gabe von 200  $\mu\text{M}$  Desferrioxamin in serumhaltiges Kulturmedium verringert die Verfügbarkeit des ferri-Tf und lässt die sTfR-Freisetzung ansteigen. Eisenfreies apo-Tf aus dem Serum des Kulturmediums vermag es folglich nicht, das TfR-Shedding zu inhibieren.



**Abbildung 3-24: Einfluss von Transferrin auf die sTfR-Freisetzung in HL60-Zellen.** Die Zellen ( $1 \times 10^6$ ) wurden in serumfreiem Medium mit 0 bis 200 µg/ml ferri-Tf (A) oder in serumhaltigem Medium mit oder ohne 200 µM Desferrioxamin (B) für 10 h inkubiert. Der sTfR aus dem Zellüberstand wurde in einem TfR-spezifischen ELISA gemessen. Die Bestimmung der TfR-Expression (zellulärer TfR) erfolgte durch SDS-PAGE und anschließendem Immunoblot mit OKT9-Antikörper. (A) zeigt die sTfR-Freisetzung in Abhängigkeit von ferri-Tf und (B) die Wirkung von Desferrioxamin. Die Daten stellen Mittelwerte aus fünf unabhängigen Experimenten mit S.A.M. dar, die jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. Für die zelluläre TfR-Expression in Abhängigkeit von ferri-Tf (C) und Desferrioxamin (D) ist ein repräsentatives Ergebnis gezeigt.

Um die beobachteten geringfügigen Rückkopplungseffekte auf die intrazelluläre TfR-Translation durch die Variation der extrazellulären Eisenverfügbarkeit vollständig auszuschließen, wurde TfR in TRVb-Zellen transfiziert, dessen mRNA keine IREs am 3'-Ende des Leserahmens trägt. Der Einfluss von ferri-Tf auf das TfR-Shedding wurde in diesen Zellen analog zu HL60-Zellen untersucht (Abbildung 3-25). Es zeigte sich, dass auch hier mit steigendem ferri-Tf der sTfR im Zellüberstand abnahm und eine durch Desferrioxamin erzeugte, sinkende Transferrinsättigung diesem Effekt entgegen wirken konnte. Die zelluläre TfR-Expression blieb dabei, wie erwartet, unverändert.

Mit diesen Ergebnissen wird deutlich, dass das TfR-Shedding nicht nur konstitutiv erfolgt, sondern auch durch ferri-Tf reguliert werden kann. Die Konzentration des sTfR spiegelt folglich nicht nur die Expressionsrate des zellulären TfR wider, die vom zellulären Eisenstatus abhängt. Die sTfR-Konzentration reflektiert darüber hinaus die Eisenbalance im Serum, die durch das Verhältnis von ferri-Tf zu apo-Tf wiedergegeben wird. Dieses Verhältnis steht als Indikator für die Eisenverfügbarkeit im Organismus.



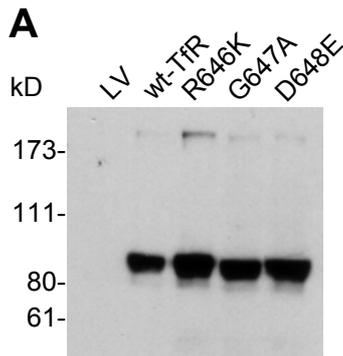
**Abbildung 3-25: Einfluss von Transferrin auf die sTfR-Freisetzung in TRVb-Zellen, die mit TfR transfiziert wurden.** Die Zellen ( $1 \times 10^6$ ) wurden in serumfreiem Medium mit 0 bis 200 µg/ml ferri-Tf (A) oder in ferri-Tf-haltigem Medium mit oder ohne 200 µM Desferrioxamin (B) für 10 h inkubiert. Der sTfR aus dem Zellüberstand wurde in einem TfR-spezifischen ELISA gemessen. Die Bestimmung der TfR-Expression (zellulärer TfR) erfolgte durch SDS-PAGE und anschließendem Immunoblot mit H68.4-Antikörper. (A) zeigt die sTfR-Freisetzung in Abhängigkeit von ferri-Tf und (B) die Wirkung von Desferrioxamin. Die Daten stellen Mittelwerte aus fünf unabhängigen Experimenten mit S.A.M. dar, die jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. Für die zelluläre TfR-Expression in Abhängigkeit von ferri-Tf (C) und Desferrioxamin (D) ist ein repräsentatives Ergebnisse gezeigt.

### 3.5.2 Transferrinrezeptor-Mutanten mit unterschiedlicher Affinität zu ferri-Transferrin

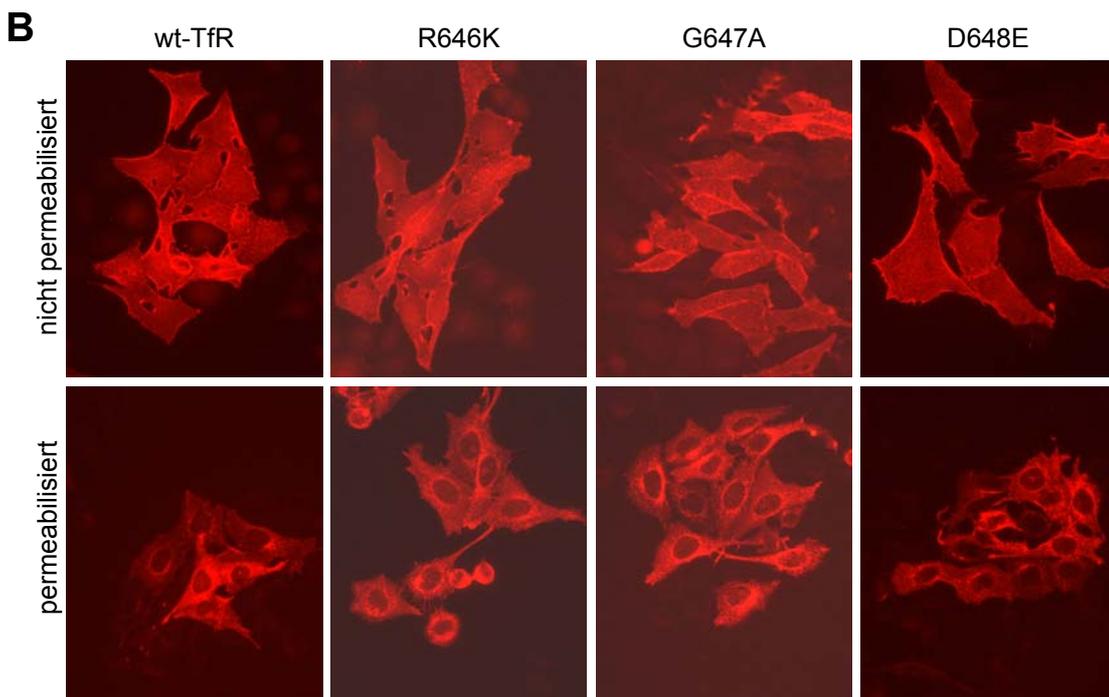
Zur Aufklärung des Mechanismus, wie ferri-Tf auf die sTfR-Freisetzung Einfluss nimmt, wurden TfR-Mutanten hergestellt, die ferri-Tf mit unterschiedlicher Affinität binden. Damit wurde geklärt, ob ferri-Tf direkt über die Bindung an den TfR auf das Shedding einwirkt oder ob die Wechselwirkung mit anderen Proteinen eine Inhibition der Protease durch intrazelluläre Signaltransduktionsereignisse oder Adapterproteine vermittelt.

Ergebnisse von anderen Arbeitsgruppen wiesen darauf hin, dass Mutationen in der RGD-Sequenz der Ectodomäne des TfR zu veränderten Bindungsstärken des ferri-Tf:TfR-Komplexes führen. Deshalb wurden hier die konservativen Mutationen R646K, G647A und D648E mittels Mutagenese-PCR in die cDNA des TfR eingeführt. Die Expression der mutierten TfR-Moleküle in TRVb-Zellen wurde im Immunoblot von Zelllysaten mit OKT9 überprüft (Abbildung 3-26A).

Die veränderten Rezeptoren konnten in vergleichbaren Mengen mit einem dem wt-TfR entsprechenden Molekulargewicht von 90 kD detektiert werden. Um auszuschließen, dass die Mutationen die intrazelluläre Verteilung des TfR verändern, wurde dessen Lokalisation in den transfizierten Zellen durch Immunfluoreszenzmikroskopie mit dem Antikörper OKT9 und Rhodamin konjugiertem Ziegen-anti-Mausantikörper überprüft (Abbildung 3-26B). Sowohl die Verteilung der mutierten TfR-Moleküle auf der Zelloberfläche in nicht permeabilisierten Zellen als auch die intrazelluläre Lokalisation in permeabilisierten Zellen stimmen mit dem wt-TfR überein.

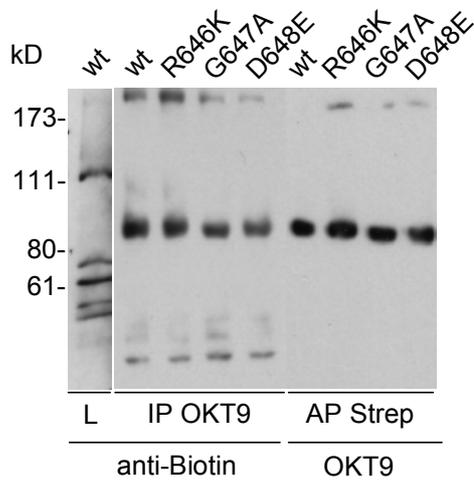


**Abbildung 3-26: Expression der mutierten TfR-Moleküle in TRVb-Zellen.** (A) Zur Überprüfung der TfR-Expression wurden die transfizierten TRVb-Zellen lysiert, das Lysat (25 µg Gesamtprotein) im reduzierenden 7,5 % SDS-Gel aufgetrennt und der TfR im Immunoblot mit H68.4 nachgewiesen. (B) Nicht permeabilisierte (Paraformaldehyd fixierte) und permeabilisierte (Methanol fixierte) Zellen wurden zur Immunfluoreszenzanalyse mit den Antikörpern OKT9 und Rhodamin konjugiertem GAM gefärbt.



Zur Bestimmung der TfR-Oberflächenexpression wurden die Zelloberflächenproteine der transfizierten TRVb-Zellen bei 4 °C mit NHS-LC-Biotin markiert. In nicht markierten Zellen können natürlicherweise Biotin markierte Proteine mit anti-Biotinantikörper nachgewiesen werden (Abbildung 3-27). Sie entsprechen in ihrem Molekulargewicht jedoch nicht dem TfR. Die Methode eignet sich deshalb hervorragend zum Nachweis der TfR-Oberflächenexpression. Die Isolierung der biotinylierten Proteine mittels Streptavidinaffinitätspräzipitation zeigt im Immunoblot mit OKT9, dass der TfR unabhängig von der Mutation an

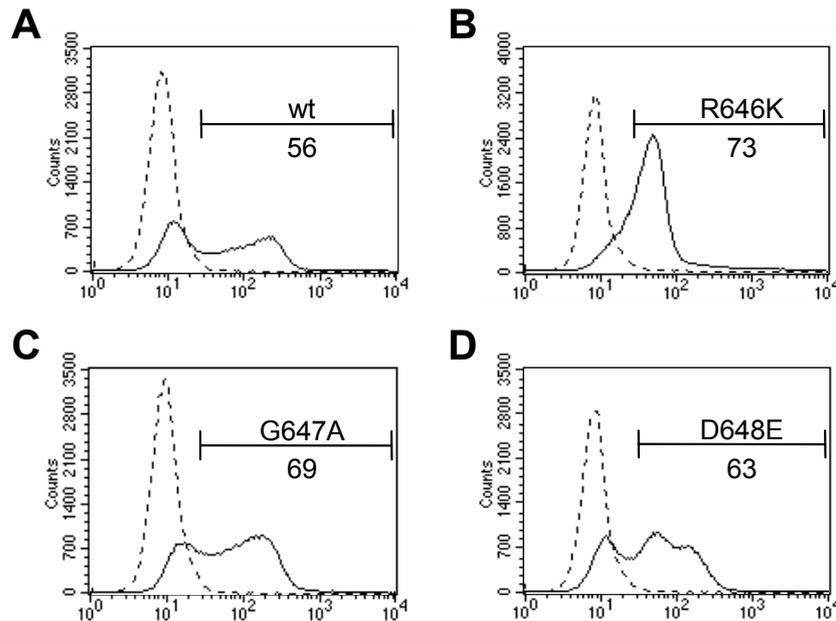
der Oberfläche exprimiert wird. Umgekehrt kann auch nach OKT9-Immunpräzipitation biotinylierter TfR im Immunoblot mit anti-Biotinantikörper nachgewiesen werden. Weiterhin kann beobachtet werden, dass die Mutanten an der Zelloberfläche gleiche Konzentration an TfR exprimieren.



**Abbildung 3-27: Nachweis von mutiertem TfR auf der Zelloberfläche.** Transfizierte TRVb-Zellen ( $1 \times 10^7$ ) wurden bei 4 °C mit 1 mg NHS-LC-Biotin markiert und anschließend lysiert. Die Detektion von biotinyliertem Oberflächen-TfR erfolgte nach Auftrennung im reduzierenden 7,5 % SDS-Gel einerseits durch Immunpräzipitation von zellulärem TfR (IP OKT9) und dem anschließenden Nachweis der biotinylierten Fraktion mit Anti-Biotin-Antikörper im Immunoblot und andererseits durch Isolierung aller biotinylierten Oberflächenproteine mit Streptavidinsepharose (AP Strep) und der Immunfärbung des biotinylierten TfR mit OKT9. Als Kontrolle wurde unmarkiertes Zelllysate (L) im SDS-Gel aufgetrennt und mit Anti-Biotin-Antikörper gefärbt.

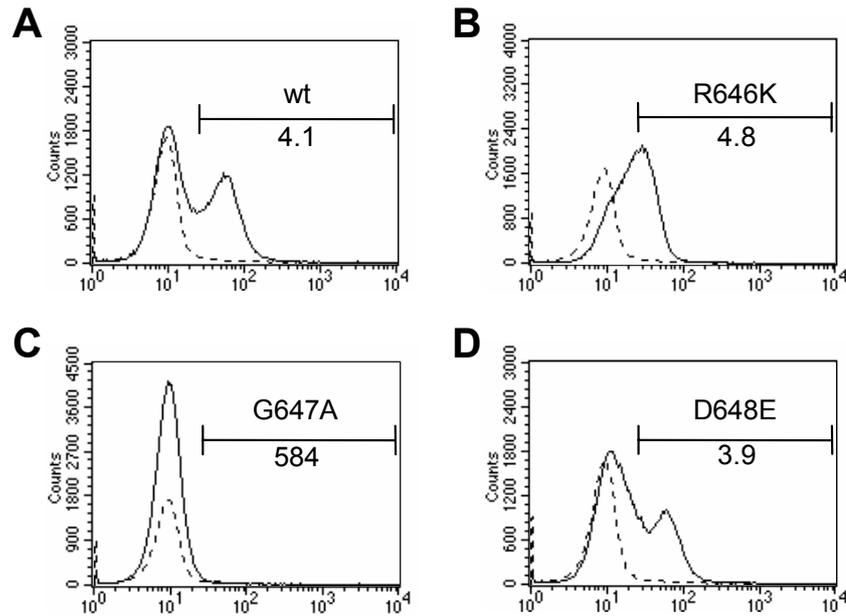
Zur exakten Quantifizierung der TfR-Oberflächenexpression wurden die Zellen mit OKT9 und FITC konjugiertem Ziegen-anti-Mausantikörper gefärbt und durchflusscytometrisch analysiert (Abbildung 3-28). Dabei variiert der Anteil an Zellen, die TfR exprimieren zwischen 56 % für den wt-TfR und 73 % für R646K. Die Zellen, die keinen TfR exprimieren, stören die weiteren Untersuchungen nicht, weil diese Zellen keinen endogenen TfR besitzen und somit weder fähig sind, Transferrin zu binden noch TfR freizusetzen.

Die Zellen, die TfR exprimieren, weisen eine ähnliche Rezeptordichte auf ihrer Zelloberfläche auf. Nur bei der R646K Mutante ist die Rezeptordichte etwas geringer. Dies ist jedoch gerade die Zelllinie mit der höchsten Zellzahl an TfR exprimierenden Zellen, sodass im Immunoblot von Zelllysaten ähnliche Mengen an TfR und Zelloberflächen-TfR detektiert werden konnte (vergleiche mit Abbildung 3-26A und Abbildung 3-27). Da sich die Mutanten bezüglich Lokalisation und Verteilung ähnlich wie der wt-TfR verhalten, sind sie hervorragend für die weiteren Untersuchungen geeignet.



**Abbildung 3-28: Quantifizierung der TfR-Zelloberflächenexpression.** Die Zellen wurden bei 4 °C mit OKT9 und FITC konjugiertem GAM-Antikörper markiert und im FACScalibur *cell counter* analysiert. Die Auswertung erfolgte mit CellQuest Software. Die hier gezeigten repräsentativen Histogramme zeigen die TfR-Oberflächenexpression von (A) wt-TfR und den TfR-Mutanten (B) R646K, (C) G647A, und (D) D648E. Die Isotypkontrolle ist als gestrichelte Linie dargestellt. Die Zahlenangabe im Histogramm entspricht der gemessenen Prozentzahl der TfR exprimierenden Zellen.

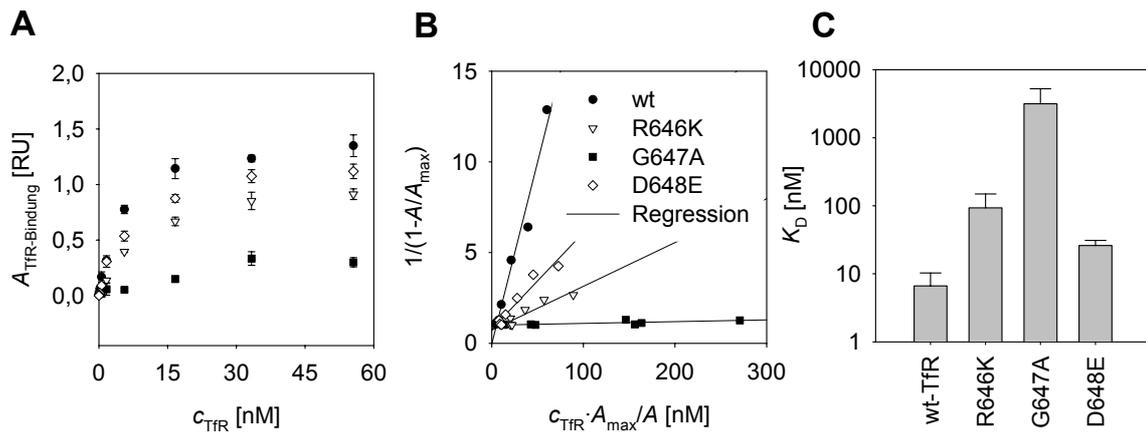
Um nun nachzuweisen, dass die Mutanten tatsächlich unterschiedliche Affinitäten zu ferri-Tf aufweisen, wurden die Zellen mit ferri-Tf-FITC inkubiert und anschließend durchflusscytometrisch analysiert. Nicht transfizierte Zellen zeigten keine ferri-Tf-Bindung (Abbildung 3-29, gestrichelte Linie). Dagegen haben die TfR transfizierten Zellen ferri-Tf in unterschiedlichem Ausmaß gebunden (Abbildung 3-29, durchgehende Linie). Wie zu erwarten, wurde bei einem Teil der Zellen keine ferri-Tf Bindung detektiert, was in Übereinstimmung steht mit den transfizierten Zellen, die keinen detektierbaren TfR exprimieren (vergleiche Abbildung 3-28). Um nun die ferri-Tf-Bindung für die verschiedenen Mutanten zu normieren, wurde das Verhältnis aus TfR-Expression und ferri-Tf-Bindung berechnet. Dabei verhielt sich D648E ähnlich wie der wt-TfR (normierte ferri-Tf-Bindung 3,9 und 4,1), während die Bindung von ferri-Tf-FITC an R646K etwas reduziert war (normierte ferri-Tf-Bindung 4,8) und bei G647A fast nicht mehr detektiert werden konnte (normierte ferri-Tf-Bindung 584). Die normierten ferri-Tf-Bindungen, also das Verhältnis aus Zelloberflächen-TfR und ferri-Tf bindendem TfR, spiegeln die Dissoziationseigenschaften des ferri-Tf:TfR-Komplexes wider. Die Mutation G647A führt zu einer stark erhöhten Dissoziation des Komplexes. Eine geringe Erhöhung konnte auch für die Mutation R646K beobachtet werden, während sich die Mutation D648E nahezu wie der wt-TfR verhält. Die Mutationen sind folglich sehr gut geeignet, um den Einfluss von ferri-Tf auf das TfR-Shedding zu untersuchen.



**Abbildung 3-29: Die ferri-Tf-Bindung auf den TfR-transfizierten TRVb-Zellen.** Die Zellen wurden bei 4 °C mit FITC markiertem ferri-Tf gefärbt und gebundenes Transferrin wie in Abbildung 3-28 mittels Durchflusszytometrie fluorometrisch quantifiziert. Die gezeigten repräsentativen Histogramme zeigen die ferri-Tf-Bindung an Zellen, die wt-TfR (A) und die TfR-Mutanten R646K (B), G647A (C) and D648E (D) exprimieren. Nicht transfizierte TRVb-Zellen dienten als Kontrolle und sind als gestrichelte Linie dargestellt worden. Das Verhältnis von Zelloberflächen-TfR (Abbildung 3-28) und ferri-Tf bindendem TfR (normierte ferri-Tf-Bindung) ist in jedem Histogramm als Zahlenwert angegeben.

Nach Bestimmung der ferri-Tf-Bindung an Zellen wurden nun die Affinitätskonstanten der Bindung von mutiertem TfR an ferri-Tf *in vitro* ermittelt. Die Bestimmung der Affinitätskonstanten ermöglicht einerseits die Quantifizierung der Bindungsstärke im exakten Vergleich zur freigesetzten sTfR-Menge der Mutanten und bestätigt andererseits die Ergebnisse zur ferri-Tf-Bindung an den Zellen. Die Bestimmung erfolgte mittels Liliom-Plot (2.11.8 [122]), der auf den Ergebnissen eines Rezeptor-Ligand-ELISAs beruhte (Abbildung 3-30). Daraus ergaben sich  $K_D$ -Werte von 7 nM und 26 nM für wt-TfR bzw. D468E. Der  $K_D$ -Wert für R646K liegt dagegen etwas höher bei 93 nM. Die Mutation G647A führte zu einer besonders hohen Dissoziationskonstante von 3160 nM.

Diese Ergebnisse stimmen hervorragend mit den ferri-Tf-Bindungsdaten der Zellen überein (vergleiche  $K_D$ -Werte mit ferri-Tf-Bindungsquotienten in den FACS-Experimenten in Abbildung 3-29). Die TfR-Mutanten mit ihrer unterschiedlichen Affinität zu ferri-Tf sind somit ein besonders gut geeignetes Mittel, um den Einfluss der Transferrinbindung auf das TfR-Shedding zu untersuchen.

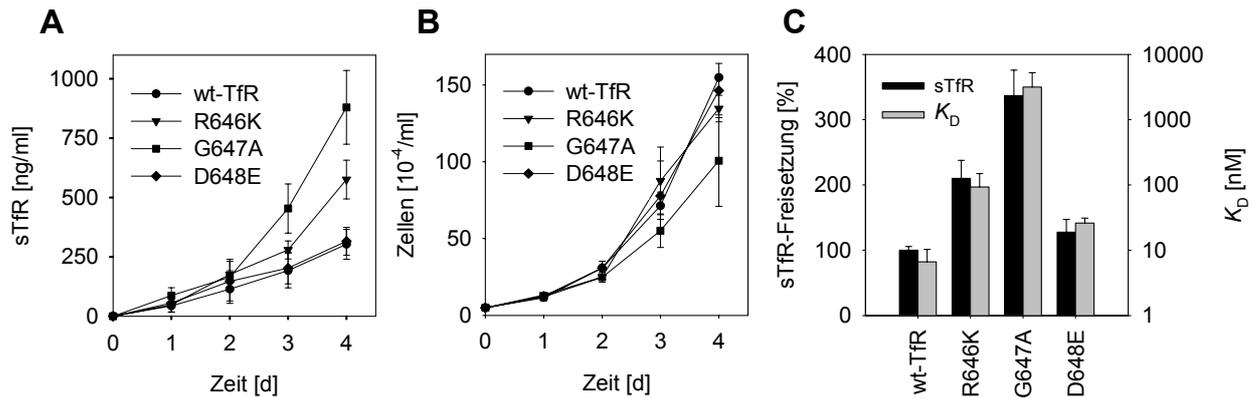


**Abbildung 3-30: Bestimmung der Dissoziationskonstanten für die TfR-Tf-Bindung.** Die Bindung von TfR an ferri-Tf wurde mittels Tf-ELISA bestimmt. (A) Messung des im Gleichgewichtszustand gebundenen TfR (2,5 h Rezeptor-Ligand-Interaktion). (B) Liliom-Plot-Analyse zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten. (C) Mittelwerte der Dissoziationskonstanten mit S.A.M. (A) zeigt ein repräsentatives Experiment mit dem dazugehörigen Liliom-Plot (B). In (C) sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten dargestellt, die jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

### 3.5.3 Serumtransferrinrezeptor-Freisetzung aus transfizierten Zellen

Die Analyse der sTfR-Freisetzung in den Mutanten erfolgte mittels TfR-spezifischen ELISA. Die transfizierten TRVb-Zellen wurden in ferri-Tf-haltigem Medium für vier Tage kultiviert. Die Konzentration an freigesetztem sTfR wurde jeden Tag aus dem Zellkulturüberstand bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die Menge an sTfR in Abhängigkeit der Zeit ansteigt, jedoch unterscheidet sich die Zunahme für jede der einzelnen Mutanten (Abbildung 3-31A). Obgleich die Zellproliferationsrate für die Zelllinien wt-TfR, R646K und D648E nahezu gleich und für G647A sogar etwas verringert ist (Abbildung 3-31B), wird doppelt so viel sTfR von den Zellen, die die R646K-Mutation exprimieren, freigesetzt und dreifach soviel von den G647A-Mutanten.

Zuvor wurde schon gezeigt, dass diese Erhöhung der sTfR-Freisetzungsrates nicht Ursache einer erhöhten TfR-Expression in den Zelllinien R646K und G647A ist (vergleiche Abbildung 3-26), sondern vielmehr mit der veränderten Bindungsstärke zu ferri-Tf zusammenhängt. In der Analyse zeigt sich, dass die Zunahme in der sTfR-Freisetzung für alle Mutanten exakt mit den  $pK_D$ -Werten des ferri-Tf:TfR-Komplexes korreliert (Abbildung 3-31C). Damit ist gezeigt, dass ferri-Tf seinen Effekt auf das Shedding über eine direkte Interaktion mit dem TfR ausübt.



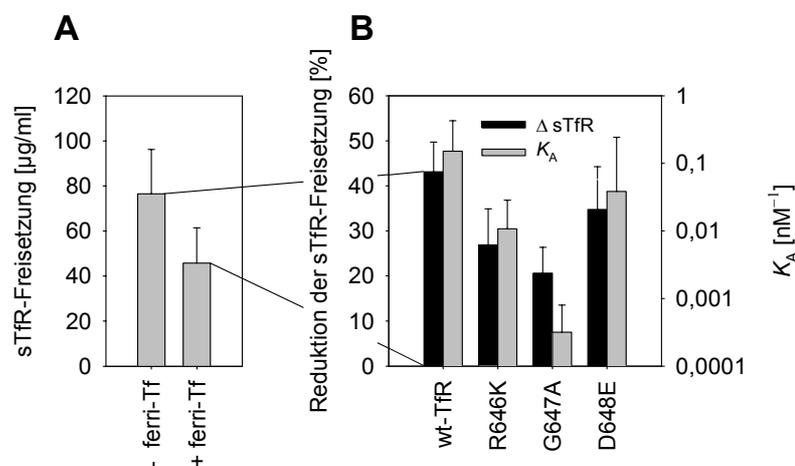
**Abbildung 3-31: sTfR-Freisetzung aus transfizierten TRVb-Zellen.** Die Zellen ( $5 \times 10^4$  Zellen/ml) wurden für vier Tage kultiviert. Die Bestimmung des sTfR erfolgte aus den gesammelten Zellüberständen mittels TfR-ELISA. (A) Zeitabhängiger Verlauf der sTfR-Freisetzung für TRVb-Zellen, die mit wt-TfR und den TfR-Mutanten R646K, G647A und D648E transfiziert wurden. Die Daten entsprechen Mittelwerten mit S.A.M. aus drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. (B) Wachstum der Zellen von (A). (C) Die sTfR-Freisetzung im Vergleich zu den Dissoziationskonstanten. Die dunklen Balken entsprechen der auf den wt-TfR normierten sTfR-Freisetzung (wt-TfR entspricht 100 %), die nach vier Tagen Kultivierung bestimmt wurde. Die hellen Balken entsprechen den Dissoziationskonstanten des ferri-Tf:TfR-Komplexes für wt-TfR und TfR-Mutanten (aus Abbildung 3-29 zum besseren Vergleich).

Unabhängig davon bleibt jedoch unklar, wie ferri-Tf seine inhibitorische Wirkung ausübt. Ferri-Tf könnte, erstens, durch seine Bindung Signaltransduktionsereignisse auslösen, die die Aktivität der Protease regulieren. Zweitens wäre es möglich, dass durch Rezeptor-Ligand-Interaktion die Kolokalisation von Rezeptor und Protease innerhalb der Zelle verhindert wird und drittens ist es denkbar, dass ferri-Tf die Spaltstelle des Rezeptors maskiert. Um den Regulationsmechanismus aufzuklären, wurde die sTfR-Freisetzung in Membranen anstatt an intakten Zellen untersucht.

### 3.5.4 Inhibition der Serumtransferrinrezeptor-Freisetzung durch ferri-Transferrin an Membranen

Die sTfR-Freisetzung aus mikrosomalen Membranen ist, wie schon zuvor beschrieben, hervorragend geeignet, das TfR-Shedding zu untersuchen. Die mikrosomalen Membranen bieten den Vorteil, dass der Einfluss von intrazellulären Transportprozessen oder Signaltransduktionsereignissen auf das TfR-Shedding minimiert wird. Gereinigte Membranfraktionen (siehe 2.11.12) der TfR exprimierenden TRVb-Zellen wurden in Gegenwart und Abwesenheit von  $10 \mu\text{g}$  ferri-Tf über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Der freigesetzte sTfR wurde im Überstand der Membranen mittels TfR-ELISA quantifiziert (Abbildung 3-32A). Die Zugabe von ferri-Tf reduziert dabei deutlich die Menge an freigesetztem sTfR um 43 %. Somit beruht der Effekt des ferri-Tf nicht auf Signaltransduktionsmechanismen oder Beeinflussung der Kolokalisation von TfR und Protease, sondern ist vielmehr das Resultat einer direkten Inhibition. Es gibt zwei Möglichkeiten, wie sich eine direkte Inhibition auswirken kann. Entweder inhibiert ferri-Tf die Protease oder es bindet derart an den TfR, dass die Erkennungssequenz und/oder die Spaltstelle sterisch blockiert sind. Würde die inhibitorische Wirkung von ferri-Tf auf einer TfR-unabhängigen, direkten Interaktion mit der

Protease beruhen, müsste ferri-Tf die gleiche inhibitorische Wirkung bei wt-TfR und bei allen Mutanten ausüben. Im Gegensatz dazu müsste die inhibitorische Wirkung von ferri-Tf bei den Mutanten mit geringerer Affinität zu ferri-Tf reduziert sein, wenn ferri-Tf die Protease-Erkennungssequenz und/oder die Spaltsequenz maskiert. In Abbildung 3-32B ist die Reduktion der sTfR-Freisetzung durch ferri-Tf für die unterschiedlichen Mutanten gezeigt. Eine höhere Prozentzahl bedeutet eine stärkere inhibitorische Wirkung von ferri-Tf. Der inhibitorische Effekt ist von 43 % für den wt-TfR geringfügig reduziert auf 38 % für D648E und 34 % für R646K. Bei der Mutante G647A mit der niedrigsten Affinität zu ferri-Tf ist die inhibitorische Wirkung jedoch auf unter 21 % reduziert. Diese Werte zeigen, dass sich die Reduktion der inhibitorischen Wirkung proportional zum  $pK_A$  des ferri-Tf:TfR-Komplexes verhält (Abbildung 3-32B).



**Abbildung 3-32: Wirkung von ferri-Tf auf die sTfR-Freisetzung aus gereinigten Membranen.** Gereinigte Membranen aus wt-TfR-transfizierten TRVb-Zellen wurden für 12 h bei 37 °C in Gegenwart 10  $\mu\text{g}$  ferri-Tf und ohne ferri-Tf inkubiert. In drei unabhängigen Experimenten wurde die sTfR-Freisetzung in einem TfR-spezifischen ELISA bestimmt. (A) sTfR-Freisetzung des wt-TfR in Abwesenheit und unter Zugabe von 10  $\mu\text{g}$  ferri-Tf. (B) Inhibition der sTfR-Freisetzung des wt-TfR und der Mutanten unter dem Einfluss von ferri-Tf (dunkle Balken) Dargestellt ist die Änderung der sTfR-Freisetzung in Prozent nach Zugabe von ferri-Tf. Die hellen Balken stellen die Assoziationskonstanten für den ferri-Tf:TfR-Komplex dar (abgeleitet von Abbildung 3-29 zum besseren Vergleich).

Die Ergebnisse zeigen somit, dass die Bindung von ferri-Tf an TfR eine Herabregulation der sTfR-Freisetzung durch Blockierung der TfR-Spaltstelle für die Protease bewirkt. Es ist bekannt, dass ein erhöhter intrazellulärer Eisenbedarf eine verstärkte Expression des TfR bewirkt. Durch konstitutives Shedding wird damit mehr sTfR freigesetzt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die durch ferri-Tf widergespiegelte extrazelluläre Eisenverfügbarkeit diesem Effekt entgegen wirkt.

Durch Mutationsanalysen am TfR-*stalk* und an der extrazellulären Domäne des TfR konnten neue Erkenntnisse über die bisher wenig untersuchte Regulation des TfR-Sheddings erlangt werden. Dies trägt wesentlich zur Aufklärung der Frage bei, wie die Eisenhomöostase reguliert wird.