

1 Einleitung

1.1 Die zelluläre Eisenaufnahme bei Vertebraten

Mit Ausnahme einiger Bakterienarten benötigen nahezu alle Organismen Eisen für ihren Metabolismus. Eisen ist daher ein zentrales Element, dessen Aufnahme, Transport und Lagerung von praktisch allen Organismen bewältigt werden muß. Ein besonderes Problem stellt dabei der Transport innerhalb des Körpers dar, da Eisen in Gegenwart von Sauerstoff sehr rasch in seine dreiwertige Ferri-Form oxidiert wird. In wässriger Lösung bildet sich dann Eisen(III)hydroxid, welches unter physiologischen Bedingungen nahezu unlöslich ist.

Bei Vertebraten wird das Eisen zum Transport innerhalb des Körpers an das chelatbildende Glykoprotein Transferrin (Tf) gebunden. Bei Transferrin handelt es sich um ein 80 kD großes Protein, das zwei Eisen-III-ionen synergistisch mit zwei Hydrogencarbonationen komplexiert. Die beiden Bindungsstellen für Eisen-III-ionen sind nicht equivalent. Die Röntgenstruktur des ferri-Transferrins aus Kaninchenserum zeigt bei einer Auflösung von 3.3 Å, daß Tf in zwei Domänen gegliedert ist, die jeweils eine Bindungsstelle für ein Eisen(III)Ion enthalten. Die Eisen(III)Ionen werden durch vier Liganden (2 Tyrosine, 1 Aspartat und 1 Histidin) gebunden, die Ladung der Carbonationen durch Argininreste kompensiert (Baily et al., 1988).

Die Aufnahme von Eisen(III)Ionen in die Zelle erfolgt über die Bindung von Transferrin an den Transferrinrezeptor (TfR). Wie in Abb. 1-1 gezeigt, wird der Komplex zwischen Transferrin und TfR mit Hilfe des Clathrin-Systems in die Zelle aufgenommen. Wobei eine Erhöhung der Expression des TfR den Aufbau des Clathrin Netzwerkes auf der cytosolischen Seite der Zellmembran fördert (Miller et al., 1991). Nach Bindung von Transferrin reichern sich die Tf-TfR Komplexe in bestimmten Membranregionen an und werden internalisiert. Hierbei schnürt sich der entsprechende Membranbereich als clathrinumhülltes Vesikel ab. Im Cytosol löst sich die Clathrinhülle. Die hier entstandenen Vesikel werden nun als frühe Endosomen bezeichnet. Durch membranständige Protonenpumpen wird der pH Wert im inneren des Endosoms auf ca. 5,5 bis 6 abgesenkt (Yamashiro und Maxfield, 1987). Unter diesen Bedingungen verringert sich die Affinität des Transferrins zu Eisen(III)Ionen und diese dissoziieren ab (van Renswoude, 1982, Dautry-Varsat, 1983).

Interessanterweise ändert auch die Bindung an den Rezeptor die Affinität von Transferrin zu Eisen(III)Ionen. Freies Transferrin gibt Eisen erst bei einem pH Wert von unter 4,6 ab. Nach Bindung an den Rezeptor erhöht sich der pH Wert für die Abgabe jedoch auf 5,6 bis 6,0 (Sipe und Murphy, 1991). Umgekehrt verringert sich

die Eisenabgabe bei pH 7,4, wenn das Transferrin an den Rezeptor gebunden ist (Bali et al., 1991).

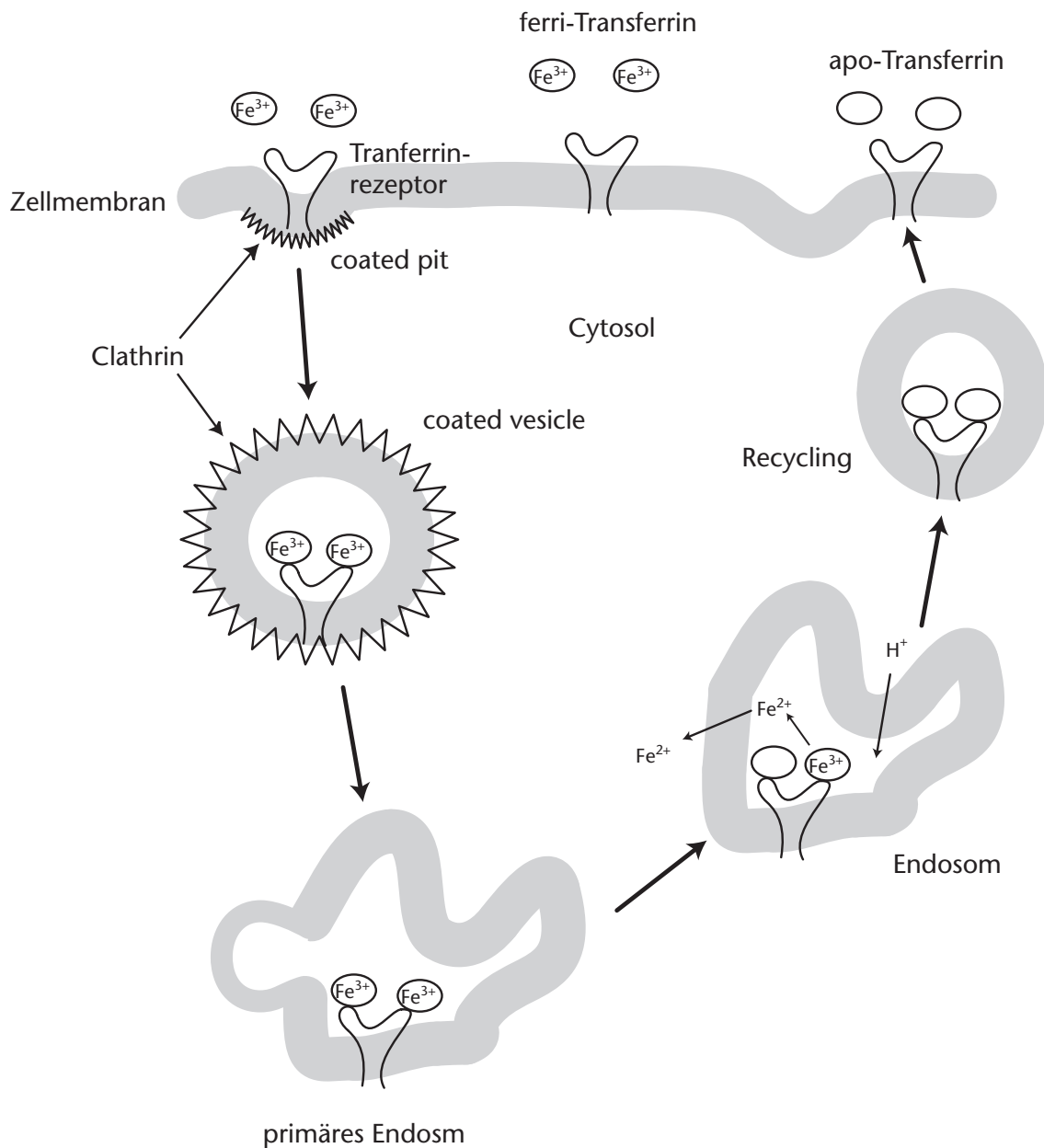


Abb. 1-1 Schematische Darstellung der Eisenaufnahme in eine Vertebratenzelle. ferri-Transferrin bindet an Transferrinrezeptor. Über coated pits wird der Komplex internalisiert. Nach Absenken des pH Werts im Inneren des Endosoms dissoziieren die Eisen-Ionen vom Transferrin ab und werden nach Reduktion ins Cytosol transportiert. Der Tf-TfR Komplex wird an die Zelloberfläche zurückgebracht und wiederverwendet.

Die freien Eisen(III)Ionen werden durch membranständige NADH:Ferricyanid-Oxidoreduktasen zu Eisen(II) Ionen reduziert und mit Hilfe eines Eisen(II)-transporters in das Cytosol überführt (Núñez et al., 1990). Der Komplex aus apo-Transferrin und TfR verbleibt in der Endosomenmembran und wird über einen vermutlich direkten Transport (Volz et al., 1995) wieder an die Zelloberfläche gebracht, wo der Komplex dissoziiert.

Neben der Aufnahme über den Transferrinrezeptor existiert noch ein anderes Transportsystem für Eisen. Hierbei handelt es sich um eine membranständige Ferrireduktase, welche an Citrat oder auch an Transferrin gebundene Eisen(III)Ionen reduziert. Die Eisen(II)Ionen werden dann über einen Transporter ins Cytosol geschleust.

1.2 Struktur und Bindungsverhalten des hTfR

Der humane Transferrinrezeptor (hTfR) bildet ein Homodimer mit einer molaren Masse von 90–95 kD pro Untereinheit, die aus jeweils 760 Aminosäuren besteht (McClelland et al., 1984, Enns und Sussman, 1981). Das für hTfR codierende Gen konnte kloniert und sequenziert werden (McClelland et al., 1984, Schneider et al., 1984), somit ist die Primärstruktur bekannt. Die Untereinheiten sind über zwei Disulfidbrücken zwischen Cys 89 und Cys 98 kovalent miteinander verknüpft. Jede Untereinheit besitzt eine Bindungsstelle für Transferrin. Der N-Terminus befindet sich auf der intrazellulären Seite der Plasmamembran und die membran-durchspannende Domäne wird von den Aminosäuren 68–88 gebildet. hTfR zeigt folgende posttranslationale Modifikationen (Davis et al., 1986, Do und Cummings, 1992, Williams und Enns, 1993, Alvarez et al., 1990):

- Phosphorylierung von Serin-24
- O-Glycosylierung von Threonin-104
- N-Glycosylierung von Asparagin 251, 317 und 727
- Acetylierung von Cystein-62 und 67

Neben dem membranständigen TfR findet sich im Plasma noch eine Abbauf orm (Serum-TfR), die um die ersten 100 Aminosäuren verkürzt ist (Shih et al., 1990). Es fehlt der cytoplasmatische Bereich und die Transmembrandomäne. Ein lösliches, tryptisches Fragment des humanen TfR (Aminosäuren 121 bis 760) konnte kristallisiert werden (Borhani und Harrison, 1991). Die Struktur des extrazellulären Fragments konnte mit einer Auflösung von 3,2 Å bestimmt werden (Lawrence et al.,

1999). Hierbei ergab sich, daß der extrazelluläre Teil eines hTfR Monomers aus drei Domänen besteht, welche als protease-artige, apikale und helikale Domäne bezeichnet wurden. Die Monomere lagern sich derart zusammen, daß eine schmetterlingsförmige Struktur entsteht, bei der die helikalen Domänen den Körper bilden.

Über die Struktur des hTfR in wässriger Lösung ist bisher relativ wenig bekannt. Ein lösliches 70 kD Fragment, welches ca. 95% des extrazellulären Teils des hTfR enthält, läßt sich durch Behandlung des Rezeptors mit Trypsin herstellen (Turkewitz et al., 1988a). Dieses Fragment aggregiert reversibel, wenn der pH Wert der Lösung auf ca. 5,5 abgesenkt wird (Turkewitz et al., 1988b). Die kolloidalen Eigenschaften des Fragments wurden von Hadden et al. (1994) weiter erforscht. In dieser Studie wurde die thermische Stabilität bei verschiedenen pH-Werten mit Hilfe von Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FT-IR) untersucht. Die FT-IR Spektren zeigten mit steigender Temperatur Unterschiede gegenüber denen des nativen Moleküls. Diese Unterschiede wurden mit thermischer Denaturierung des Fragments erklärt. Bei pH 7,4 setzt bei 70 °C eine Aggregation ein. Strukturelle Unterschiede wurden jedoch unter diesen Bedingungen erst bei einer Temperatur von 71 °C gefunden. Alle diese Effekte waren irreversibel. Unter sauren Bedingungen, pH 5,6, sank die Übergangstemperatur auf 55 °C. Die beiden hier zitierten Studien wurden mit dem hTfR Fragment durchgeführt, obwohl das komplette Molekül ebenfalls in wässriger Lösung ohne Zusatz von Detergenz löslich ist. Unter diesen Bedingungen bilden sich Assoziate, welche erstmalig von Fuchs et al. (1996, 1998) beschrieben wurden.

Die Bindung von Transferrin an seinen Rezeptor hTfR wurde bisher hauptsächlich in Zellkulturen oder unter Verwendung von Zellextrakten gemessen. Hierbei wurden unterschiedliche Dissoziationskonstanten zwischen 20 nM und 29 nM für die Bindung von Transferrin an ganze Zellen bestimmt (Brown et al., 1982). Die publizierten Werte für verschiedene Zellextrakte liegen zwischen 0,12 nM und 1,1 nM (Shindelman et al., 1981, Tsunoo und Sussman, 1983, Chitambar und Zivkovic, 1989). Ein Grund für die starken Diskrepanzen zwischen den verschiedenen Messungen könnte in der Kontamination der hTfR Präparationen mit Transferrin liegen (Anderson et al., 1986) Eine neuere Studie mit gereinigtem, solubilisiertem hTfR ergab eine Dissoziationskonstante von 5 nM (Kanevsky et al., 1997).

1.3 Zielsetzung der Studie

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die kolloidchemische Charakterisierung des humanen Transferrinrezeptors, wo insbesondere das Verhalten und die Struktur des

Moleküls in detergenzfreier Lösung studiert werden sollte. Hierzu gehören auch Untersuchungen der Stabilität und des Aggregationsverhaltens in detergenzfreier Lösung unter verschiedenen experimentellen Bedingungen. Aggregierte und auch denaturierte Zustände von Proteinen sind im Rahmen von Untersuchungen zur Proteinfaltung und Stabilität von Proteinen von Interesse. Die biologische Relevanz solcher nicht-nativer Zustände liegt hauptsächlich in den Bereichen Abbau und Umsatz von Proteinen, Proteinsynthese und Transport von Proteinen über Membranen (Dill und Shortle, 1991). Seit der Arbeit von Kam et al. (1978) werden Experimente zur Aggregation, insbesondere mit Lichtstreuungsmethoden, auch im Rahmen von Untersuchungen zur Kristallisation durchgeführt. Ferner sind Aggregationsphänomene wichtig in der Biotechnologie, z. B. bei der Bildung von Einschlusskörpern. Bedauerlicherweise sind jedoch Daten insbesondere über die Stabilität bzw. Denaturierung von Membranproteinen nur sehr begrenzt verfügbar (Stowell und Rees, 1995, Haltia und Freire, 1995). Mit ein Grund hierfür könnte sein, daß von vielen Membranproteinen, und hier besonders von Membranrezeptoren, die für die Anwendung biophysikalischer Methoden nötigen Mengen nicht zur Verfügung stehen. Dagegen kann der humane Transferrinrezeptor in Milligrammengen aus Plazenta isoliert werden, womit die Bereitstellung von ausreichend Material für biophysikalische Messungen problemlos ist. Der humane Transferrinrezeptor kann in diesem Zusammenhang auch als Modellsystem für andere Membranrezeptoren dienen.

Im Bereich Rezeptor-Ligand Wechselwirkung sollte die Eignung der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie für die Untersuchung des Transferrin-Transferrinrezeptorsystems betrachtet werden. Dieser Teil ist insbesondere auch deswegen von Interesse, da die bisher publizierten Bindungskonstanten relativ stark voneinander abweichen und andere Bindungsparameter, wie z. B. die Geschwindigkeitskonstanten, bisher überhaupt nicht publiziert sind. Das Gleiche gilt für den Mechanismus der Bindungsreaktion sowie für die thermodynamischen Parameter der Bindung.

Insgesamt soll das hier vorgestellte Projekt die Grundlage für eine systematische Untersuchung des humanen Transferrinrezeptors mit biophysikalischen Methoden liefern. Das langfristige Ziel darin besteht darin, Struktur und Funktionsweise dieses Moleküls im Detail aufzuklären.