

Regulierte intramembranäre Proteolyse des Transferrinrezeptors 1

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

Vorgelegt von

Claudia Zahn

aus Weißenfels

Berlin, 2012

Für unsere kommende Sophie.

Die praktischen Arbeiten wurden am Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Pathobiochemie, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, in der Zeit von Juli 2008–2012 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hendrik Fuchs angefertigt.

ERSTER GUTACHTER: Prof. Dr. Hendrik Fuchs
Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und
Pathobiochemie
Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

ZWEITER GUTACHTER: Prof. Dr. Petra Knaus
Institut für Chemie und Biochemie
Freie Universität Berlin

Disputation am 20.01.2014

INHALTSVERZEICHNIS

	Abkürzungen.....	8
1	Zusammenfassung.....	11
	Summary	13
2	Einleitung.....	15
2.1	Biologische Bedeutung von Eisen.....	15
	2.1.1 Eisenaufnahme in den Organismus.....	15
	2.1.2 Zellulärer Eisenstoffwechsel.....	16
	2.1.3 Regulation des systemischen Eisenstoffwechsels.....	16
2.2	Rolle des Transferrinrezeptors.....	17
	2.2.1 Transferrinrezeptor 1.....	17
	2.2.2 Shedding des Transferrinrezeptors.....	18
2.3	Regulierte intramembranäre Proteolyse	18
2.4	Zielsetzung.....	21
3	Material.....	23
3.1	Allgemeine Hinweise.....	23
3.2	Geräte.....	23
	3.2.1 Zell- und Bakterienkultur.....	23
	3.2.2 Zentrifugen.....	23
	3.2.3 Elektrophorese und Westernblot.....	24
	3.2.4 ELISA	24
	3.2.5 Sonstige Geräte	24
3.3	Verbrauchsmaterial.....	24
3.4	Zell- und Bakterienkultur	25
3.5	Chemikalien.....	25

3.6	Antikörper	26
3.6.1	Primärantikörper	26
3.6.2	Sekundärantikörper	27
3.7	Proteaseinhibitoren	27
3.8	Kits	27
3.9	Oligonukleotide	28
4	Methoden	28
4.1	Zellbiologische Methoden	28
4.1.1	Kultivierung von HEK293 Zellen	28
4.1.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	29
4.1.3	Transfektion von HEK293-Zellen	29
4.1.4	Immunfluoreszenz von HEK293-Zellen	29
4.2	Proteinbiochemische Methoden	30
4.2.1	Lyse von Zellen	30
4.2.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	31
4.2.3	Gelelektrophorese	31
4.2.4	Westernblot und Immunodetektion	33
4.2.5	Stripping	34
4.2.6	Immunpräzipitation	34
4.2.7	Membranlysatspräparation	35
4.2.8	MALDI-TOF-MS	35
4.2.9	Antikörperaufreinigung	36
4.2.10	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest	37
4.3	Molekularbiologische Methoden	38
4.3.1	Agarosegelelektrophorese	38
4.3.2	Restriktionsverdau	39

4.3.3	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	39
4.3.4	Ligation von DNA-Fragmenten.....	39
4.3.5	Transformation von Plasmid-DNA	39
4.3.6	Präparation von Plasmid-DNA	40
4.3.7	Polymerasekettenreaktion	41
4.3.8	DNA-Sequenzierung.....	41
5	Ergebnisse	43
5.1	Charakterisierung des Flag- TfR1-NTF-V5	43
5.2	Identifizierung des TfR1-C Peptides und der Spalt-stelle	44
5.3	Antikörperaufreinigung	47
5.4	Etablierung eines Sandwich-ELISA	56
5.5	Bindung des TfR1-C Peptids an Serum Albumin.....	58
5.6	Identifizierung der Protease	61
5.7	Lokalisierung von TfR1-NTF und den verschiedenen SPPLs	69
6	Diskussion.....	72
6.1	Entdeckung des TfR1-C-Peptid	72
6.2	Entwicklung von Nachweismethoden	75
6.3	Intramembranäre Proteolyse von TfR1-NTF durch SPPL2a und SPPL2b ...	78
7	Literaturverzeichnis	83
8	Anhang.....	92
	Publikationsverzeichnis	92
	Danksagung.....	93

ABKÜRZUNGEN

α -Flag _m	Monoklonaler anti-Flag Antikörper aus Maus
α -Flag _p	Polyklonaler anti-Flag Antikörper aus Kaninchen
α -HA _m	Monoklonaler anti-HA Antikörper aus Maus
α -HA _p	Polyklonaler anti-HA Antikörper aus Kaninchen
α -V5 _m	Monoklonaler anti-V5 Antikörper aus Maus
α -V5 _p	Polyklonaler anti-V5 Antikörper aus Kaninchen
ADAM	<i>A disintegrin and metalloproteinase</i>
APP	<i>Amyloid precursor protein</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
Bri2	<i>British dementia Protein (Itmb2)</i>
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
Bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
d. h.	Das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT1	<i>Divalent metal transporter 1</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzym gekoppelter Immunadsorptionstest
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
Fpn	Ferroportin
GAR*	Anti-Kaninchen IgG, HRP-konjugiert aus Ziege
h	Stunde
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
I-CLiP	<i>Intramembrane-cleaving Protease</i>
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
kDa	Kilodalton
λ	Wellenlänge

LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
M	molar (Mol pro Liter)
mA	Milliampere
MALDI	<i>Matrix assisted laser desorption ionisation</i>
MS	Massenspektroskopie
NC	Nitrozellulose
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PP	Probenpuffer
PVDF	Polyvinylidenefluorid
RAM*	Anti-Maus IgG, HRP-gekoppelt aus Kaninchen
RIP	Regulierte intramembranäre Proteolyse
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid gelelektrophorese
SPP	Signalpeptidpeptidase
SPPL	Signalpeptidpeptidase-ähnliche Protease
sTfR1	Löslicher Transferrinrezeptor 1
TEMED	Tetramethylethylenediamin
Tf	Transferrin
TfR1	Transferrinrezeptor 1
TfR1-Cp	C-Peptid des TfR1
TfR1-ICD	Intrazelluläre Domäne des TfR1
TfR1-NTF	N-terminales Fragment des TfR1
TMD	Transmembrandomäne
TNF α	Tumornekrosefaktor- α
TOF	<i>Time-of-flight</i>
Tris	Tris-hydroxymethylaminoethan
Triton X-100	T-octylphenoxy polyethoxyethanol
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	Einheit(en) (<i>unit(s)</i>)
v/v	Konzentrationsangabe als Volumenanteil am Gesamtvolumen
WB	Westernblot

Abkürzungen

w/v	Konzentrationsangabe als Gewichtsanteil in Gramm am Gesamtvolumen in Millilitern
× g	×-faches der Erdbeschleunigung
z. B.	Zum Beispiel

1 ZUSAMMENFASSUNG

Der Transferrinrezeptor 1 (TfR1) ist ein homodimeres Typ II Transmembranprotein und vermittelt die Eisenaufnahme über die Bindung des eisenbeladenen Transferrin in die Zelle. Die transferrinbindende extrazelluläre Domäne wird von einem als *a disintegrin and metalloproteinase* (ADAM) bezeichneten Enzym im juxtamembranen Teil des TfR1 C-terminal von Arginin 100 geschnitten. Der dabei entstehende lösliche Transferrinrezeptor (sTfR) dient als diagnostischer Marker für erythropoetische Aktivität, besonders um zwischen einer Eisenmangelanämie und einer inflammatorischen Anämie zu unterscheiden, wobei die biologische Funktion des sTfR1 unverständlich ist. Der Verbleib des durch die Proteolyse der Ektodomäne entstandenen membranständigen N-terminalen Fragments (NTF) des TfR1 ist unbekannt. Für Typ I Transmembranproteine wie dem Notch- oder dem ErbB4-Rezeptor konnte eine weitere intramembranäre Proteolyse zur Proteindegradierung oder für weitere Signaltransduktionen nachgewiesen werden. Dies gelang für Typ II Transmembranproteine erst im Jahr 2002 nach der Entdeckung der Signalpeptidpeptidase ähnlichen-Proteasen (SPPL) für die Substrate Tumornekrosefaktor-alpha (TNF α), FasLigand und *british dementia* Protein (Bri2).

Im Laufe dieser Arbeit konnte mit Hilfe eines N-terminal Flag-getaggten und C-terminal V5-getaggten TfR1-NTF zum ersten Mal gezeigt werden, dass das TfR1-NTF intramembranär gespalten wird. Das dabei extrazellulär entstehende C-Peptid des TfR1 (TfR1-Cp) wurde im Medium als oxidiertes Monomer, d. h. mit einer intramolekularen Disulfidbrücke zwischen dem Cystein 89 und 98 nachgewiesen. Zudem konnte die Sequenz des TfR1-Cp mit Hilfe der MALDI-TOF-TOF-MS-Analyse bestimmt werden. Die intramembranäre Proteolyse erfolgte demnach zwischen dem Glycin 84 und dem Tyrosin 85.

Weiterhin wurden polyklonale Antikörper gegen TfR1-Cp in Kaninchen generiert und aus dem Kaninchenserum aufgereinigt. Diese Antikörper wurden für die Etablierung eines Sandwich-ELISA zum Nachweis des TfR1-Cp im Serum verwendet. Es konnte eine hohe Spezifität des Sandwich-ELISA mit Hilfe eines kompetitiven ELISA, bei dem biotinyliertes TfR1-Cp mit verschiedenen Mengen ungelabeltem TfR1 versetzt wurde, gezeigt werden. Weiterhin wurde mit Hilfe des ELISA humanes Albumin als Interaktionspartner des TfR1-Cp identifiziert.

In dieser Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass die endogene Protease für die intramembranäre Proteolyse des TfR1-NTF ein Mitglied der GxGD-Aspartylproteasen, speziell der SPP/SPPL-Familie ist. Weitere Experimente mit überexprimierten SPPLs oder ihren katalytisch inaktiven Mutanten zeigten bei SPPL2a und SPPL2b eine erhöhte Freisetzung des TfR1-Cp. Während bei der katalytisch inaktiven SPPL2b D/A überhaupt kein TfR1-Cp detektiert werden konnte, zeigte die Überexpression der katalytisch inaktiven SPPL2a D/A eine verringerte jedoch nicht vollständig unterdrückte Freisetzung des TfR1-Cp gegenüber Kontrollzellen. Zudem konnte eine Kollokalisierung der SPPL2b mit dem TfR1-NTF nachgewiesen werden, dies gelang nicht für die SPPL2a. Dies weist auf die SPPL2b als Hauptprotease des TfR1-NTF hin, während die SPPL2a die am Prozess unwesentlichere Protease zu sein scheint. Ferner gelang es in einer Kooperation mit Frau Fluhrer (DZNE, LMU, München) die intrazelluläre Domäne des TfR1 (TfR1-ICD) in Membranlysaten von mit SPPL2b überexprimierten Zellen nachzuweisen.

Die physiologische Bedeutung der intramembranären Proteolyse des TfR1-NTF und der entstehenden Fragmente TfR1-Cp und TfR1-ICD ist ungeklärt. Die intramembranäre Proteolyse könnte dem Abbau des TfR1 oder weiteren Regulationsmechanismen der Zelle und des Körpers dienen. Während die TfR1-ICD in der Zelle als zellulärer Regulator für einen Eisenmangel fungieren könnte, könnte das TfR1-Cp als systemischer Regulator für eine Freisetzung von Eisen aus retikuloendothelialen Makrophagen oder den Enterozyten des Darms durch eine mögliche Stabilisierung des Eisenexportproteins Ferroportin wirken. Dies ist rein spekulativ und müsste noch bewiesen werden.

SUMMARY

The transferrin receptor-1 (TfR1) is a homodimeric type II transmembrane protein and mediates the cellular iron uptake via binding of ferri-transferrin. The extracellular transferrin binding domain is cleaved by a disintegrin and metallo- (ADAM) protease C-terminal of arginin-100 within the juxtamembrane region of the ectodomain. The thereby generated soluble TfR1 (sTfR1) is used as a diagnostic marker for erythropoietic activity, in particular to discriminate between iron deficiency anemia and anemia of inflammation, however, the physiological function of sTfR1 is unclear. The fate of the remaining N-terminal fragment of the TfR1 (TfR1-NTF) is unknown so far. For type I transmembrane proteins such as Notch or ErbB4 receptor, an intramembrane proteolysis for further protein degradation or for subsequent signaling is known. For type II transmembrane proteins, this was the case after the discovery of new proteins in 2002 referred as signalpeptide peptidase-like proteases (SPPL) that cleave substrates such as tumornecrosis factor- α (TNF- α), Fasligand and the british dementia protein (Bri2).

In this work the intramembrane proteolysis of TfR1-NTF was detected for the first time by using an N-terminal Flag tag and a C-terminal V5 tag fused to the TfR1-NTF. The generated extracellular C-terminal peptide of TfR1 (TfR1-Cp) was detected as an oxidized monomer, with an intramolecular disulfide bridge between cystein-89 and cystein-98. Furthermore, the sequence of the peptide was determined by a fragmentation analysis via MALDI-TOF-TOF-MS, which revealed that intramembrane proteolysis occurs between glycine-84 and tyrosine-85.

Furthermore, polyclonal antibodies against the TfR1-Cp were generated in rabbit and purified to be used for a sandwich-ELISA that was established to determine the TfR1-Cp amount in human serum. There was a high specificity detected by using a competitive assay with biotinylated TfR1-Cp and different amounts of unlabelled TfR1-Cp. In addition, human serum albumin was identified as an interaction partner of TfR1-Cp by using the sandwich-ELISA.

Moreover, the endogenous protease for the intramembrane proteolysis of the TfR1-NTF was identified in this work. It belongs to the GxGD-aspartyl proteases, especially to the SPP/SPPL-family. Further experiments with overexpressed SPPLs and their catalytically inactive mutants showed an increased release of TfR1-Cp from cells overexpressing SPPL2a and SPPL2b. By using the catalytically inactive mutant SPPL2b D/A,

absolutely no TfR1-Cp was detectable, whereas with the catalytically inactive SPPL2a D/A a reduced but not completely abolished TfR1-Cp signal was observed in contrast to the control cells. Furthermore, a colocalisation of TfR1-NTF with SPPL2b but not with SPPL2a was detected in the plasma membrane using confocal fluorescence microscopy. This indicates that the SPPL2b is the major protease responsible for TfR1-NTF cleavage and the SPPL2a only the minor one. In a cooperation with Regina Fluhrer (DZNE, LMU, Munich) it was possible to detect the intracellular domain of the TfR1 (TfR1-ICD) in membrane lysates obtained from cells with co-expression of SPPL2b.

The physiologic relevance of the intramembrane proteolysis of the TfR1-NTF and of the released fragments TfR1-ICD and TfR1-Cp is unknown. The intramembrane proteolysis could be useful for the denaturation of the TfR1 or for further regulation within the cell or in body. The TfR1-ICD might be valuable as a cellular regulator for iron deficiency whereas the TfR1-Cp could act as a systemic iron regulator for the iron release from reticuloendothelial macrophages or from the enterocytes in the intestine by stabilizing the iron exporter Ferroportin, but this is speculative and has to be proven.

2 EINLEITUNG

2.1 BIOLOGISCHE BEDEUTUNG VON EISEN

Eisen ist ein sehr wichtiger Kofaktor für viele fundamentale biochemische Reaktionen wie unter anderem beim Sauerstofftransport im Blut, bei der DNA-Synthese sowie bei der oxidativen Phosphorylierung. Da Eisen in verschiedenen Redoxzuständen auftritt, kann es vielseitige chemische Wechselwirkungen eingehen und so beispielsweise mit Proteinen assoziieren, an Sauerstoff binden, an Elektronentransferprozessen teilnehmen oder katalytische Reaktionen vermitteln (1). Unter aeroben Bedingungen ist Eisen toxisch, da es die Entstehung von reaktiven oxygenen Spezies (ROS) und hoch reaktiven Radikalen (Hydroxylradikale) durch die Fentonreaktion katalysiert (2). Dabei wechselt Eisen zwischen der reduzierten Fe^{2+} und der oxidierten Fe^{3+} Form. Der dabei entstehende oxidative Stress wirkt sich auf die Zerstörung von Makromolekülen wie DNA, Zell-/Gewebeverletzungen und Krankheiten aus (3, 4). Um dies zu verhindern und um Fe^{3+} in Lösung zu halten, liegt Eisen immer in chelatisierter oder gebundener Form vor. Dies geschieht zumeist mittels Komplexierung durch Makromoleküle wie Proteine. Das meiste Eisen im Körper ist im Hämoglobin in den Retikulozyten und den sich daraus entwickelnden Erythrozyten verteilt und dient dem Sauerstofftransport. Erhebliche Mengen Eisen sind ebenfalls in Makrophagen und im Myoglobin der Muskelzellen vorhanden, wobei überschüssiges Eisen in der Leber gespeichert wird (5, 6).

2.1.1 EISENAUFNAHME IN DEN ORGANISMUS

Interessanterweise können Menschen nur durch Verschorfungen von Hautzellen oder Blutungen Eisen verlieren, aber nicht durch regulierte Mechanismen, um überschüssiges Eisen aus dem Körper zu entfernen (7). Aus diesem Grund ist es besonders wichtig, dass die Eisenaufnahme aus der Ernährung im Duodenum und Jejunum stark kontrolliert abläuft (8). Dabei wird vorhandenes Fe^{3+} durch eine *ferric reductase* wie das duodenale Cytochrom b reduziert (9) und das entstehende Fe^{2+} mittels des *divalent metal transporter 1* DMT1 über die apikale Membran des Enterozyten transportiert (10, 11). Im Enterozyten wird das internalisierte Eisen weiterverwendet oder über die basolaterale Membran via Fe^{2+} Transporter Ferroportin (Fpn) in den Blutstrom transportiert (12). Dieser Transport ist gekoppelt an die Reoxidierung des Fe^{2+} zu Fe^{3+} , katalysiert von der membran-

gebundenen Ferrioxidase Hephaestin, welche direkt mit Fpn interagiert (13). Das exportierte und reoxidierte Eisen Fe^{3+} wird sofort im redox-inerten Zustand von Transferrin (Tf) gebunden und ins Gewebe gebracht (13). Der Tf-Eisen-Pool ist hoch dynamisch und wird meistens eher durch recyceltes Eisen von roten Blutkörperchen aufgefüllt als Eisen, welches durch die Ernährung aufgenommen wurde (7). Sterbende rote Blutkörperchen werden durch retikuloendotheliale Makrophagen entfernt, dabei wird das Hämoglobin wieder zu Häm abgebaut und Eisen via Fpn in den Blutstrom exportiert (14). Analog wie bei Enterozyten wird das Eisen dabei zuerst reoxidiert und dann als Fe^{3+} an Tf geladen im Blutstrom verteilt. Fpn wird in vielen Eisen exportierenden Zellen exprimiert und spielt eine fundamentale Rolle in der Freisetzung von Eisen in den Blutstrom und im maternalen Eisentransport zum Fötus (12).

2.1.2 ZELLULÄRER EISENSTOFFWECHSEL

Sich entwickelnde Erythrozyten sowie auch viele andere Zellarten benötigen Eisen aus dem Blutstrom. Dazu bindet das Eisen geladene Fe-Tf mit hoher Affinität an den Transferrinrezeptor 1 (TfR1) auf der Zellmembran (15). Der Komplex wird via Clathrin-vermittelter Endozytose über *clathrin-coated pits* internalisiert, eine schrittweise Ansäuerung der frühen Endosomen löst eine Strukturveränderung von Transferrin und dem Transferrinrezeptor aus und führt zur Eisenaufnahme (16). Die Ferrireduktase Steap3 reduziert das Fe^{3+} zu Fe^{2+} (17), welches dann über die endosomale Membran mittels DMT1 ins Zytosol oder aber direkt in die Mitochondrien von Erythrozyten transportiert wird (18). Der Tf-TfR1-Komplex wird anschließend zurück zur Zelloberfläche recycelt (16, 19), bei pH 7,4 dissoziiert das eisenfreie Apo-Tf ins Blut ab und der TfR1 steht für eine erneute Bindung von Fe-Tf zur Verfügung (16, 20-22).

2.1.3 REGULATION DES SYSTEMISCHEN EISENSTOFFWECHSELS

Da die Regulation des Eisenstoffwechsels nur über die Eisenaufnahme und nicht über die Eisenabgabe erfolgt, sollte dieser Prozess stark kontrolliert werden. Heparin wurde im Laufe der Zeit erkannt als zentrales regulatorisches Molekül im systemischen Eisenstoffwechsel und gilt als antimikrobielles Peptid (23, 24). Das gereifte bioaktive Peptid besteht aus 25 Aminosäuren (AS) und wird aus einem 84 AS langen Propeptid durch Furinspaltung generiert. Es wird von Hepatozyten sekretiert und zirkuliert im Plasma gebunden an α 2-Makroglobulin (25). Die Beseitigung des Heparins geschieht über die

Nieren oder durch gemeinsame Degradierung mit dem Ferroportin (Fpn). Dabei bindet Hecpidin an Fpn und löst dadurch die Internalisierung, Ubiquitinylierung und anschließende lysosomale Degradierung (26, 27) aus. Hecpidin kontrolliert den Eisentransport aus eisenexportierendem Gewebe ins Plasma (28). Zudem inhibiert es die intestinale Absorption (24, 29), die Freisetzung aus Makrophagen (30, 31) und die plazentale Eisenspassage (32). Hepatozyten beurteilen den Körpereisenstatus und setzen anschließend Hecpidin frei oder regulieren die Hecpidinexpression herunter.

2.2 ROLLE DES TRANSFERRINREZEPTORS

2.2.1 TRANSFERRINREZEPTOR 1

Bei dem Transferrinrezeptor 1 (TfR1) handelt es sich um ein homodimeres Typ II Transmembranprotein, das für die Eisenaufnahme in die Zelle durch Bindung des Eisenträgerproteins Transferrin (Tf) zuständig ist. Es konnte gezeigt werden, dass der TfR1 in fast allen Zellen, aber in unterschiedlichen Expressionsleveln exprimiert wird (zusammengefasst von (15)). Der humane TfR1 besteht aus zwei 760 Aminosäure langen homologen Peptidketten, wobei die N-terminale zytoplasmatische Domäne aus 67 Aminosäuren (AS), die Transmembrandomäne aus 21 AS und die C-terminale extrazelluläre Domäne aus 672 AS besteht. Die extrazelluläre Domäne trennt sich in den juxtamembranen Teil von 38 AS, der die globuläre Domäne von 634 AS in einem Abstand von 2,9 nm von der Plasmamembran getrennt hält (33). In der zytoplasmatischen Domäne befindet sich ein Internalisierungsmotiv (YTRF, AS 20-23) für die Endozytose (34, 35), zudem konnte eine Phosphorylierungsstelle für die Proteinkinase C am Ser-24 identifiziert werden (36, 37), deren Funktion bislang ungeklärt ist. Weiterhin befinden sich zwei Palmitoylierungsstellen (Cys-62 und Cys-67), welche zur Verankerung des Proteins in der Plasmamembran dienen (38) und für die Endozytose notwendig sind (35), in der zytoplasmatischen Domäne. Innerhalb des juxtamembranen Teils befinden sich zwei Cysteine Cys-89 und Cys-98, welche die Monomere über Disulfidbrücken kovalent verbinden (39), aber nicht essentiell für die Bildung eines Dimers sind (40). Die globuläre extrazelluläre Domäne konnte von Lawrence *et al.* beginnend mit dem Arg-121 erwartungsgemäß als Dimer kristallisiert und die Struktur mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse bestimmt werden (41). Das TfR1-Dimer besitzt eine schmetterlingsähnliche Struktur, bei der die Monomere in drei unterschiedliche Domänen eingeteilt werden können: eine proteaseähnliche Domäne (Leu-122 bis Val-188

und Ile-384 bis Asp-606), einer apikalen Domäne (Lys-189 bis Glu-383) und einer helikalen Domäne (Leu-607 bis Glu-760), welche für die Dimerisierung des TfR1 verantwortlich ist. Die proteaseähnliche Domäne zeigt eine enge Verwandtschaft zu Carboxy- und Aminopeptidasen (42), besitzt jedoch keine proteolytische Aktivität, da ihr die Zn^{2+} -komplexierenden Aminosäurereste fehlen.

2.2.2 *SHEDDING DES TRANSFERRINREZEPTORS*

Die Proteolyse von Ektodomänen (Shedding) spielt eine wichtige Rolle bei Entzündungsprozessen, Zelldegeneration, Apoptose, bei der Entstehung von Krebs und auch in der Alzheimer Krankheit (43). Dabei werden einige Membranproteine, wie Wachstumsfaktoren (*transforming growth factor α*), Zytokine (TNF- α), Rezeptoren (humaner EGF-Rezeptor-2) oder Zelladhäsionsmoleküle (L-Selektin), durch bestimmte Metalloproteasen, wie den als *a disintegrin and metalloproteinase* (ADAM) bezeichneten Enzym gespalten. Ein Teil des TfR1 wird durch die Proteolyse als löslicher Transferrinrezeptor (sTfR1) ins Blut freigesetzt (44). Die Spaltung findet C-terminal des Arg-100 im juxtamembranen Teil 11 AS von der Membran entfernt statt. Der freigesetzte sTfR1 liegt als Dimer komplexiert mit eisenbeladenem Transferrin (Fe-Tf) vor (45). Es gibt Hinweise das ADAM-10 für die Freisetzung des sTfR1 verantwortlich ist (46).

2.3 REGULIERTE INTRAMEMBRANÄRE PROTEOLYSE

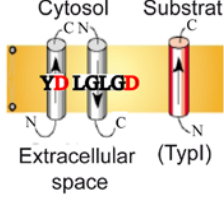
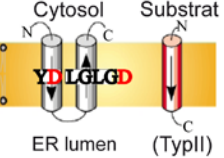
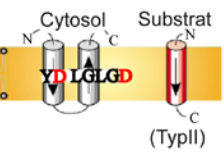
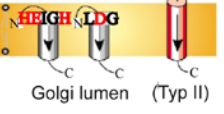
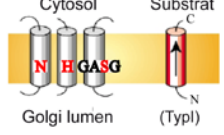
Unter regulierter intramembranärer Proteolyse (RIP) versteht man das Schneiden von Transmembranproteinen innerhalb der Transmembrandomäne. Die freigesetzten zytosolischen Fragmente können in den Nukleus wandern und die Gentranskription regulieren. Es handelt sich hierbei um einen zweistufigen Prozess, bei dem zuerst die Ektodomäne des Proteins abgespalten wird und anschließend durch *intramembrane-cleaving proteases* (I-CLiPs) (47) die intramembranäre Spaltung stattfindet. Dieser Mechanismus ist in viele Prozessen involviert z. B. in biologische Prozesse wie Apoptose, Inflammation, Lipidstoffwechsel und Neurogenese, bei der Entfernung fehlgefalteter Proteine sowie bei der Degradierung von Membranproteinen nach Shedding (48, 49). Lemberg und Martoglio erarbeiteten die Voraussetzungen für die regulierte intramembranäre Proteolyse, welche hauptsächlich für die SPP-Familie gelten (50). Dabei muss zuerst die Ektodomäne des Transmembranproteins geschnitten werden, um das Intermediatsubstrat für die I-CLiPs zu bilden, zudem sollten Helix destabilisierende Aminosäuren innerhalb der Transmembran-

domäne lokalisiert sein und es sollten keine positiv geladenen Aminosäuren die Transmembrandomäne flankieren, da dies einen inhibitorischen Effekt haben würde.

Es gibt drei verschiedene, evolutionär konservierte intramembranär schneidende Familien: die Zinkmetalloproteasen (S2P), die Serinproteasen (Rhomboid) und die größte Familie, die GxGD-Aspartylproteasen (Presenilin abhängige γ -Sekretase, Signalpeptid-peptidase und Signalpeptidpeptidase-ähnliche Protease) (zusammengefasst von (49)). Durch Datenbankuntersuchungen wurden 2002 drei neue Signalpeptidpeptidase (SPP)-Homologe entdeckt und als SPP-ähnliche (SPPL)-Familie definiert (51-53). Bei einer genaueren Charakterisierung konnte dann festgestellt werden, dass die Topologie der SPPLs genau entgegengesetzt zu den Presenilinen ist, d. h. beide weisen sowohl das katalytisch aktive YD-Motiv als auch das katalytisch aktive GxGD-Motiv in benachbarten Transmembrandomänen (TMD) auf, dabei sind die Motive aber entgegengesetzt innerhalb der TMD der SPPs gegenüber den Presenilinen orientiert. Bei den SPPs als auch bei den Presenilinen befindet sich die PAL-Sequenz in der C-terminalen TMD (51-54).

In Tabelle 1 sind die verschiedenen I-CLiP-Familien, ihre Substrate und die Funktion der entstehenden Fragmente dargestellt.

Tabelle 1. I-CLiPs und ihre Funktionen, adaptiert und modifiziert nach Weihofen und Martoglio 2003 (55).

I-CLiP	Katalytische Motive	Substrate	Abbauprodukte	Funktion/ Wirkung	Referenz
Preseniline					
Presenilin-1 (Pflanzen, Tiere)	<p>Presenilin</p> 	<p>NOTCH 1-4</p> <p>βAPP</p> <p>ErbB4</p>	<p>NICD</p> <p>AICD, Aβ</p> <p>ErbB4-ICD</p>	<p>NOTCH Signalweg</p> <p>Alzheimer Krankheit</p> <p>EGF Signalweg</p>	<p>(56, 57)</p> <p>(58-61)</p> <p>(62-65)</p> <p>(66, 67)</p>
SPP-Familie					
SPP (Pflanzen, Tiere)	<p>SPP</p> 	<p>Polymorphe MHC Klasse I Moleküle</p> <p>HCV Polyprotein</p>	<p>HLA-E Epitope</p> <p>HCV Kernprotein</p>	<p>HLA-E Signalweg</p> <p>Prozessierung von Kernprotein</p>	<p>(51, 52)</p> <p>(68, 69)</p> <p>(70)</p>
SPP-ähnliche Proteasen (Pflanzen, Tiere, Pilze, Archea) SPPL2a, SPPL2b	<p>SPPL</p> 	<p>TNF-α</p> <p>Bri2 (Itm2b)</p> <p>FasL</p>	<p>TNF- α-ICD</p> <p>Bri2-ICD</p> <p>FasL-ICD</p>	<p>IL-12 Induktion</p> <p>Kostimulierung von TCR Signalen</p>	<p>(71, 72)</p> <p>(73)</p> <p>(74, 75)</p>
S2P					
S2P (Tiere)	<p>S2P</p> 	<p>SREBP</p> <p>ATF6</p>	<p>SREBP (N-term. Domäne)</p> <p>ATF6 (N-term. Domäne)</p>	<p>Cholesterol/Lipid Biosynthese</p> <p>Chaperoninduktion</p>	<p>(76, 77)</p> <p>(78-80)</p> <p>(81)</p>
Rhomboid Familie					
Rhomboid 1 (<i>D.melanogaster</i>)	<p>Rhomboid 1</p> 	<p>Spitz</p> <p>Gurken</p> <p>Keren</p>	<p>Spitz (EGF Ligand)</p> <p>Gurken (EGF Ligand)</p> <p>Keren (EGF Ligand)</p>	<p>EGF Signalisierung</p> <p>EGF Signalisierung</p> <p>EGF Signalisierung</p>	<p>(82)</p> <p>(83)</p> <p>(84)</p> <p>(84)</p>

2.4 ZIELSETZUNG

Shih et al. zeigten 1990, dass der Transferrinrezeptor 1 (TfR1) proteolytisch zwischen dem Arginin-100 und dem Leucin-101 geschnitten wird und als Serumtransferrinrezeptor (sTfR) freigesetzt wird (85). Der sTfR ist seit längerer Zeit als diagnostischer Marker für den Eisenstatus bekannt, dabei steigt die sTfR-Konzentration im Serum bei Eisenmangel an (86), seine Funktion ist dabei noch immer ungeklärt. Später konnte in unserer Arbeitsgruppe von Kaup et al. 2002 gezeigt werden, dass eine ADAM-Protease in dem Sheddingprozess des TfR1 involviert ist (46). Das Schicksal des bei diesem Prozess entstandenen N-terminalen Fragments des TfR1 (TfR1-NTF) ist bislang unbekannt und sollte in dieser Arbeit geklärt werden.

Für Typ I Transmembranproteine ist bekannt, dass nach einem Sheddingvorgang der C-terminale Anteil des Proteins innerhalb der Membran weiter proteolytisch abgebaut wird; die dabei entstehenden Fragmente sind die C-terminale intrazelluläre Domäne und das N-terminale Peptid, welches extrazellulär abgegeben wird. Für Typ II Transmembranproteine waren bislang nur zwei Proteasen bekannt gewesen, die *site-2* Protease (S2P) und die Signalpeptidpeptidase (SPP), wobei die SPP Signalpeptide von den Proteinen entfernt. Erst 2002 wurden mit Hilfe von Datenbank Untersuchungen weitere Proteine entdeckt, die homolog zu der SPP sind. Es handelte sich dabei ebenfalls um GxGD-Aspartylproteasen, welche den Namen SPP-ähnliche (SPPL)-Proteasen bekamen. Weitere Untersuchungen erbrachten zwischen 2006 und 2008, dass es sich bei den Substraten dieser SPPLs um Typ II Transmembranproteine wie dem Tumornekrosefaktor- α (TNF α) (71, 72), dem Fas Ligand (FasL) (74) und dem *british dementia* Protein (Bri2) (73, 87) handelt. Lemberg und Martoglio erarbeiteten 2002 die allgemeinen Voraussetzungen für die intramembranäre Proteolyse von Typ II Transmembranproteinen anhand der SPP (50), diese Voraussetzungen treffen auch für das Substrat TNF α , welches von den Proteasen SPPL2a und SPPL2b geschnitten wird (71, 72), zu.

Interessanterweise gilt dies auch für den TfR1 zu; (1) die Ektodomäne wird am Arginin-100 von einer ADAM-Protease freigesetzt, (2) es sind keine positiv geladenen Aminosäuren innerhalb der Transmembrandomäne vorhanden, welche inhibierend wirken würden, und (3) die Transmembranregion des TfR1 enthält Helix destabilisierende Aminosäuren wie Glycin (Gly)-69, Gly-80, Gly-84 und Gly-87. Aufgrund dieser Voraussetz-

ungen war es die zentrale Fragestellung dieser Arbeit zu untersuchen, ob der TfR1 intramembranär proteolytisch geschnitten wird und wenn ja, diesen Prozess und den Verbleib der entstehenden Fragmente im Detail zu charakterisieren. Die dabei potentiell entstehenden Fragmente sind das extrazelluläre C-terminale Peptid (TfR1-Cp) und die N-terminale intrazelluläre Domäne (TfR1-ICD) (Abb. 1).

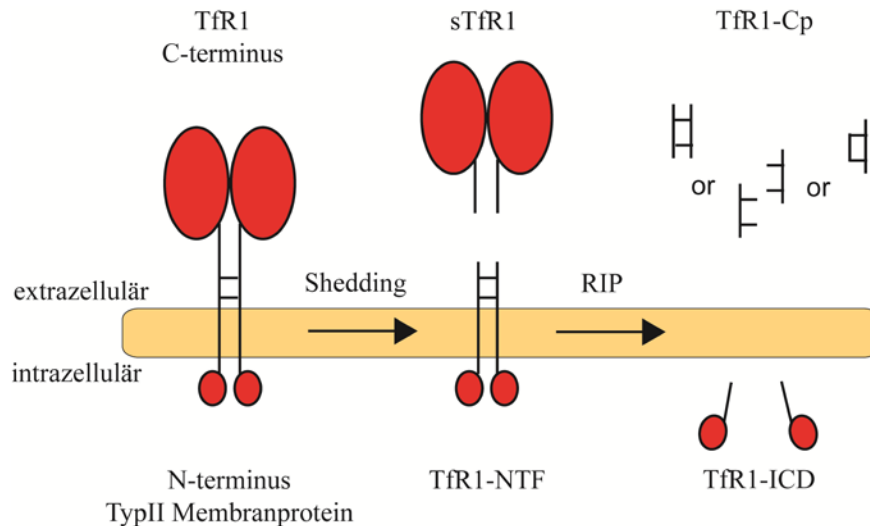


Abbildung 1. Schematische Präsentation des TfR1 Shedding und der potentiellen Fragmente nach einer vermuteten intramembranären Proteolyse. Da die zwei Disulfidbrücken die dimere Form des TfR1-NTF bewahren, können drei mögliche Redoxformen des TfR1-C Peptids (TfR1-Cp) angenommen werden.

Da es für das eventuell entstehende TfR1-Cp keine Antikörper gibt, sollte ein Konstrukt entwickelt werden, welches die ersten 100 AS enthält und N-terminal einen Flag-tag und C-terminal einen V5-tag tragen sollte. Somit wäre es möglich mit Hilfe eines α -Flag Antikörpers die TfR1-ICD in der Zelle nachzuweisen und mittels eines α -V5 Antikörpers die Wiederfindung des eventuell entstehenden TfR1-Cp im Medium der Zellen zu ermöglichen.

Weiterhin sollte bei Vorhandensein des TfR1-Cp ein ELISA etabliert werden, um das TfR1-Cp im Serum von Patienten nachzuweisen und um eventuell eine Korrelation zwischen der TfR1-Cp-Menge im Serum und einem Krankheitsbild zu finden.

Ein weiteres Teilziel dieser Arbeit war die Identifizierung der für die intramembranäre Proteolyse zuständigen Protease sollte ebenfalls durchgeführt werden. Dies sollte mit Hilfe von verschiedenen Inhibitoren geschehen und dem Nachweis einer möglichen Kollokalisierung der Protease mit dem Flag- und V5-getagten TfR1-NTF Konstrukt.

3 MATERIAL

3.1 ALLGEMEINE HINWEISE

Die in der Arbeit verwendeten, geschützten Warenzeichen sind nicht als solche gekennzeichnet. Aus dem Fehlen einer Kennzeichnung kann demnach nicht geschlossen werden, dass der entsprechende Produktname frei von Rechten Dritter ist.

Falls für einzelne Methoden und Inkubationsschritte keine Temperatur angegeben wurde, so ist bei Raumtemperatur gearbeitet worden. Alle Lösungen und Puffer wurden – falls nicht anders angegeben – mit ELIX-Wasser aus einer Wasseraufbereitungsanlage der Firma Millipore hergestellt. Dieses Wasser hat einen Reinheitsgrad, der mit bidestilliertem Wasser vergleichbar ist. Die verwendeten Materialien für die Zellkultur und für die molekularbiologischen Methoden waren entweder steril verpackte Einmalartikel oder sie wurden vor ihrer Benutzung in einem Autoklaven bei 120°C für 20 min unter Dampf sterilisiert. Die für die Zentrifugationsschritte angegebenen g-Zahlen beziehen sich auf den mittleren Radius der verwendeten Rotoren.

3.2 GERÄTE

3.2.1 ZELL- UND BAKTERIENKULTUR

- CO₂-Inkubator Modell 311; Forma Scientific (Thermo)
- Einfrierapparatur Nicool LM10; Air Liquide
- Lichtmikroskop Axiovert 25; Zeiss
- Sterile Werkbank Herasafe; Heraeus-Christ
- Stickstofftank zur Lagerung von Zellen M305 CE; Taylor-Wharton
- Warmluftrundsüttler G24 Environmental Incubator Shaker; New Brunswick Scientific

3.2.2 ZENTRIFUGEN

- Kühlzentrifuge Evolution RC 5C; Sorvall
- Tischzentrifuge 5424 R; Eppendorf
- Ultrazentrifuge Optima L 90 K (70.1 Ti-Rotor); Beckman-Coulter
- Zellzentrifuge Megafuge 2.0 R; Heraeus-Christ

3.2.3 *ELEKTROPHORESE UND WESTERNBLOT*

- Blotschüttler Rocky; Fröbel Labortechnik
- Entwicklermaschine Optimax Typ TR; MS Laborgeräte
- Tankblot-Apparatur, Transblot-Cell SD; Bio-Rad
- Vertikal-Elektrophoresesystem für Minigele; C.B.S.

3.2.4 *ELISA*

- Mikropplattenphotometer Spectra MAX 340 PC; Molecular Device
- Mikroplattenschüttler IS98; Wesbart LTD

3.2.5 *SONSTIGE GERÄTE*

- Heizblock DB-3D; Techni DRI-BLOCK
- Horizontal-Elektrophoresesystem Mini Sub Cell GT System; Bio-Rad
- Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer; peQLab
- pH-Meter 320; Mettler Toledo
- Rührer RCT basic; IKA Labortechnik
- Thermocycler Trio-Thermoblock; Biometra
- Vortex Genie2; Scientific Industrie

3.3 *VERBRAUCHSMATERIAL*

- Filterpapier Whatman 3MM; Whatman International Ltd.
- Kosmetiktücher K20; cilan tissue
- Mikroplatteneinsätze Maxi Sorb U16 Module; Nunc
- Nitrocellulosemembran Hybond *enhanced chemiluminescence*; Amersham Biosciences
- PVDF-Membran Immobilon-P^{SQ}; Millipore
- Röntgenfilme Hyperfilm ECL; Amersham Bioscience
- Sterile Einwegmaterialien wie Zellkulturgefäße, Pipetten und Schraubdeckelröhrchen für die Zellkultur; Nunc oder Falcon

3.4 ZELL- UND BAKTERIENKULTUR

- Ampicillin; Sigma
- Blasticidin; PAA
- Clip-Cell 505; New England Biolabs
- Clip-TMR Star; New England Biolabs
- Complete Protease-Inhibitor Mix; Roche Diagnostics
- DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol); Invitrogen
- Difco Trypton-Pepton; Beckton-Dickinson
- DMEM-Medium mit Glutamax (Dulbecco's *modified eagle medium* mit L-Alanyl-L-Glutamin); PAA
- Dulbecco-PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} ; PAA
- *Fetal calf serum*; Biochrom KG
- Hefeextrakt; Roth
- Isopropyl- β -thiogalactopyranosid; Roth
- Penicillin (10 000 U); PAA
- Snap-Cell 505; New England Biolabs
- Snap-TMR Star; New England Biolabs
- Streptomycin (10 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$); PAA
- Trypsin-EDTA (0,25 % w/v Trypsin, 1 mM EDTA); PAA

3.5 CHEMIKALIEN

- Acrylamid Rotiphorese GEL 30; 30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid; Roth
- Agarose NEEO Ultra; Roth
- Brij 58 (Polyethylenglykolhexadecylether); Fluka
- Bromphenolblau; Serva
- Desoxyribonukleotidtriphosphat Mix (je 100 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP); Roche-Diagnostics GmbH
- Magermilchpulver Glücksklee; Nestlé
- β -Mercaptoethanol; Merck
- Natriumdodecylsulfat (SDS); Serva

- NHS-activated Agarose Spin Columns 33 mg; Pierce
- Nonidet P-40 (NP-40); Sigma
- Ponceau S; Sigma
- TEMED (*N,N,N',N'*-Tetramethylethyldiamin); Sigma
- TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin); Merck
- Tris (2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol); Merck
- Triton X-100 (t-Octylphenoxy polyethoxyethanol); Sigma
- Tween 20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat); Sigma
- Wasserstoffperoxid; Merck

3.6 ANTIKÖRPER

3.6.1 PRIMÄRANTIKÖRPER

- Monoklonaler Antikörper aus der Maus (H68.4) gegen die cytoplasmatische Domäne des humanen TfR1; WB: 1:3000; Zymed
- Monoklonaler Antikörper aus der Maus (α -Flag_m) gegen den Flag-tag (DYKDDDDK); WB: 1:1000, IF: 1:300; Sigma
- Monoklonaler Antikörper aus der Maus (α -HA_m) gegen den HA-tag (YPYDVPDYA); WB: 1:1000, IF: 1:100; Roche
- Monoklonaler Antikörper aus der Maus (α -V5_m) gegen den V5-tag (GKPIPPLLGLDST); WB: 1:5000, IP: 1:1000, IF: 1:300; Invitrogen
- Monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen β -Aktin; WB: 1:10000; Sigma
- Polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen (α -Flag_p) gegen den Flag-tag (DYKDDDDK); IF: 1:100; Dianova
- Polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen (α -HA_p) gegen den HA-tag (YPYDVPDYA); IF: 1:100; Sigma
- Polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen (α -V5_p) gegen den V5-tag (GKPIPPLLGLDST); WB: 1:1000, IF: 1:100; Dianova

3.6.2 SEKUNDÄRANTIKÖRPER

- Kaninchen-IgG gegen Maus-IgG, HRP (Meerrettichperoxidase) konjugiert (RAM*); WB: 1:5000; DAKO
- Kaninchen-IgG gegen Maus-IgG, Alexa488 konjugiert (RAM-Alexa488); IF:1:1000; Invitrogen
- Ziege-IgG gegen Kaninchen-IgG, HRP (Meerrettichperoxidase) konjugiert (GAR*); WB: 1:3000; DAKO
- Huhn-IgG gegen Kaninchen-IgG, Alexa594 konjugiert (CAR-Alexa594); IF: 1:1000; Invitrogen

3.7 PROTEASEINHIBITOREN

- 1,10-Phenanthrolin; Merck
- DAPT (N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycin t-butylester); Millipore
- DCI (3,4-Dichloroisocoumarin-Inhibitor); Sigma
- L685,458 (5S)-(t-Butoxycarbonylamino)-6-phenyl-(4R)hydroxyl-(2R)benzylhexanoyl)-L-leu-L-phe-amid); Sigma
- Lactacystein; Boston Biochem
- Epoxomicin; Enzo LifeScience
- (Z-LL)₂-Keton; Calbiochem

3.8 KITS

- *Advanced Protein Assay Reagent*; Cytoskeleton
- *CloneJet PCR Cloning Kit*; Fermentas
- *FuGENE HD Transfection Reagent*; Roche
- *NucleoBond Xtra Midi/Maxi Kit*; Macherey-Nagel
- *Zymoclean Gel DNA Recovery Kit*; Zymo Research, Hiss
- *Zyppy Plasmid Miniprep Kit*; Zymo Research, Hiss

3.9 OLIGONUKLEOTIDE

Die Oligonukleotide wurden von Metabion bezogen und sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 2. Auflistung der in der Arbeit eingesetzten Oligonukleotide.

Oligonukleotid	Sequenz
Start-Flag-TfR1-ICD	5'-ATG GAC TAT AAA GAC GAT GAC GAT AAA ATG ATG GAT CAA GCT A GA TCA GCA TTC TCT-3'
V5-TfR1-NTF rev.	5'-TTA CGT ACT ATC TAG GCC CAG CAA CGG ATT CGG GAT TGG TTT TCC TCT CTC ACA CTC AGT TTT TGG TTC TAC CCC TTT ACA-3'
T7 forw.	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG G-3'
BGH rev.	5'-TAG AAG GCA CAG TCG AGG-3'

4 METHODEN

4.1 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

Die verwendete HEK293-Zelllinie wurde im Brutschrank bei 5 % CO₂, 37°C und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Sämtliche Arbeiten erfolgten unter einer sterilen Werkbank mit steril verpackten Einwegartikeln oder mit Materialien, welche im Wasserdampf bei 120°C sterilisiert wurden. Das verwendete fötale Kälberserum (FCS) wurde vor Gebrauch durch Hitze inaktiviert (56°C, 30 min).

4.1.1 KULTIVIERUNG VON HEK293 ZELLEN

Die Kultivierung der embryonale Nierenzelllinien HEK293 erfolgte auf Gewebekulturplatten in DMEM-Medium (DMEM-Medium mit Glutamax; 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 10 % FCS). Für weitere Versuche oder zum Umsetzen von Zellen wurden die Zellen mit Dulbecco-PBS^{-/-} gewaschen und mit Trypsin-EDTA behandelt. Durch leichtes Klopfen wurden die Zellen abgelöst und in 3 ml Medium aufgenommen, für die Weiterkultivierung wurden die Zellen 1:10 verdünnt. Sollte nur eine definierte Anzahl von Zellen ausgesät werden, wurde die Zelldichte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die gewünschte Zellkonzentration eingestellt. Das Medium wurde in der Regel alle drei Tage erneuert.

4.1.2 *EINFRIEREN UND AUFTAUEN VON ZELLEN*

Einfriermedium: 70 % Kulturmedium; 20 % FCS; 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO)

Zum Einfrieren wurden 5×10^6 Zellen in 1 ml Einfriermedium ohne DMSO aufgenommen, 900 μ l der Zellsuspension wurde in ein Kryoröhrchen überführt, indem 100 μ l DMSO vorgelegt wurden. Nach kurzem Schütteln wurde das Kryoröhrchen in der Einfrierapparatur Nicool (30 min auf Stufe 3, 10 min auf Stufe 10) langsam abgekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zur Rekultivierung wurden die Zellen zügig in einem 37°C-Wasserbad aufgetaut, in Medium (10 ml, 37°C) resuspendiert und zentrifugiert ($200 \times g$, 5 min) und schließlich in Kulturmedium aufgenommen und auf Gewebekulturplatten gegeben.

4.1.3 *TRANSFEKTION VON HEK293-ZELLEN*

Die stabile Transfektion der HEK293-Zellen erfolgte mit dem Transfektionsreagenz Fugene HD. Hierzu wurden 7×10^5 Zellen/Vertiefung in einer 6-Vertiefungsschale ausgesät. Das Transfektionsreagenz wurde nach Anleitung des Herstellers eingesetzt, in der Regel wurden 5 μ l Fugene in 100 μ l serumfreien Medium verdünnt und anschließend 2 μ g DNA hinzu pipettiert. Nach einer 15-minütigen Inkubation wurde die gesamte Lösung auf die Zellen vorsichtig getropft. Die transfizierten Zellen wurden nach 24 h zur Selektion mit Blasticidin (45 μ g/ml) in Kulturmedium umgesetzt, zudem wurden sie jeden zweiten Tag mit frischem blasticidinhaltendem Medium umgesetzt. Die Selektion mit Blasticidin erfolgte für 14 Tage.

Für eine transiente Transfektion wurde 11,1 μ l (0,45 mg/ml) Polyethylenimin (PEI) pro 1 μ g DNA verwendet, für eine 30-mm-Schale wurde 22,2 μ l PEI in 100 μ l Medium verdünnt und anschließend 2 μ g DNA hinzu pipettiert. Der Ansatz wurde für 30 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und vorsichtig auf die Zellen getropft. Die Expression der Proteine wurde nach 24 h oder 48 h im Zelllysate mittels Immunoblot oder auf Deckgläschen mittels Immunfluoreszenz überprüft.

4.1.4 *IMMUNFLUORESCENZ VON HEK293-ZELLEN*

Deckblättchen wurden in Ethanol getaucht, abgeflammt und in 30-mm-Schalen gelegt. Damit die Zellen auf den Deckblättchen anwachsen, wurde 2 ml Poly-L-Lysin (1:10) in

H₂O zugegeben und inkubiert (2 h, RT). Nach zweimaligen Waschen mit Dulbecco's PBS^{-/-} wurden 1×10^6 Zellen ausgesät. Nach 24 h erfolgte entweder eine transiente Transfektion und 24 h oder 48 h später die Immunodetektion. Für die Färbung der Clip/Snap-Labels wurde nach Anleitung des Herstellers gearbeitet. Die Zellen wurden mit 1 ml des Mastermixes (Snap-Cell 505 5 μ M und Clip-Cell TMR Star 3 μ M oder Clip-Cell 505 5 μ M und Snap-Cell TMR Star 3 μ M) inkubiert (30 min, 37°C, 5 % CO₂), anschließend zweimal mit Dulbecco's-PBS^{+/+} gewaschen und für weitere 5 min mit Dulbecco's-PBS^{+/+} inkubiert (37°C, 5 % CO₂) und wiederholt zweimal mit Dulbecco's-PBS^{+/+} gewaschen. Die Zellen wurden schließlich mit Methanol fixiert (2 ml -20°C Methanol, 10 min, -20°C) und erneut mit Dulbecco's-PBS^{+/+} gewaschen. Die Deckblättchen wurden in 10 μ l DAPI-enhaltendem Einbettmedium eingebettet.

Für die Färbung der Proteine mit Antikörpern wurden die Zellen mit Formaldehyd (4 % Formaldehyd, 30 min, RT) fixiert, mit Glycin (200 mM, 5 min) neutralisiert und anschließend mit Dulbecco's-PBS^{-/-} zweimal gewaschen. Die Antikörperfärbung erfolgte nach dem Blockieren mit 1 % Ziegen Serum in PBS (30 min), die Antikörper wurden in 0,1 % Ziegen Serum in PBS verdünnt, dabei wurde die Antikörper wie folgt eingesetzt; α -Flag_m 1:300, α -V5_m 1:100 und α -HA_p 1:100. Die monoklonalen Antikörper waren aus der Maus, während der polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen stammt. Als Zweitantikörper wurden RAM-Alexa488 und CAR-Alexa594 (jeweils 1:1000) verwendet, zudem wurde DAPI (1:1000) zur Kernfärbung eingesetzt. Beide Antikörperinkubationen erfolgten für jeweils eine Stunde. Die Deckgläschen wurden zwischen beiden Antikörperinkubationen und anschließend fünfmal mit PBS gewaschen, zudem wurde nach der Zweitantikörperbehandlung mit Wasser und dann mit 100 % Ethanol gewaschen. Zum Schluss wurden die Deckgläschen auf einem Kosmetiktuch getrocknet und in 10 μ l Einbettmedium eingedeckelt.

4.2 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN

4.2.1 LYSE VON ZELLEN

Die zu solubilisierenden Zellen wurden zweimal mit eiskaltem Dulbecco's-PBS^{-/-} gewaschen und anschließend auf Eis in Solubilisierungspuffer (1 % TritinX-100 in PBS, 1 \times Complete Proteaseinhibitor) abgelöst und für mindestens 30 min bei 4°C geschüttelt. Zur Abtrennung der unlöslichen Bestandteile erfolgte ein Zentrifugationsschritt

(16.200 × g, 30 min, 4°C). Der Überstand des Lysats wurde für weitere Experimente verwendet.

4.2.2 KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON PROTEINEN

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von aufgereinigten oder solubilisierten Proteinen oder Peptiden erfolgte mit Hilfe des *Advanced Protein Assay Reagent Kits* von Cytoskeleton. Es wurden 10 µl Proteinlösung zu 200 µl des Färbereagenzes gegeben und durch mehrfaches Pipettieren gemischt. Die Absorption wurde sofort bei $\lambda=595$ nm am Mikropplatten-Photometer gemessen. Mit Hilfe von zusätzlich gemessenen Proteinstandards (BSA) wurde die Konzentration der Proteinlösung bestimmt.

4.2.3 GELELEKTROPHORESE

4.2.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Laufpuffer	:	192 mM Glycin; 20 mM Tris; 0,1 % (w/v) SDS
4 × Probenpuffer n. red.	:	0,25 M Tris; 40 % (v/v) Glycerol; 8 % (w/v) SDS; 0,004 % (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8
4 × Probenpuffer red.	:	wie 4 × PP n.red jedoch + 8 % (v/v) 2-Mercaptoethanol
Trenngelpuffer	:	1,5 M Tris; pH 8,8; 0,4 % (w/v) SDS
Sammelgelpuffer	:	0,5 M Tris; pH 6,8; 0,4 % (w/v) SDS
Acrylamidmix	:	30 % Acrylamid; 0,8 % Bisacrylamid

Die SDS-PAGE wurde im CBS-Gelkammersystem nach der Methode von Laemmli (88) durchgeführt. Abhängig von dem zu analysierenden Protein wurden für die Auftrennung 10%ige oder 12%ige Trenngele und 4,5%ige Sammelgele verwendet.

Tabelle 3. Ansätze für Trenn- und Sammelgele.

Reagenz	10 % Trenngel	12 % Trenngel	4,5 % Sammelgel
Wasser	1770 µl	1488 µl	800 µl
Trenngelpuffer	1062 µl	1062 µl	—
Sammelgelpuffer	—	—	333 µl
Acrylamidmix	2124 µl	1700 µl	200 µl
10 % APS	30 µl	30 µl	10 µl
TEMED	3 µl	3 µl	3 µl

Die Proben wurden mit einem Drittel ihres Volumens 4 × SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min im Wasserbad gekocht. Zusätzlich zu den Proben wurde *Prestained Protein-Marker* (Fermentas) zur Bestimmung der Molekülmasse aufgetragen. Die Trennung der Proteingemische erfolgte in Laufpuffer für 45–60 min mit 200 V und 30 mA pro Gel.

4.2.3.2 Tricin-SDS-PAGE

Kathodenpuffer 10× : 1 M Tris; 1 M Tricine; 1 % SDS; pH 8,25

Anodenpuffer 10× : 1 M Tris; 0,225 M HCl; pH 8,9

Gelpuffer 3× : 3 M Tris; 1 M HCl; 0,3 % SDS; pH 8,45

Acrylamidmix : 30 % Acrylamid; 0,8 % Bisacrylamid

Diese Methode beruht auf einem Tricin-Tris-Puffersystem nach Schägger (89) und wird für die Auftrennung von sehr kleinen Proteinen verwendet. Es wurde das CBS-Gelkammersystem benutzt.

Tabelle 4. Pipettierschema für Tricin-SDS-PAGE.

Reagenz	16 % Trenngel	Sammelgel
Acrylamidmix	2268 µl	180 µl
Gelpuffer 3×	1416 µl	400 µl
Glycerol	337 µl	—
Wasser	229 µl	620 µl
10 % APS	30 µl	10 µl
TEMED	3 µl	3 µl

Die Proben wurden mit einem Drittel ihres Volumens 4 × SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min im Wasserbad gekocht. Zusätzlich zu den Proben wurde *Lowrange Protein-Marker* (Fermentas) zur Bestimmung der Molekülmasse aufgetragen. Die Trennung der Proteingemische erfolgte in 1 × Anoden- und Kathodenpuffer für 90–120 min mit 200 V und 35 mA pro Gel für 1 h und 40 mA pro Gel für die weitere Zeit.

4.2.4 WESTERNBLOT UND IMMUNODETEKTION

Nassblotpuffer	: 25 mM Tris; 192 mM Glycin; 10 % (v/v) Ethanol
PBSB _{0,2}	: PBS mit 0,2 % (w/v) Brij58
Magermilchlösung	: PBSB _{0,2} mit 5 % (w/v) Magermilch
Chemilumineszenzlösung	: 1 ml Lösung A (250 mg/l Luminol; 0,1 M Tris (pH 8,6)); 100 µl Lösung B (1,1 mg/ml para-Coumarinsäure in DMSO); 1 µl 30 % (v/v) Wasserstoffperoxid

Für den immunologischen Nachweis von Proteinen wurden diese nach Auftrennung mit der SDS-PAGE oder der Tricin-SDS-PAGE auf eine Nitrozellulosemembran oder eine PVDF-Membran übertragen. Der Transfer erfolgte mittels Nassblotverfahren. Die PVDF-Membran wird vor Benutzung für 1 min mit 100 % Methanol aktiviert, anschließend in Wasser gewaschen und für 10 min in Nassblotpuffer äquilibriert. Das Gel und die gleich großen Filterpapiere wurden ebenfalls in Nassblotpuffer vorinkubiert. Ausgehend von der Anode wurde der Blot wie folgt zusammengebaut: Filterpapier (2×), Gel, Membran, Filterpapier (2×). Der Transfer erfolgte je nach Proteingröße für 30–60 min bei 50 Volt.

Nach dem erfolgreichen Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte die Immundetektion. Die Membran wurde für 30 min mit 20 ml Magermilchlösung inkubiert, um unspezifische Antikörperbindung mit der Membran zu blockieren. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper auf einem Kippeschüttler (1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C). Nach dreimaligem Waschen mit PBSB_{0,2} für jeweils 5 min auf dem Kippeschüttler, um den nicht-gebundenen Primärantikörper zu entfernen, wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper (verdünnt in 10 ml Magermilchlösung) für 1 h auf dem Kippeschüttler inkubiert. Nicht-gebundener Sekundärantikörper wurde durch mehrmaliges Waschen mit PBSB_{0,2} (6×, 15 ml, je 5 min) entfernt. Daraufhin wurde die Membran für 2 min mit der Chemilumineszenzlösung inkubiert und mit einem Filterpapier wieder getrocknet. Nachdem die Membran in eine Folie und dann in eine lichtundurchlässige Filmkassette gelegt wurde, wurde in der Dunkelkammer ein unbelichteter Film auf die Membran gelegt. Die Belichtungszeit für den zweiten Film variierte abhängig von der erhaltenen Signalstärke des ersten Films.

4.2.5 STRIPPING

Stripping-Puffer: 62,5 mM Tris (pH6,7); 2 % (w/v) SDS; 100 mM β -Mercaptoethanol

Um auf einer bereits mit Primär- und Sekundärantikörper behandelten Nitrozellulose- oder PVDF-Membran andere Proteine nachzuweisen, müssen die bereits gebundenen Antikörper wieder abgelöst werden. Dazu wurde die Membran kurz in Wasser gespült und die Antikörper durch die anschließende Inkubation mit dem *Stripping*-Puffer (30 min, 56°C) entfernt. Nach mehrmaligem Waschen mit Wasser wurde die Membran erneut mit der Magermilchlösung und den neuen Antikörpern inkubiert.

4.2.6 IMMUNPRÄZIPITATION

Alle Inkubationen erfolgten bei 4°C auf einem Überkopfschüttler. Nach jedem Inkubations- und Waschschrift wird die ProteinA-Sepharose bei $1000 \times g$ für 1 min abzentrifugiert.

4.2.6.1 Immunpräzipitation des TfR1-C-Peptids aus Zellkulturüberständen

Das Zellkulturmedium der zu untersuchenden HEK293-Zellen wurde von den Zellen abgenommen und zentrifugiert ($200 \times g$, 5 min), um die eventuell vorhandenen zellulären Überreste zu entfernen. Zum Medium wurde 1 μg α -V5_m Antikörper zugegeben und für 2 h oder über Nacht inkubiert, anschließend wurden 25 μg ProteinA-Sepharose zugegeben und für eine weitere Stunde inkubiert. Die Sepharose wurde mit den an ihr gebundenen Antikörpern und dem Peptid abzentrifugiert und dreimal mit PBSX_{0,1%} gewaschen und entweder für die MALDI-TOF-MS Detektion oder für den Western Blot eingesetzt.

4.2.6.2 Immunpräzipitation aus Zelllysaten

Das Zelllysat wurde mit 2 μg α -Flag_m oder α -TfR1 (H68.4) Antikörper versetzt und für 2 h im Überkopfschüttler inkubiert, anschließend mit 25 μg ProteinA-Sepharose versetzt und für eine weitere Stunde im Überkopfschüttler inkubiert. Die ProteinA-Sepharose wurde abzentrifugiert und einmal mit PBS, dreimal mit PBSX_{1%} und zweimal mit Wasser gewaschen. Durch Zugabe von $2 \times$ SDS-Probenpuffer und 5 min Kochen wurden die Immunkomplexe von der Sepharose gelöst, anschließend in der SDS-PAGE aufgetrennt und schließlich im Immunoblot analysiert.

4.2.7 MEMBRANLYSATPRÄPARATION

- Hypertonpuffer : 10 mM Tris (pH 7,4); 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1 × Complete Proteaseinhibitor
- Basispuffer : 50 mM Tris (pH 7,8); 50 mM Kaliumacetat; 2 mM Magnesiumacetat; 125 mM Sucrose; 1 mM DTT

Die Angaben sind ausgehend von einer 6 cm Schale HEK293 geschrieben, bei größeren Schalen wurden die Angaben hochgerechnet. Die Membranpräparation wurde auf Eis durchgeführt. Es wurden 800 µl Hypertonpuffer auf das Zellpellet gegeben und gut gevortext. Die Proben wurden für 10 min auf Eis gestellt, und die Zellen mit einer 1 ml Spritze und einer 0,6 mm Kanüle 15 × aufgezo-gen und herausgepresst. Zwischen den einzelnen Proben wurden Spritze und Kanüle dreimal mit Wasser gespült. Die Proben wurden zentrifugiert (4000 × g, 5 min) und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß (1,5 ml) überführt. Nachdem der Überstand erneut zentrifugiert wurde (16.200 × g, 45 min), wurde das Zellpellet (Membranen) in 30 µl Basispuffer resuspendiert. Für einen Assay wurden 20 µl verwendet und für 30 min bei 37°C in einem Thermoschüttler bei 150 × g inkubiert. Um die Lipide aus den Membranen zu entfernen und die Proteine so besser in der SDS-PAGE auftrennen zu können, wurde 120 µl Chloroform/Methanol (1:2) zugegeben, für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (16.200 × g, 20 min, 4°C). Das Pellet wurde in 25 µl 2× SDS-Probenpuffer gründlich resuspendiert und für 10 min bei 65°C auf einem Thermoschüttler bei 1400 rpm inkubiert. Die Proben wurden anschließend vollständig auf das SDS-Gel aufgeladen, aufgetrennt und im Immunoblot detektiert.

4.2.8 MALDI-TOF-MS

Für die Detektion des TfR1-Cp wurde die Sepharose (4.2.6.1) dreimal mit PBS und dreimal mit 50 mM Ammoniumacetat gewaschen; abzentrifugiert wurde nach jedem Waschschrift (1000 × g, 3 min, 4°C). Das TfR1-Cp wurde mit 50 % Essigsäure eluiert, das Eluat wurde in einer Centrivac-Zentrifuge eingedampft und einmal mit Wasser gewaschen und wieder eingedampft. Die Proben wurden in 5 µl Wasser aufgenommen, 0,5 µl der Probe wurden mit 0,5 µl 2-Cyano-4-Hydroxyzimtsäure Matrix (1 mg/ml in 70 % Acetonitril/0,1 % Trifluoressigsäure) gemischt und auf den Proben-teller der MALDI-TOF-MS gegeben und luftgetrocknet, wobei sich die Probenmoleküle in das Kristallgitter der Matrix

einbauen. Das MALDI-TOF-Massenspektrum wurde mit Hilfe eines Ultraflex III Massenspektrometer aufgenommen, das mit einem Smartbeam Laser und einer LIFT-MS/MS Anlage ausgerüstet war. Die Kalibrierung wurde mit einem Peptidstandardmix durchgeführt. Die Analysen wurden mit Hilfe des FindPept von ExPASy durchgeführt (<http://web.expasy.org/findpept/>). Die Bedienung des Massenspektrometers erfolgte durch Dr. Matthias Kaup, Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Pathobiochemie, Charité – Universitätsmedizin Berlin.

4.2.9 ANTIKÖRPERAUFRÄUENIGUNG

Elutionspuffer	:	100 mM Glycin pH 4,5; pH 3,5; pH 2,5
Neutralisierungspuffer	:	40 mM Tris pH 11; pH 9,0; pH 8,0
Quenchingpuffer	:	1 M Ethanolamin
Kopplungs-/Waschpuffer	:	100 mM Natriumphosphat; 150 mM NaCl; pH 7,2 (PBS)

Das Kaninchenserum (10 ml) wurde mit ProteinA-Sepharose (1 ml), welche vorher mit PBS (fünfmal, 10 ml) gewaschen wurde, über Nacht im Überkopfschüttler 4°C inkubiert. Die Mischung wurde über eine Säule gegeben und mit PBS gewaschen (fünfmal, 10 ml), die Elution erfolgte mit den drei verschiedenen Elutionspuffern (900 µl, pH 4,5, pH 3,5, pH 2,5), die Neutralisierung erfolgte sofort mit dem Neutralisierungspuffer (900 µl). Nach Proteinbestimmung wurden die Fraktionen gepoolt.

Für die Kopplung des TfR1-Cp an die NHS-aktivierte Agarose wurde das TfR1-Cp (400 µg/ml in PBS) mit der NHS-aktivierten Agarose (33 mg) im Überkopfschüttler inkubiert (über Nacht, 4°C). Nach Zentrifugation (1000 × g, 1 min) wurde die Agarose mit dem Kopplungspuffer gewaschen (dreimal, 1,5 ml) und erneut zentrifugiert (1000 × g, 1 min). Die verbleibenden aktiven Stellen in der Agarose wurden mit Hilfe des Quenchingpuffers (1,5 ml, 15-20 min, RT, Überkopfschüttler) blockiert und anschließend abzentrifugiert (1000 × g, 1 min), die Agarose wurde dreimal mit dem Waschpuffer gewaschen. Für die Lagerung wurde die Säule in 0,05 % Natriumazid in PBS gewaschen und aufrecht bei 4°C gelagert. Vor Verwendung wurde die Säule dreimal mit 10 ml PBS gewaschen.

Die gepoolten Fraktionen aus der Aufreinigung über ProteinA-Sepharose wurden anschließend über die mit TfR1-Cp gekoppelte NHS-Agarose gegeben und mit Elutionspuffer eluiert und mit Neutralisierungspuffer neutralisiert. Nach einem Bindungsassay

mittels ELISA wurden die an TfR1-Cp bindenden Fraktionen gepoolt und in 25%iger PEG-Lösung (8000) eingeengt.

4.2.10 ENZYMGEKOPPELTER IMMUNADSORPTIONSTEST

Blockierungslösung	:	3 % Rinderserumalbumin; 10 % fetales Kälberserum in PBS; vor Gebrauch steril filtrieren
Citratpuffer	:	40 mM Natriumcitrat/KOH pH 3,95
Färbelösung	:	10 ml Citratpuffer; 100 µl TMB-Lösung; 3 µl 30 % iges Wasserstoffperoxid; vor Gebrauch frisch ansetzen und filtrieren
PBST	:	0,05 % Tween-20 in PBS
Stopplösung	:	2 M Schwefelsäure
TMB-Lösung	:	200 mg Tetramethylbenzidin in 10 ml Ethanol/Dimethylsulfoxid 1:1 (v/v); vor Gebrauch steril filtrieren

Der ELISA (*enzyme-linked immunoabsorbent assay*) stellt eine sensitive und schnelle Methode dar, um bestimmte Proteine aus einem Proteingemisch heraus zu quantifizieren. Ein Antikörper gegen das zu quantifizierende Protein oder ein entsprechender Bindungspartner werden an eine feste Platte gebunden („*coating*“) und das gesuchte Protein aus der Testlösung in einem zweiten Schritt an diesen Antikörper gebunden. Das gebundene Protein wird in einem dritten Schritt entweder mit einem weiteren Antikörper, der mit einer Meerrettichperoxidase (HRP) verknüpft wurde, markiert oder der gesamte Immunkomplex wird mit einem Sekundärantikörper, der mit einer HRP verknüpft ist, in einer Farbreaktion nachgewiesen.

Um das TfR1-Cp im Serum detektieren zu können, wurde ein Sandwich-ELISA entwickelt. Dafür wurde der in Kaninchen generierte polyklonale Antikörper gegen das TfR1-Cp verwendet. Eingesetzt wurde entweder der über ProteinA-Sepharose gereinigte Antikörperpool (α -Cp Pool), von dem ein Teil auch an eine HRP gekoppelt wurde (α -Cp Pool-HRP), oder der über NHS-TfR1-Cp-Sepharose affinitätsgereinigte TfR1-Cp-Antikörper (α -TfR1-Cp AK). Das TfR1-Cp oder das biotinylierte TfR1-Cp wurden vor Gebrauch in PBST verdünnt. Die Detektion erfolgte mit dem α -Cp Pool HRP (1:1000), einem GAR* (1:3000) oder einem Streptavidinantikörper gekoppelt mit HRP (1:20.000), dabei wurden die Antikörper in PBST verdünnt. Nach jedem Inkubationsschritt außer nach dem Färbeschritt wurde dreimal mit Hilfe einer Mehrkanalpipette mit 200 µl PBST

gewaschen, 5 min inkubiert und erneut dreimal gewaschen, Diese Kombination wurde jeweils dreimal wiederholt. Das erhaltene Farbsignal wurde mit einem Mikroplattenphotometer bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenz 492 nm) gemessen. Alle Bestimmungen wurden in der Regel als Vierfachmessung durchgeführt. Die Durchführung der ELISAs wurde in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5. ELISA-Standardschema.

Inkubation	Zeit [min]	Volumen [µl]	Substanz	Verdünnung
Beschichtung	120/ über Nacht	100	TfR1-Cp-Biotin/ Antikörperpool/ TfR1-Cp-AK	Ca. 200 ng
Blockieren	30	200	Blockierungslösung	
Ligand	120	100	TfR1-Cp/ Serum/ Antikörperpool/ TfR1-Cp-AK	Abhängig vom Versuch
1. Antikörper	60	100	TfR1-Cp-AK/ TfR1-Cp-AK + TfR1-Cp-Biotin	1:10.000
2. Antikörper	60	100	Antikörperpool/ Streptavidin-HRP	1:1000 / 1:20.000
Färbelösung	nach Sicht	100	TMB-Färbelösung	
Stopplösung	< 60	+50	Stopplösung	

4.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

4.3.1 AGAROSEGELELEKTROPHORESE

- TAE : 40 mM Tris/Essigsäure; 1 mM EDTA
 6 × DNA-Probenpuffer : 60 % (w/v) Saccharose; 20 mM EDTA;
 0,02 % (w/v) Bromphenolblau
 EtBr-Lösung : 1 % (w/v) Ethidiumbromid

Die Agarose (1–2 % (w/v) je nach Größe der DNA-Fragmente) wurde durch Erhitzen in 50 ml TAE-Puffer gelöst und nach Abkühlung auf ca. 55°C mit 1 µl EtBr-Lösung versetzt. Die Proben wurden mit einem Fünftel ihres Volumens an DNA-Probenpuffer versetzt und im Agarosegel aufgetrennt. Zur Größenbestimmung wurden zusätzlich 5 µl des Markers (1 kb Plus DNA ladder) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für 30 min bei 100 Volt, anschließend wurde eine Aufnahme des Gels unter UV-Licht gemacht.

4.3.2 RESTRIKTIONSVERDAU

DNA-Spaltungen mittels Restriktionsverdauendonukleasen erfolgten in der Regel in 30 µl Ansätzen in den vom Hersteller mitgelieferten enzymespezifischen Puffern. Pro µg DNA wurde 1 U Enzym je Schnittstelle eingesetzt. Die Inkubation erfolgte bei den empfohlenen Temperaturen für 3–16 h.

4.3.3 ISOLIERUNG VON DNA AUS AGAROSEGELEN

Die gewünschten DNA-Fragmente wurden mit Hilfe eines Skalpells aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mittels des *Zymoclean Gel DNA Recovery Kit* (3.8) aufgereinigt. Die Elution erfolgte mit 30 µl Elutionspuffer oder Wasser.

4.3.4 LIGATION VON DNA-FRAGMENTEN

Zur Ligation eines linearisierten Vektors (20–50 ng) mit einem DNA-Fragment (Insert, 3–10facher molekularer Überschuss gegenüber dem Vektor) wurde beides zusammen auf Eis gemischt. Nach Zusatz von Wasser und des zur T4-Ligase mitgelieferten Ligasepuffers, welcher vorher vorsichtig erwärmt und gemischt wurde, wurde die T4-Ligase zum Ansatz gegeben. Die Inkubation des Ansatzes erfolgte für 16 h bei 16°C und anschließend für 10 min bei 20°C.

4.3.5 TRANSFORMATION VON PLASMID-DNA

LB-Medium : 1 % (w/v) Difco Trypton-Pepton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt;
1 % (w/v) NaCl; pH 7,0
Antibiotikazusätze: Ampicillin 100 µg/ml

LB-Agar : 1,5 % (w/v) Select-Agar in LB-Medium
Antibiotikazusätze: Ampicillin 50 µg/ml

Die Transformation beschreibt die Aufnahme von Plasmid-DNA in kompetente *Escherichia coli*-Zellen (*E. coli*). Die Transformation erfolgte nach der Methode von Hanahan et al. (90). Dabei wurde die Membran der Bakterien durch einen Hitzeschock für die Aufnahme von Plasmid-DNA durchlässig gemacht. Von der aufgereinigten Plasmid-DNA wurden 0,5 µl in 50 µl kompetente *E. coli*-Zellen gegeben und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock (90 s, 42°C), gefolgt von einer 2 minütigen Inkubation auf Eis. Zu den transformierten Zellen wurden 300 µl LB-Medium

gegeben und der Ansatz für 30 min bei 37°C inkubiert. Der Transformationsansatz wurde auf einer LB_{Amp}-Platte (LB_{Amp}-Agar in Petrischale) ausplattiert oder zum Animpfen in einer Übernachtskultur verwendet.

4.3.6 PRÄPARATION VON PLASMID-DNA

Bei den folgenden Lösungen handelt es sich um Komponenten aus dem verwendeten *NucleoBond Xtra Midi/Maxi Kit*.

RES + RNase A	: Resuspensionspuffer
LYS	: Lysispuffer
EQU	: Äquilibrierungspuffer
NEU	: Neutralisierungspuffer
WASH	: Waschpuffer

Um für die Transfektion ausreichend DNA zu erhalten, wurde aus Bakterien Plasmid-DNA im Midiformat präpariert. Das Prinzip der Präparation beruht auf der alkalischen Lyse der Bakterien und der Ethanol-fällung der DNA. Zunächst wurden *E. coli* DH5 α -Zellen mit der DNA transformiert (4.3.5) und in 200 ml LB_{Amp}-Medium über Nacht bei 37°C im Warmluftrundschüttler inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Präparation der DNA mit Hilfe des *NucleoBond Xtra Midi/Maxi Kits* (3.8). Bei einer OD_{578 nm} von 1,8 wurde die Übernachtskultur abzentrifugiert (15 min, 4000 \times g) und das Pellet in 8 ml RES + RNase A resuspendiert. Durch die Zugabe von 8 ml LYS und fünfmaligem Invertieren wurden die Zellen während einer Inkubation von 5 min lysiert. Nach der Zugabe von 8 ml NEU wurde die neutralisierte Lösung über einen Filter geklärt. Die geklärte Lösung wurde auf eine mit 12 ml EQU äquilibrierte Säule (Anionenaustauschersäule, *NucleoBond Xtra Midi/Maxi Kit*, Macherey-Nagel) beladen. Das in dem Filter verbliebene Lysat wurde durch die Zugabe von 5 ml EQU ausgewaschen und ebenfalls auf die Säule aufgetragen. Im Anschluss wurde die Säule mit 8 ml WASH gewaschen und die DNA mit 5 ml ELU eluiert. Um die Plasmid-DNA zu präzipitieren wurde das Eluat mit 3,5 ml Isopropanol versetzt und nach einer zweiminütigen Inkubation zentrifugiert (60 min, 4000 \times g, 4°C). Das Pellet wurde mit 2 ml 70 % igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (10 min, 4000 \times g, 4°C). Das Pellet wurde nach dem Trocknen im Brutschrank (37°C) in 50 μ l MilliQ-Wasser resuspendiert und die Konzentration bestimmt.

4.3.7 *POLYMERASEKETTENREAKTION*

In der Regel wurden in einem Reaktionsansatz von 50 µl zwischen 50 ng und 200 ng DNA, ferner je 10 pmol sequenzspezifische Primer und je 5 pmol dNTPs in dem vom Polymerasehersteller empfohlenem Puffer gemischt und 2 U Phusion Polymerase HF (NEB) hinzugegeben. Die Polymerasekettenreaktion erfolgte nach einem Denaturierungsschritt (1 min, 98°C) in 30 Zyklen mit 10 s Denaturierung bei 98°C und 1 min Primeranlagerung und Strangverlängerung bei 72°C. Im Anschluss wurde der Ansatz noch einmal 5 min bei 72°C polymerisiert und auf 4°C abgekühlt.

4.3.8 *DNA-SEQUENZIERUNG*

Die DNA-Sequenzierung folgt der Kettenabbruchmethode nach Sanger et al. (91), wobei zur Detektion Fluoreszenz markierte ddNTPs eingesetzt wurden.

Plasmid-DNA (ca. 150–200 ng der Plasmidminipräparation), der Sequenzierprimer (10 pmol), Big Dye Terminator Mix (1 µl) und MilliQ-Wasser (Endvolumen 10 µl) wurden gemischt. Die Polymerasekettenreaktion erfolgte nach folgendem Prinzip: 1 min 96°C, 30 × (20 s 96°C, 30 s 50°C, 4 min 60°C), 2 min 60°C und abschließende Abkühlung auf 15°C. Der Sequenzieransatz wurde mit dem *NucleoSEQ* (Macherey-Nagel) nach Anleitung aufgereinigt und direkt in den Sequenzer (Perkin Elmer ABI PRISM 310) gestellt.

5 ERGEBNISSE

5.1 CHARAKTERISIERUNG DES FLAG-TfR1-NTF-V5

Um das Schicksal des N-terminalen Fragments (NTF) des TfR1 nach dem Shedding-Prozess genauer zu untersuchen, wurde mittels einer polymeren Kettenreaktion die cDNA des TfR1, welche für die Aminosäuren 1–100 kodiert, N-terminal mit einem Flag-tag und C-terminal mit einem V5-tag generiert (Abb. 2A). Das Konstrukt wurde anschließend in eine humane embryonale Nierenzelllinie (HEK293) stabil transfiziert (4.1.3) und exprimiert. In Westernblot-Analysen der Zelllysate konnte unter Verwendung eines reduzierenden Probenpuffers eine Bande bei 14 kDa und bei nicht reduzierendem Probenpuffer eine Bande bei 28 kDa gezeigt werden (Abb. 2B). Dies weist daraufhin, dass das TfR1-NTF als über Disulfidbrücken verbundenes Dimer vorliegt, da es sich bei der 14 kDa Bande um die Monomer- und die 28 kDa Bande um die Dimerbande handelt. Die Lokalisierung und die Orientierung des Flag-TfR1-NTF-V5 Konstrukts in der Zelle wurden mit Hilfe von α -Flag_m und α -V5_m Antikörpern in der Immunfluoreszenz nachgewiesen. Die mit dem Konstrukt transfizierten HEK293-Zellen wurden auf Deckblättchen ausgesät und fixiert (4.1.4). Bei den unpermeabilisierten Zellen, die mit dem α -Flag_m behandelt wurden, konnte kein Signal beobachtet werden (Abb. 2C, links oben), während die Behandlung mit dem α -Flag_m in permeabilisierten Zellen Signale in der Plasmamembran und in den Vesikeln der Zellen zeigten (Abb. 2C, links unten). Bei der Behandlung mit dem α -V5_m wurde in nicht permeabilisierten Zellen Signale in der Plasmamembran beobachtet (Abb. 2C, rechts oben), diese Signale konnten auch in den permeabilisierten Zellen gezeigt werden. Das Ergebnis der Immunfluoreszenz zeigt, dass der C-Terminus mit dem V5-tag des Flag-TfR1-NTF-V5 in den extrazellulären Raum weist, während der N-Terminus mit dem Flag-tag in die Zelle weist. In permeabilisierten Zellen wurden Signale in der Plasmamembran und in endozytischen Vesikeln mit dem α -Flag_m und dem α -V5_m beobachtet. Man kann somit schlussfolgern, dass das Flag-TfR1-NTF-V5 Konstrukt in der Zelle in derselben Weise exprimiert und verteilt vorliegt wie das natürliche N-terminale Fragment des TfR1 nach dem Shedding (46). Es liegt als Dimer in der Plasmamembran und in endozytischen Vesikeln vor und weist eine Typ II-Transmembranproteinorientierung auf.

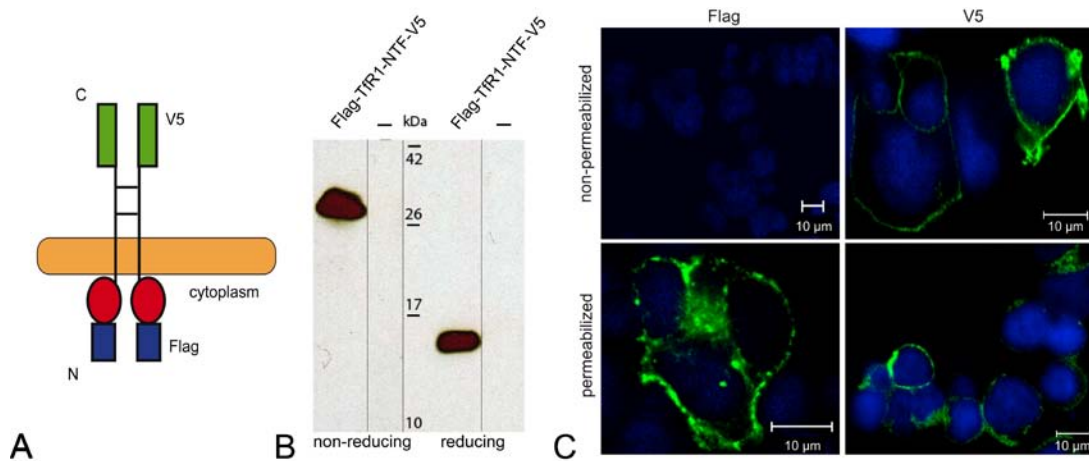


Abbildung 2. Charakterisierung des Flag-TfR1-NTF-V5. A, schematische Darstellung des Flag-TfR1-NTF-V5 Konstrukts. Es wurde N-terminal ein Flag-tag und C-terminal ein V5-tag an die Aminosäuren 1–100 des TfR1, welche das N-terminale Fragment nach dem Ektodomänen-Sheddingprozess darstellen, mittels PCR angefügt. Die grüne Box stellt den V5-tag und die blaue Box den Flag-tag dar, der rote Kreis symbolisiert die intrazelluläre Domäne des TfR1. B, das Flag-TfR1-NTF-V5 nach Expression in HEK293 Zellen erscheint als Dimerbande bei 28 kDa unter nicht reduzierenden Bedingungen (links), während unter reduzierenden Bedingungen eine Monomerbande bei 14 kDa zu sehen ist (rechts). Der Immunoblot wurde mit Hilfe des α -V5_m und des RAM* visualisiert. C, Lokalisierung und Orientierung des Flag-TfR1-NTF-V5 in transient exprimierenden HEK293 Zellen. Die Zellen wurden spezifisch mit dem α -Flag_m oder dem α -V5_m, sowie dem Sekundärantikörper RAM-Alexa-488 angefärbt und visualisiert durch die konfokale Laserscanmikroskopie.

5.2 IDENTIFIZIERUNG DES TfR1-C PEPTIDES UND DER SPALTSTELLE

Mit Hilfe des Flag-TfR1-NTF-V5 wurde nun versucht, das TfR1-C-Peptid (TfR1-Cp) zu identifizieren. Dafür wurde das Konstrukt stabil in HEK293-Zellen transfiziert und das Medium für eine Immunpräzipitation mit dem α -V5_m und der ProteinA-Sepharose verwendet (4.2.6.1), um das eventuell entstehende TfR1-Cp zu detektieren. Im Westernblot konnte unter nicht reduzierenden Bedingungen in Flag-TfR1-NTF-V5 exprimierenden Zellen mit Hilfe des α -V5_p eine Bande bei einer ungefähren molekularen Masse von 4,6 kDa detektiert werden (Abb. 3A, links). Diese Bande wurde nicht in den Kontrollzellen ohne Flag-TfR1-NTF-V5 beobachtet (Abb. 3A, rechts) und weist somit auf das TfR1-Cp hin. Um das Ergebnis aus dem Westernblot zu bestätigen, wurde die TfR1-Cp enthaltene ProteinA-Sepharose aus der Immunpräzipitation für eine Detektion mittels MALDI-TOF-MS mit 50 % Essigsäure eluiert (4.2.8). Die MALDI-TOF-MS Analyse

ergab einen Peak bei 3276 Da (Abb. 3B). Eine Analyse mit dem FindPept-Tool von ExPASy ergab zwei mögliche monomere Peptide, die auf die gefundene Molekularmasse passen. Das erste Peptid wird dabei zwischen dem Phenylalanin (Phe)-81 und dem Methionin (Met)-82 geschnitten und hätte einen um drei Aminosäure verkürzten V5-tag. Das zweite mögliche Peptid wird zwischen dem Glycin (Gly)-84 und dem Tyrosin (Tyr)-85 geschnitten und hätte einen vollständigen V5-tag, aber einen Verlust von zwei Protonen, was auf eine Disulfidbrücke zwischen dem Cystein (Cys)-89 und dem Cys-98 hinweist (Abb. 3C). Um das richtige Peptid zu identifizieren, wurde der Peak mit Hilfe der MALDI-TOF-TOF-MS analysiert (Abb. 4). Unter den dortigen Bedingungen wird unter anderem die Peptidbindung (CO-NH-Bindung) gespalten, wobei b und y Ionen entstehen, die ihre Ladung vom N-Terminus oder vom C-Terminus bekommen.

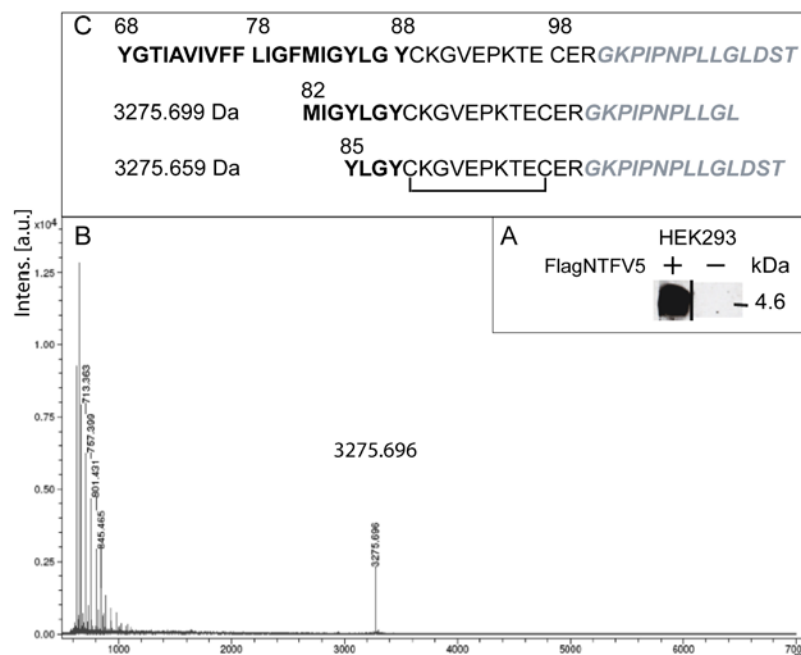


Abbildung 3. Detektion des TfR1-Cp. A, Westernblot des immunpräzipitierten TfR1-Cp. HEK293-Zellen wurden mit und ohne Flag-TfR1-NTF-V5 exprimiert, das TfR1-Cp-V5 wurde unter nicht-reduzierenden Bedingungen immunpräzipitiert. Anschließend über ein 16%iges Tricin-SDS-Gel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und mit dem α -V5_p bei einer molekularen Masse von 4,6 kDa nachgewiesen. B, das unter nicht-reduzierenden Bedingungen immunpräzipitierte TfR1-Cp-V5 wurde in der MALDI-TOF-MS analysiert und ergab einen Peak bei 3275,696 Da. C, in der ersten Zeile ist die Sequenz der Transmembranregion (fett), des *stalk* (normal) und des V5-tags (grau kursiv) mit der Aminosäurenummer dargestellt. Mit Hilfe des FindPept Werkzeuges von ExPASy konnten zwei mögliche Peptide innerhalb dieser Sequenz identifiziert werden, welche der Peakmasse entsprechen (zweite und dritte Zeile).

zwischen dem Gly-84 und dem Tyr-85 stattfindet. Zudem liegt eine Disulfidbrücke zwischen dem Cys-89 und dem Cys-98 vor, welche den Protonenverlust erklärt. Folglich konnte mit Hilfe des MALDI-TOF-TOF-MS gezeigt werden, dass es sich bei dem TfR1-C Peptid um ein 16 Aminosäure langes Peptid handelt, welches als oxidiertes Monomer vorliegt.

5.3 ANTIKÖRPERAUFREINIGUNG

Um endogen freigesetztes TfR1-Cp in Zellkultur mittels Immunpräzipitation oder in menschlichem Serum mittels eines zu etablierenden Sandwich-ELISAs nachzuweisen, benötigt man Antikörper gegen dieses Protein. Da diese natürlich zum Zeitpunkt der erstmaligen Entdeckung des C-Peptids nicht erhältlich waren, sollte ein Antikörper hergestellt werden. Um einen monoklonalen Antikörper zu finden wurde ein Phage Display durchgeführt. Dafür wurden zwei biotinylierte TfR1-C-Peptide mit unterschiedlichen Linkern zwischen Peptidsequenz und Biotin von der Firma JPT bestellt. Dies ist wichtig, um eine unspezifische Bindung der Phagen an die Linkersequenz auszuschließen. Die Durchführung des Phage Displays erfolgte in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe Schirrmann (Universität Braunschweig). Dabei konnte keine Bindung von Phagen zu den biotinylierten TfR1-Cp gefunden werden. Aus diesem Grund wurde anschließend die Firma Open Biosystems (Thermo Scientific) beauftragt, polyklonale TfR1-Cp-Antikörper in Kaninchen zu generieren. Dafür wurden zwei Kaninchen jeweils mit dem nativen 16 Aminosäure langen TfR1-Cp immunisiert. 70 Tage nach der Immunisierung wurden die Kaninchen ausgeblutet, das Serum abgetrennt und zur weiteren Antikörperaufreinigung an unsere Arbeitsgruppe gesendet.

Um das Serum auf TfR1-Cp-Antikörper zu testen, wurden die zwei verschiedenen biotinylierten TfR1-C-Peptide (JPT) für einen Enzymgekoppelten Immunadsorptionstest (ELISA) auf eine Mikroplatte beschichtet und das Serum in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt (Abb. 5). Die blauen Balken symbolisieren das biotinylierte TfR1-Cp 1, während die roten Balken das biotinylierte TfR1-Cp 2 darstellen. Die 1:500 Verdünnung ergab den gleich hohen Absorptionswert wie die positive Beschichtungskontrolle, bei der das Streptavidin-HRP als Nachweis verwendet wurde. Bei steigenden Verdünnungen des Serums ist ein abnehmendes Absorptionssignal zu beobachten. Dies weist auf eine Konzentrationsabhängigkeit hin, zudem ist sogar bei einer Verdünnung von 1:100.000 ein

Signal zu beobachten. Um zu zeigen, dass in nicht mit TfR1-Cp immunisiertem Kaninchenserum keine Antikörper gegen das TfR1-Cp vorhanden sind, wurde nicht immunisiertes Kaninchenserum verwendet und ergab wie in der Kaninchenserumkontrolle in Abbildung 5 zu sehen, wenn überhaupt allenfalls ein sehr geringes Signal. Demnach sind in normalem Kaninchenserum keine Antikörper gegen das TfR1-Cp vorhanden.

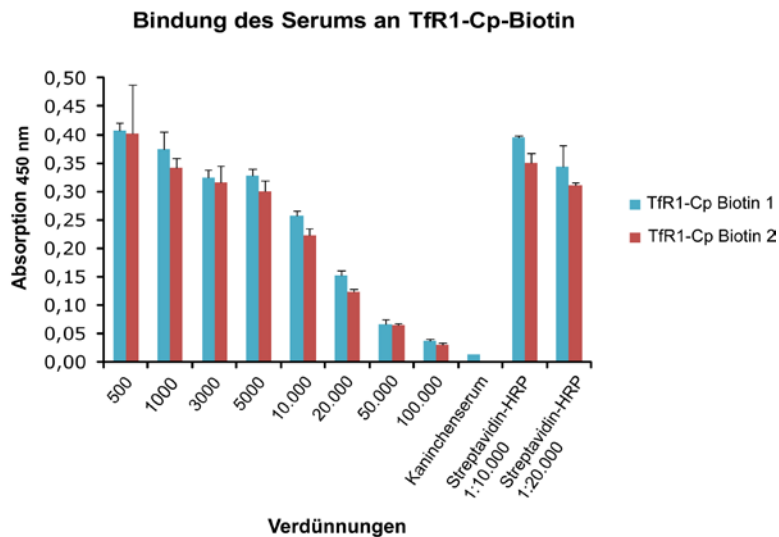


Abbildung 5. TfR1-Cp-Antikörper im Kaninchenserum. Die Mikroplatte wurde mit zwei verschiedenen biotinylierten TfR1-C-Peptiden (je 200 ng) beschichtet. Das Serum wurde in verschiedenen Verdünnungen eingesetzt. Als sekundärer Antikörper wurde GAR* (1:3000) verwendet, für die Beschichtungskontrolle wurde Streptavidin-HRP in den Konzentrationen 1:10.000 und 1:20.000 eingesetzt. Die Daten wurden aus einer Vierfachmessung ermittelt; die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar.

Um sicher zu gehen, dass es sich bei den an TfR1-Cp-Biotin gebundenen Antikörpern im Serum von Abbildung 5 um für das TfR1-Cp spezifische Antikörper handelt, wurde ein kompetitiver ELISA durchgeführt (Abb. 6). Dabei wurde das Serum mit verschiedenen Mengen TfR1-Cp inkubiert und anschließend auf eine Mikroplatte, welche mit dem TfR1-Cp-Biotin beschichtet wurde, gegeben. Antikörper, die spezifisch an das TfR1-Cp binden, sollten anschließend nicht mehr an die mit TfR1-Cp-Biotin beschichtete Mikroplatte binden können. Die Serumverdünnung von 1:20.000 ohne TfR1-Cp-Zugabe ergab den höchsten Absorptionswert von 0,3. bei steigenden TfR1-Cp Mengen zum Serum nimmt die Absorption ab, der Halbmaximalwert wurde bei einer Zugabe von 1500 ng erreicht. Weiterhin ist zu erkennen, dass die Absorptionswerte beim Zusetzen von 2000 ng und 5000 ng wieder ansteigen. Dieses Ergebnis zeigt, dass es sich um eine spezifische Bindung der Antikörper zum TfR1-Cp handelt. Die Zunahme des Signals bei den höchsten

Konzentrationen ist wahrscheinlich mit Seiteneffekten des Testes zu begründen. Zudem könnte die erhöhte TfR1-Cp Menge zu einer Aggregation des TfR1-Cp führen und TfR1-Cp somit nicht mehr als Bindungspartner für die Antikörper zur Verfügung stehen.

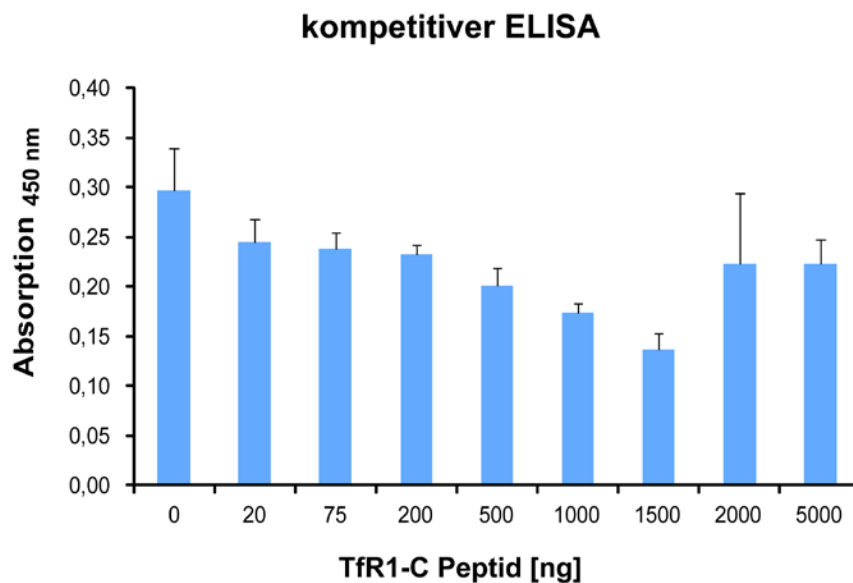


Abbildung 6. Spezifität der Antikörperbindung aus Serum an TfR1-Cp. Das mit TfR1-Cp immunisierte Kaninchenserum wurde auf 1:20.000 verdünnt und mit verschiedenen Mengen TfR1-Cp versetzt und anschließend auf die mit biotinyliertem TfR1-Cp (200 ng) beschichtete Mikroplatte gegeben. Der Nachweis erfolgte mit dem Sekundärantikörper GAR* (1:3000). Die Daten der Abbildung wurden aus einer Vierfachmessung erlangt; die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Zur Aufreinigung der TfR1-Cp Antikörper aus dem Kaninchenserum wurde das Serum über eine ProteinA-Sepharose Säule gegeben. Dabei binden die IgG-Antikörper des Kaninchens an die Säule und wurde zuerst mit Hilfe von 100 mM Glycin pH 2,5 eluiert und sodann mit 1 M Tris (pH 9,0) auf einen pH von 7,0 eingestellt. Nach einer Proteinbestimmung wurden die ersten drei Fraktionen gepoolt, dies führte jedoch zu einer Trübung der Lösung, auch eine Zugabe von PBS führte nicht zu einer Klärung. Zur Lösung des Problems wurde mit 900 µl 100 mM Glycin in 900 µl 40 mM Tris eluiert, so dass eine Lösung von 50 mM Glycin und 20 mM Tris (1800 µl) entsteht. Dabei wurden unterschiedliche pH-Werte verwendet, nacheinander pH 4,5, pH 3,5 und pH 2,5. Die Proteinbestimmung ergab bei einem pH von 3,5 die höchste Konzentration in den ersten drei Fraktionen. Diese wurden zusammen mit den Fraktionen 4 und 5 der pH-4,5-Elution gepoolt (α -Cp Pool) und für die Affinitätsreinigung über eine Streptavidin-Agarose gegeben, an welche vorher TfR1-Cp-Biotin gebunden wurde. Die Elution erfolgte wieder

schrittweise mit einer pH-Änderung von 4,5 über 3,5 zu 2,5. Interessanterweise konnte im Eluat kein Protein nachgewiesen werden, aus diesem Grund wurden die Fraktionen auf die TfR1-Cp Bindung im ELISA getestet. In Abbildung 7 ist das Ergebnis der Messung als Balkendiagramm dargestellt. Bei den ersten Fraktionen handelt es sich um die Elution der ProteinA-Sepharose, welche in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt wurde. Dabei ist der größte Absorptionswert in der Elutionsfraktion 4 der Elution bei pH 4,5 zu erkennen. Erhöhte Absorptionswerte sind auch bei den Elutionsfraktionen 5 der Elution bei pH 4,5, sowie bei 1 und 2 der Elution bei pH 3,5 zu beobachten. Die Elution der TfR1-Cp-Biotin-Agarose, welche in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt wurde, ergab nur bei der Elutionsfraktion 2 des pH 2,5 einen sehr gering erhöhten Absorptionswert knapp oberhalb der Sekundärkontrolle GAR*.

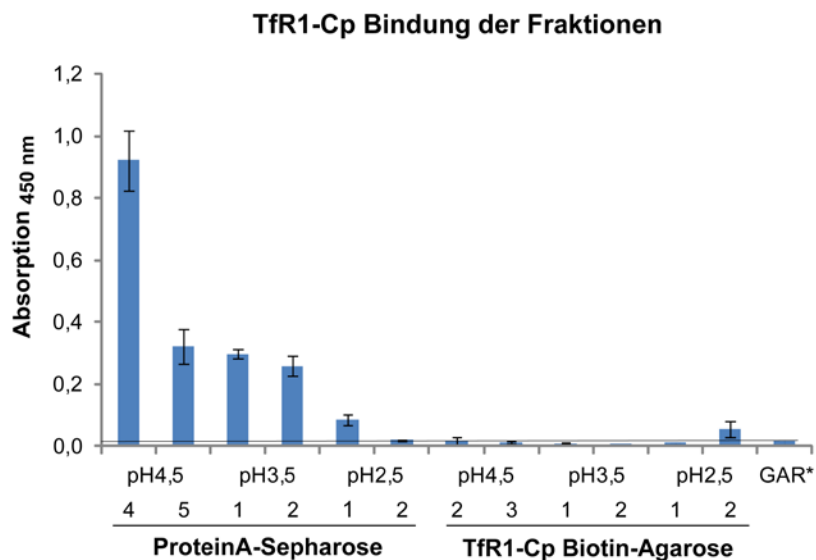


Abbildung 7. Bindung der eluierten Fraktionen an TfR1-Cp. Es wurden 200 ng biotinyliertes TfR1-Cp auf der Platte beschichtet, die Eluate der ProteinA-Sepharose wurden in einer Verdünnung von 1:1000 und die Eluate der Biotin-Agarose in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt. Als Sekundärantikörper wurde GAR* 1:3000 eingesetzt. Die Daten wurden aus einer Vierfachbestimmung erlangt; die Fehlerbalken stellen die errechnete Standardabweichung dar.

Aus diesem Ergebnis lässt sich schließen, dass die Aufreinigung der spezifischen TfR1-Cp Antikörper aus einem Antikörperpool der Fraktionen 4 und 5 (pH 4,5) sowie 1 und 2 (pH 3,5) über TfR1-Cp-Biotin, gekoppelt an Streptavidin-Agarose, nicht funktioniert hat, da keine nennenswerte TfR1-Cp-Bindung gefunden wurde. Mehrere Wiederholungen des Aufreinigungsprozesses ergaben das gleiche Ergebnis. Aus diesem Grund wurde überlegt, welche weiteren Möglichkeiten es gibt, TfR1-Cp zu koppeln. Die Abbildung 8 zeigt, welche Seitenketten im Peptid vorhanden sind. Da die Cysteine (Abb. 8, gelb) die Struktur

des Peptids beeinflussen können, sind sie für die Kopplung des TfR1-Cp zur Aufreinigung der Antikörper ungeeignet. Bei Betrachtung des Farbkodes der Sequenz wird deutlich, dass die für eine Kopplung freien Aminogruppen (Abb. 8, rot) gleichmäßig über das gesamte TfR1-Cp verteilt vorliegen, aus diesem Grund wurde das TfR1-Cp über die Aminogruppen an eine N-Hydroxysuccinimidyl (NHS)-Sephrose gekoppelt.



Abbildung 8. TfR1-Cp-Sequenz mit bunt markierten Aminosäuren. Die Carboxylgruppen sind blau, die Aminogruppen rot und die Sulfhydrylgruppen gelb markiert.

Der Antikörperpool nach der Reinigung über ProteinA-Sephrose (α -Cp Pool) wurde über die TfR1-Cp-NHS-Sephrose-Säule gegeben und mit 100 mM Glycin pH 2,5 eluiert. Nachdem die Fraktionen mit 1 M Tris auf pH 7 gebracht wurden, wurden die einzelnen Fraktionen sowie der Durchlauf und der Antikörperpool mittels ELISA auf Bindung an TfR1-Cp getestet. Das Ergebnis des ELISA ist in Abbildung 9 zu sehen. Hierbei ist zu beobachten, dass im Durchlauf bei einer Verdünnung von 1:3000 keine Bindung an das TfR1-Cp mehr messbar ist und somit keine oder kaum noch TfR1-Cp Antikörper im Durchlauf vorhanden sind. Die acht Eluatfraktionen wurden ebenfalls bei einer Verdünnung von 1:3000 auf TfR1-Cp-Bindung getestet. Dabei ist zu beobachten, dass die Eluatfraktion 3 den höchsten Absorptionswert aufweist. In allen acht Fraktionen ist eine Absorption zwischen 0,20 und 0,25 zu beobachten. Dieser ELISA zeigt, dass alle Fraktionen positiv auf eine Bindung an das TfR1-Cp getestet wurden. Daher wurde die Aufreinigung eines weiteren α -Cp Pool über TfR1-Cp-NHS-Sephrose durchgeführt, dabei wurden 11 Eluate abgenommen.

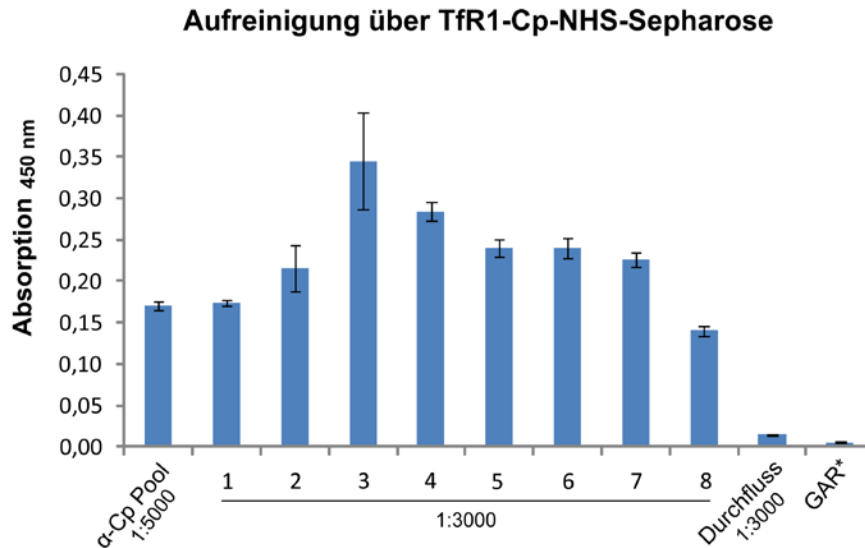


Abbildung 9. Test der TfR1-Cp Antikörper. Der Antikörperpool wurde über die mit TfR1-Cp gekoppelte NHS-Sepharose gegeben. Der eingesetzte Antikörperpool (α -Cp Pool) wurde 1:5000, die Eluatfraktionen und der Durchlauf 1:3000 eingesetzt. Zum Nachweis der Bindung der Antikörper an TfR1-Cp wurde die Mikroplatte mit 200 ng TfR1-Cp/Vertiefung beschichtet, als Sekundärantikörper wurde GAR* 1:3000 verwendet. Die Daten wurden aus einer Vierfachbestimmung erlangt; die Fehlerbalken stellen die errechnete Standardabweichung dar.

Nach dem Test der TfR1-Cp-Antikörper auf TfR1-Cp-Bindung wurden die Fraktionen 1–4 und die Fraktionen 5–11 mit den anderen Fraktionen 1–4 und 5–8 vereinigt und mit Hilfe von 25 % Polyethylenglycol (PEG-8000) eingengt. Eine Proteinbestimmung der beiden TfR1-Cp-Pools ergab leider keine messbaren Ergebnisse, daher wurden die beiden Pools in verschiedenen Verdünnungen auf TfR1-Cp Bindung getestet. Die α -TfR1-Cp Antikörperpools (blau: α -TfR1-Cp AK 1–4; rot: α -TfR1-Cp AK 5–11) wurden auf der mit TfR1-Cp beschichteten Mikroplatte auf TfR1-Cp-Bindung getestet (Abb. 10). Dabei sind für die blauen Balken (α -TfR1-Cp AK 1–4) sehr hohe Absorptionswerte zu beobachten, auch bei einer Verdünnung von 1:20.000 ist noch ein Absorptionswert von 0,5 zu erkennen. Dieser Absorptionswert kann mit dem α -TfR1-Cp AK 5–11 nur mit einer geringeren Verdünnung von 1:3000 erzielt werden, zudem liegt der Absorptionswert für die kleinste Verdünnung von 1:1000 nur bei 1,4. Dies weist daraufhin, dass in dem α -TfR1-Cp AK 1–4 mehr Antikörper vorhanden sind als in dem α -TfR1-Cp AK 5–11. Zudem lässt dieser Versuch darauf schließen, dass man den α -TfR1-Cp AK 1–4 in einer Verdünnung von 1:10.000 einsetzen kann.

Titrierung der aufgereinigten anti-TfR1-Cp AK

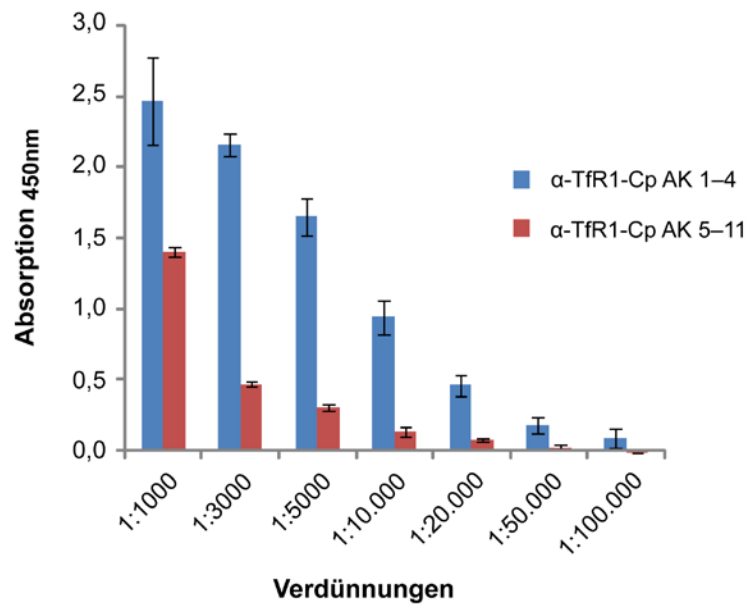


Abbildung 10. Titrierung des anti-TfR1-Cp-Antikörpers. Die gepoolten α -TfR1-Cp-Antikörper wurden in verschiedenen Verdünnungen auf einer mit 200 ng TfR1-Cp/Vertiefung beschichteten Mikroplatte getestet. Der Absorptionswert der Sekundärantikörperkontrolle (GAR*) wurde von den Absorptionswerten der Verdünnungen abgezogen. Die Daten wurden aus einer Vierfachbestimmung erlangt; die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Um die Nachweisgrenze der TfR1-Cp-Detektion mit dem α -TfR1-Cp AK 1-4 zu testen, wurden verschiedene TfR1-Cp-Mengen auf der Mikroplatte beschichtet und zwei verschiedene α -TfR1-Cp AK 1-4 Verdünnungen (Abb. 11, blau 1:5000; rot 1:10.000) verwendet. Der Nachweis erfolgte mit dem GAR* (1:3000, Abb. 11). Dabei wurde ein Signal erst bei 1 ng beschichtetem TfR1-Cp in den Verdünnungen 1:5000 und 1:10.000 beobachtet. Weiterhin sind sehr hohe Absorptionswerte über 1,0 für 5 ng und 10 ng beschichtetem TfR1-Cp zu erkennen. Dabei sind die Absorptionswerte der 1:5000er Verdünnung wie zu erwarten höher als in der Verdünnung von 1:10.000. Dieser Versuch zeigt, dass zum Nachweis von kleinen TfR1-Cp Mengen die Verdünnung des α -TfR1-Cp AK 1-4 von 1:5000 und einer längeren Entwicklungszeit des ELISA empfehlenswert ist.

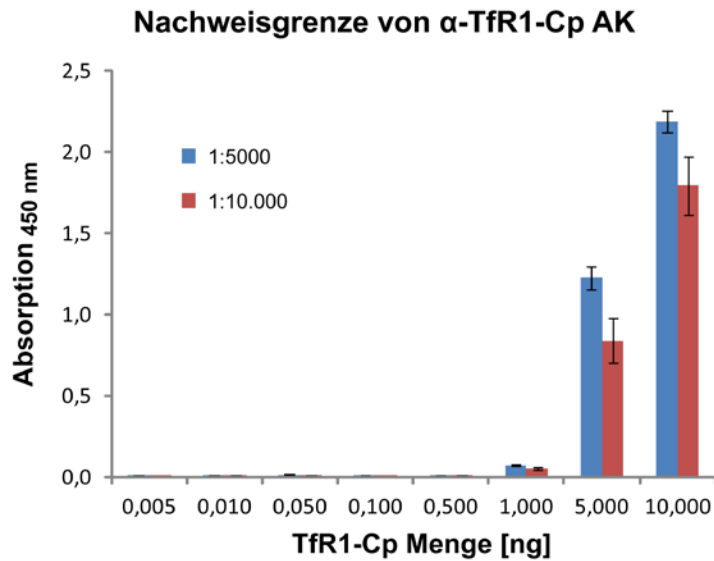


Abbildung 11. Nachweisgrenze des α -TfR1-Cp-Antikörpers. Es wurden verschiedene TfR1-Cp Mengen auf einer Mikroplatte beschichtet. Der α -TfR1-Cp AK 1–4 wurde in den Verdünnungen 1:5000 und 1:10.000 eingesetzt, GAR* (1:3000) wurde als Sekundärantikörper verwendet. Die Daten wurden durch eine Vierfachbestimmung erlangt; die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Weiterhin wurde die Verwendung des α -Cp Pools in einer Verdünnung von 1:1000 für den Immunoblot getestet (Abb. 12). Auf einem Polyvinylidenfluoridstreifen (PVDF; Abb. 12, oben) und einem Nitrozellulosestreifen (NC; Abb. 12, unten) wurden verschiedene Mengen TfR1-Cp gespottet. Um eine spezifische Bindung an andere Proteine auszuschließen, wurde der His-getaggte epidermale Wachstumsfaktor (EGF-His) benutzt. Bei der Verwendung des EGF-His wurde keine Bindung des α -Cp Pools nachgewiesen. Bei einer Verdünnung von 1:1000 des α -Cp Pools war es möglich die kleinste gespottete Menge von 10 ng C-Peptid auf beiden Membranen nachzuweisen. Dieser Versuch zeigt, dass auch kleinere TfR1-Cp-Mengen im Dotblot sichtbar sein könnten, dies müsste im Weiteren ausgetitriert werden.

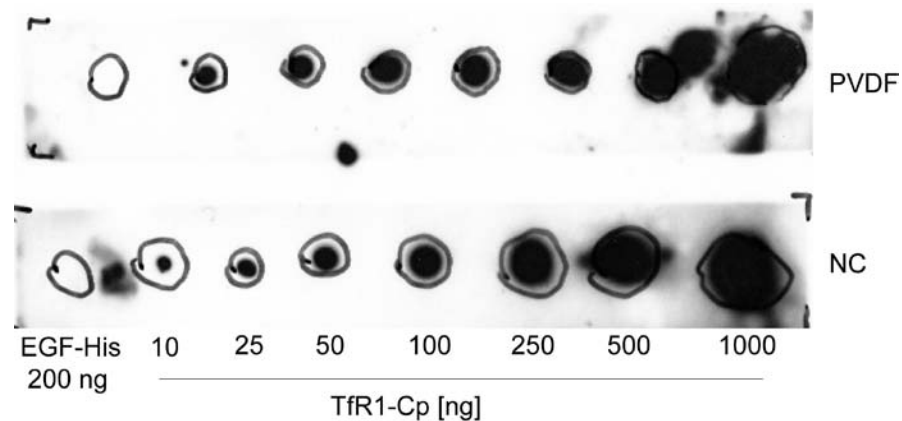


Abbildung 12. Tfr1-Cp-Dotblot zum Test des α -Cp Pools. Die angegebenen Tfr1-Cp Mengen wurden auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran (oben) und auf eine Nitrozellulosemembran (unten) gespottet. Der α -Cp Pool wurde in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt, GAR* (1:3000) wurde als Sekundärantikörper verwendet. Als unspezifische Proteinkontrolle wurde das his-getaggte Protein epidermale Wachstumsfaktor (EGF) verwendet.

Da Proteingemische im Gel meistens aufgetrennt und anschließend auf eine Membran mittels Nassblot übertragen werden, wurden verschiedene Blotzeiten mit den beiden verschiedenen Membranen getestet. Zudem wurden aufgrund der geringen Größe des Tfr1-Cp zwei Membranen übereinandergelegt um eventuell durchgeblottetes Tfr1-Cp aufzufangen (Abb. 13). Der α -Tfr1-Cp AK 1–4 wurde unspezifisch an beide PVDF-Membranen gebunden, aus diesem Grund wurde nur die erste PVDF-Membran abgebildet (Abb. 13, links), auf dem 40-min-PVDF-Streifen kann man eine 4,6-kDa-Bande bei 250 ng und 1 μ g erahnen. Die Detektion des Tfr1-Cp auf der Nitrozellulosemembran (Abb. 13, rechts) war am erfolgreichsten nach einem Elektrotransfer von 40 min Dauer. Das Tfr1-Cp wurde in allen drei Spuren (50 ng, 250 ng und 1 μ g) auf der ersten und der zweiten Membran nachgewiesen. Somit wurde bei einer Transferzeit von 40 min das Peptid aufgrund der geringen Größe von etwa 4,6 kDa durchgeblottet. Es konnte kein 4,6-kDa-Signal bei 50 ng nach 20 min und 30 min Transferzeit nachgewiesen werden, während 1 μ g bei beiden Zeiten komplett geblottet und sogar durchgeblottet wurde. Das 4,6-kDa-Signal des Tfr1-Cp bei 250 ng erscheint schwach schon nach 20 min Transferzeit, aber nicht stärker bei 30 min.

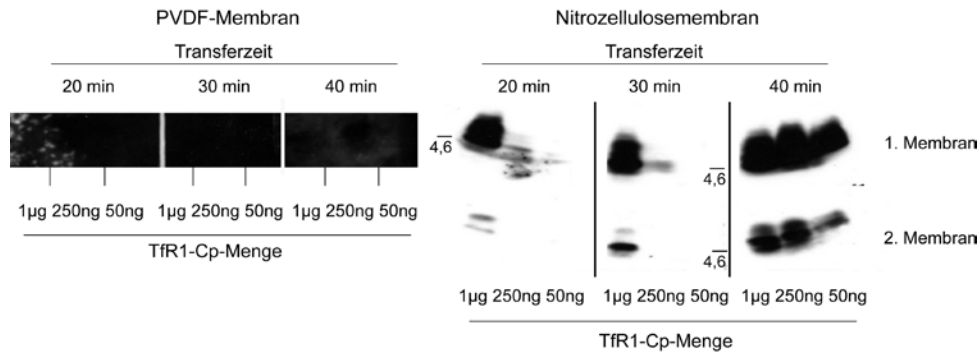


Abbildung 13. Entwicklung der Nassblotbedingungen für das TfR1-Cp. Die verschiedenen TfR1-Cp-Mengen (1 µg, 250 ng, 50 ng) in einem 16%igen Tricin-SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran (rechts) oder eine PVDF-Membran (links) mittels Nassblot übertragen. Dafür wurden zwei Membranen übereinandergelegt, nach 20 min und nach 30 min wurde ein Teil der Membran vorsichtig abgetrennt und für die Immunodetektion durch 5-minütiges Kochen in PBS fixiert. Nach Blockierung mit 5% Magermilchpulver in PBS erfolgte die Detektion mit dem α -Cp Pool (1:1000), als Sekundärantikörper wurde GAR* (1:3000) verwendet.

5.4 ETABLIERUNG EINES SANDWICH-ELISA

Bei einem Sandwich-ELISA werden zwei Antikörper verwendet, die an unterschiedlichen Stellen (Epitope) des Antigens binden. In diesem Fall sind nur die in Kaninchen generierten polyklonalen Antikörper vorhanden, welche aufgrund der hohen Diversität der zu erkennenden Epitope eine große Wahrscheinlichkeit aufweisen, an unterschiedlichen Stellen des TfR1-Cp zu binden. Die Methode soll zum Nachweis des TfR1-Cp im humanen Serum eingeführt werden. Zur Etablierung des Assays wurde ein Teil des α -Cp Pools mit der Meerrettichperoxidase (α -Cp Pool-HRP) gekoppelt. Zuerst wurde die Mikroplatte mit verschiedenen Mengen TfR1-Cp beschichtet und anschließend mit dem α -Cp Pool-HRP (1:1000) inkubiert (Abb. 14A, rote Balken). Dabei wurde ein linearer Anstieg der Detektion zwischen 0,2 ng und 5 ng des beschichteten Peptids festgestellt, eine Sättigung des Signals trat bei 5 ng TfR1-Cp und einem Absorptionswert von 2,8 ein. Um das TfR1-Cp im Serum nachzuweisen, muss es vorher daraus eingefangen werden. Aus diesem Grund wurde die Mikroplatte mit dem ungelabelten α -Cp Pool beschichtet und anschließend mit verschiedenen Mengen TfR1-Cp inkubiert (Abb. 14A, blaue Balken). In diesem Fall wurde zwischen 0,2 ng und 1 ng ein geringer Absorptionswert gemessen, dafür konnte ein langsamer linearer Anstieg bei der Detektion von 5 ng bis 200 ng nachgewiesen werden. Der Sandwich-ELISA zeigt eine konzentrationsabhängige Bindung des α -Cp Pools zum TfR1-Cp. Um die Spezifität der α -TfR1-Cp-Antikörper nachzuweisen, wurde

ein kompetitiver ELISA durchgeführt (Abb. 14, rechts). Dafür wurden die nicht-TfR1-Cp bindenden Antikörper durch die Aufreinigung des α -Cp Pools über die TfR1-Cp gekoppelte NHS-Sepharose ausgeschlossen. Die α -TfR1-Cp AK 1–4 wurden auf einer Mikroplatte beschichtet, 1 ng biotinyliertes TfR1-Cp wurde mit verschiedenen ungelabelten TfR1-Cp Mengen inkubiert, der Nachweis erfolgt mit einem Streptavidin-HRP (1:20.000; Abb. 14, blaue Kurve). Es ist zu beobachten, dass mit steigender unmarkierter TfR1-Cp Menge ein Abfall der Bindungskurve zu erkennen ist. Der halbmaximale Absorptionswert wurde bei einer fünffachen Menge des ungelabelten TfR1-Cp erreicht (Abb. 14, rechts, schwarze Linien). Als Kontrolle wurden die Mischungen aus biotinylierten und unmarkierten TfR1-Cp beschichtet (Abb. 14, rechts, rote Kurve) und mit dem Streptavidin-HRP (1:20.000) nachgewiesen. Dabei ist eine leichte Abschwächung des Signals bei höherem ungelabeltem TfR1-Cp aufgrund der limitierenden Oberfläche der Mikroplattenvertiefungen zu erkennen. Man kann somit schlussfolgern, dass der etablierte Sandwich-ELISA sensitiv und spezifisch für das TfR1-Cp ist.

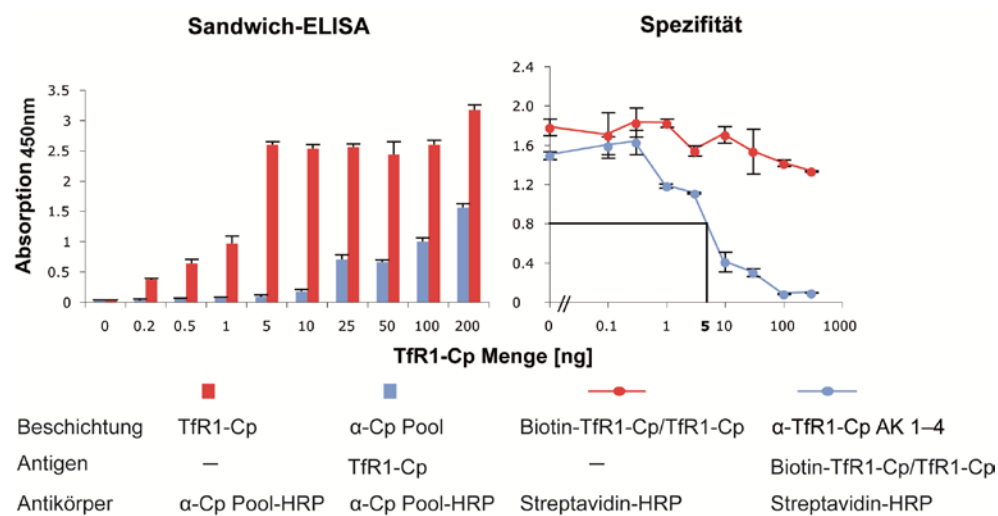


Abbildung 14. Etablierung des Sandwich-ELISA zur Detektion des TfR1-Cp. Direkte Detektion des beschichteten TfR1-Cp (links, rote Säulen) mit dem α -Cp Pool-HRP (1:1000) und Sandwich-ELISA (links, blaue Säulen), bei dem α -Cp Pool als Fängerantikörper (100 ng) beschichtet und der α -Cp Pool-HRP (1:1000) als Detektorantikörper verwendet wurde. Die Spezifität der Detektion wurde mit einem kompetitiven Verdrängen des biotinylierten TfR1-Cp mit ungelabelten TfR1-Cp bewiesen. Es wurde 1 ng biotinyliertes TfR1-Cp mit ansteigenden Mengen TfR1-Cp versetzt. Diese Mischung wurde entweder direkt auf der Platte (rote Linie) beschichtet oder auf Platten inkubiert, welche mit dem α -TfR1-Cp AK 1–4 (100 ng, blaue Linie) beschichtet waren. Biotinyliertes TfR1-Cp wurde anschließend durch Streptavidin-HRP (1:20.000) detektiert. Die Daten wurden mit einer Vierfachbestimmung erlangt, das Ergebnis konnte in zwei weiteren Experimenten bestätigt werden. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

5.5 BINDUNG DES TfR1-C PEPTIDS AN SERUM ALBUMIN

Um TfR1-Cp in humanem Serum zu detektieren, wurde das Standard-Additionsverfahren als Vorversuch durchgeführt. Bei diesem Versuch werden dem Serum ansteigende Mengen TfR1-Cp zugesetzt, welche das Signal linear erhöhen sollten. Diese Methode ist vorteilhaft bei Messungen in niedrigen Konzentrationsbereichen. Das Ergebnis der Messung ist in Abbildung 15 dargestellt. Der α -TfR1-Cp AK 1–4 wurde auf der Mikroplatte beschichtet, das Serum-TfR1-Cp-Gemisch wurde auf die Platte gegeben und mit dem α -Cp Pool HRP (1:1000) nachgewiesen. Es wurden zwei verschiedene Probandenseren jeweils in einer Verdünnung von 1:3 und 1:4 (Abb. 15, Proband 16 blau 1:3, rot 1:4, Proband 2 gelb 1:3, grün 1:4) verwendet, als positive Kontrolle wurde das TfR1-Cp in PBST verdünnt und eingesetzt (Abb. 15, lila). Wie in Abbildung 15 zu erkennen, ist im reinen Serum kein Signal für das TfR1-Cp zu beobachten, zudem sind keine Signale bei der Zugabe von 0,5 ng TfR1-Cp zu sehen. Auch bei einer TfR1-Cp Zugabe von 1 ng oder 5 ng wurde kaum eine Erhöhung des Signals bei den Serumproben beobachtet. Erst bei einer 10 ng TfR1-Cp Zugabe führte das zugesetzte TfR1-Cp in den Serumproben zu einer sehr geringen Signalerhöhung. Die PBST-Kontrolle (Abb. 15, lila Balken), welche zum Funktionsnachweis des Assays diente, zeigte eine konzentrationsabhängige Erhöhung des TfR1-Cp Absorptionssignals, dabei ist erst bei 5 ng ein gutes Absorptionssignal zu erkennen.

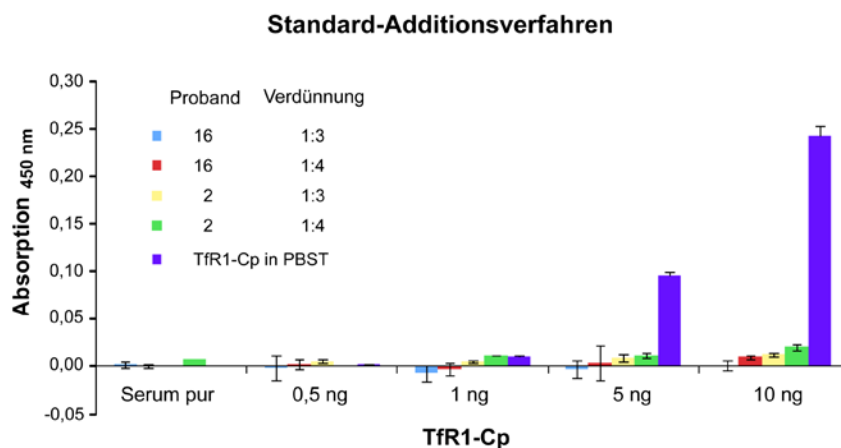


Abbildung 15. TfR1-Cp Wiederfindung im Serum. Zwei Probandenseren wurden 1:3 (hellblau und gelb) und 1:4 (rot und grün) verdünnt und mit verschiedenen Mengen TfR1-Cp versetzt, als Funktionskontrolle des Assays wurde TfR1-Cp in PBS-Tween_{0,05%} verwendet (lila). Der α -TfR1-Cp AK 1–4 (100 ng) wurde als Fängerantikörper und α -Cp Pool-HRP (1:1000) als Detektionsantikörper eingesetzt. Die Daten wurden aus einer Dreifachbestimmung erlangt; die Fehlerbalken stellen die errechnete Standardabweichung dar.

Diese Beobachtung wirft die Frage auf, welches Protein im Serum den Nachweis stören könnte. Bei einer genaueren Betrachtung der Serumbestandteile ergibt sich ein Proteinanteil von 7 %, von dem es sich bei 62 % um Serumalbumin handelt, der Rest sind hauptsächlich verschiedene Globuline. Aus diesem Grund wurde überprüft, ob das TfR1-Cp an Albumin bindet. Hierfür wurde eine Mikroplatte mit humanem Serumalbumin (HSA) beschichtet. Nach Inkubation mit verschiedenen TfR1-Cp Mengen wurde das TfR1-Cp mit Hilfe des α -Cp Pools (1:1000) und dem GAR* (1:3000) gemessen (Abb. 16), beschichtetes biotinyliertes TfR1-Cp diente zum Funktionsnachweis des Assays. Bei einer eingesetzten TfR1-Cp Menge von 25 ng wurde eine Bindung an das humane Albumin nachgewiesen, zudem zeigen steigende TfR1-Cp Mengen steigende Absorptionswerte. Es handelt sich hierbei um eine konzentrationsabhängige Bindung des TfR1-Cp an das Albumin.

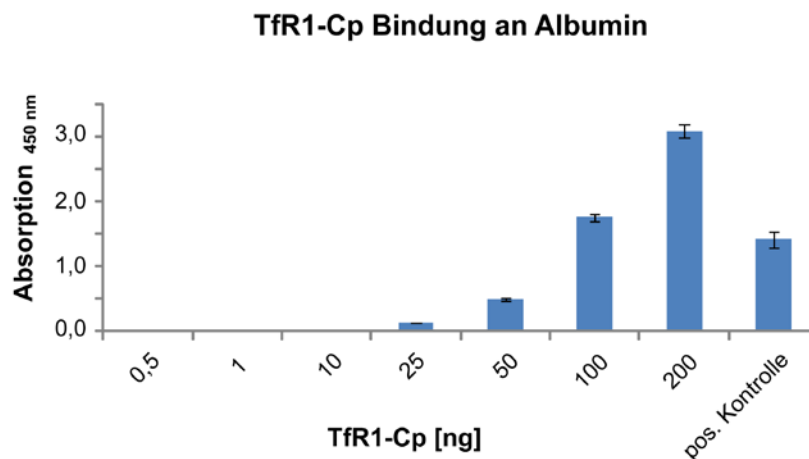


Abbildung 16. TfR1-Cp Bindung an Albumin. Die Platte wurde mit Albumin (1 mg/ml) beschichtet und mit verschiedenen Mengen TfR1-Cp inkubiert, die Detektion erfolgte mit dem α -TfR1-Cp AK 1–4 (1:20.000) und dem Sekundärantikörper GAR* (1:3000). Um die Funktionstüchtigkeit des Assays zu bestätigen, wurde biotinyliertes TfR1-Cp (200 ng) als Positivkontrolle verwendet. Die Daten wurden mit einer Vierfachbestimmung erlangt; die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Da TfR1-Cp an Albumin bindet, stellt sich die Frage, ob die Anwesenheit des Albumins die Bindung des α -Cp Pools an das TfR1-Cp stört. Um diese Frage zu beantworten, wurde α -Cp Pools auf eine Mikroplatte beschichtet. Das Albumin wurde in einer serummolaren Konzentration (541,6 μ M) und einer zehnfachen verdünnten Konzentration von 54,16 μ M mit verschiedenen Mengen TfR1-Cp versetzt und mit dem α -Cp Pools-HRP nachgewiesen. Als Funktionskontrolle des Assays diente in PBST verdünnte TfR1-Cp Mengen (Abb. 17, blau PBST-Kontrolle, rot 54,16 μ M HSA und orange 541,6 μ M HSA). Bei der Anwesenheit einer serummolaren Konzentration von Albumin (Abb. 17, orangene Balken) konnte selbst bei einer TfR1-Cp Menge von 50 ng nur Absorptionswerte von 0,25

erreicht werden, selbst die Verwendung von 100 ng TfR1-Cp führt zu keiner nennenswerten Signalerhöhung. In Anwesenheit einer Konzentration von 54,16 μM Albumin (Abb. 17, rote Balken) ist ab einer TfR1-Cp Menge von 10 ng ein Absorptionssignal von 0,15 zu erkennen, welches bei zunehmender TfR1-Cp Menge steigende Absorptionswerte aufweist. Im Vergleich zur PBST-Kontrolle, bei der das Absorptionssignal ebenfalls konzentrationsabhängig ansteigt, führt die Verwendung der 54,16 μM Albuminkonzentration zu einer Verringerung des TfR1-Cp Signals. Dieser Versuch zeigt, dass bei einer 1:10 Verdünnung des Serums ein Nachweis des TfR1-Cp ab einer Menge von 5–10 ng möglich wäre.

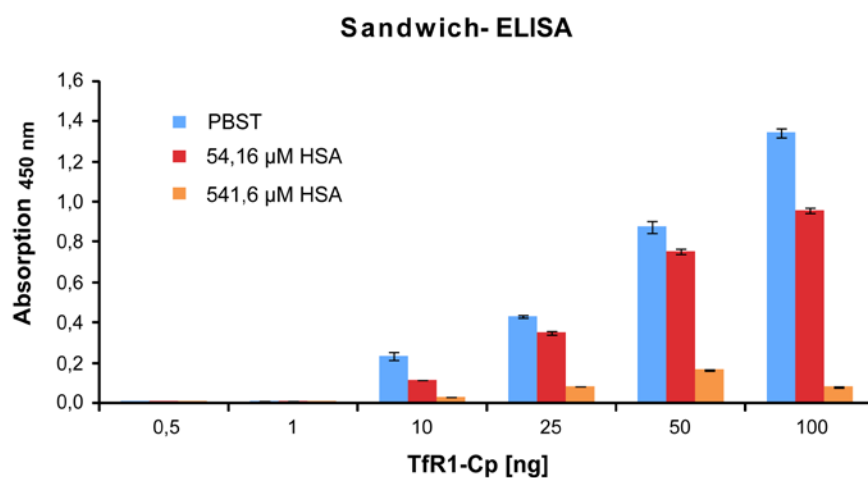


Abbildung 17. Funktionstest des Sandwich-ELISA mit verschiedenen Albuminkonzentrationen. Verschiedene Mengen TfR1-Cp wurden mit einer serummolaren Albuminkonzentration (orange) und einer 1:10 Verdünnung (rot) inkubiert und anschließend auf den mit α -Cp Pool (200 ng) beschichteten Mikroplatten gegeben. Als Detektionsantikörper wurde der α -Cp Pool-HRP (1:1.000) verwendet. Die Daten erfolgten aus einer Vierfachbestimmung; die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

Weiterhin wurde getestet, ob die Bindung des TfR1-Cp zu Albumin im Immunoblot auch nachweisbar ist. Zum Nachweis diente der α -Cp Pool (1:1000) und GAR* (1:3000). Das Albumin wurde serummolar (541,6 μM) mit 250 ng TfR1-Cp eingesetzt (Abb. 18, links). Während das TfR1-Cp alleine bei einer eingesetzten Menge von 250 ng bei etwa 4,6 kDa erscheint (Abb. 18, rechts), erscheint das TfR1-Cp Signal bei Zusatz von Albumin bei 70 kDa. Dies wurde anhand einer Kalibriergeraden, bei der der Logarithmus des Molekulargewichtes der Markerproteine gegen die relative Migration aufgetragen wurde, ermittelt. Zudem sind Signale bei ungefähr 30 kDa und 20 kDa (Abb. 18, links) zu erkennen. Bei diesen beiden Signalen handelt es sich eventuell um Fragmente, während das Signal bei 71 kDa dem Albumin von 66 kDa plus dem TfR1-Cp entsprechen könnte. Da

sich TfR1-Cp bei dieser Masse mit α -Cp Pool detektieren lässt, kann man darauf schließen, dass das TfR1-Cp auch unter SDS denaturierenden Bedingungen an das Albumin bindet.

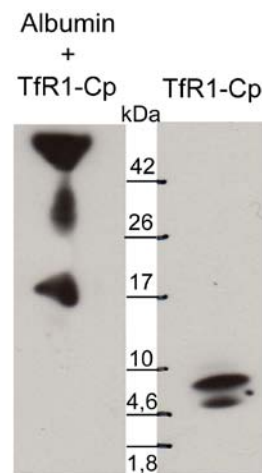


Abbildung 18. Bindung von TfR1-Cp an humanes Albumin im Immunoblot. Es wurden 250 ng TfR1-Cp alleine (rechts) oder mit einer serummolaren Konzentration (541,6 μ M) Albumin versetzt (links), mit Hilfe eines 16% igen Tricin-SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran mittels Nassblot übertragen. Die Immunodetektion erfolgte mit dem α -Cp Pool (1:1000) und dem GAR* (1:3000).

5.6 IDENTIFIZIERUNG DER PROTEASE

Die Identifizierung des TfR1-Cp in HEK293-Zellen zeigt, dass eine endogen exprimierende Protease für die intramembranäre Spaltung verantwortlich ist. Es gibt verschiedene Proteaseklassen, die für intramembranäre Proteolyse verantwortlich sind. Neben Serinproteasen wie Rhomboide, sind Metalloproteasen wie S2P und GxGD-Aspartylproteasen wie die γ -Sekretase und die SPP/SPPL-Familie bekannt. Um die endogene Protease zu inhibieren und so die Proteaseklasse zu bestimmen, wurden verschiedene Inhibitoren eingesetzt; Dichloroisocoumarin (DCI) für die Serinproteasen, 1,10-Phenanthrolin für Metalloproteasen und L685,458 für alle GxGD-Aspartylproteasen. Um letztere eventuell näher zu bestimmen, wurden darüber hinaus DAPT für γ -Sekretase und (Z-LL)₂-Keton für die SPPL-Familie verwendet. Stabil mit Flag-TfR1-NTF-V5 transgenierte HEK293-Zellen wurden für 18 h mit den verschiedenen Inhibitoren und einer zugehörigen Lösemittelkontrolle Dimethylsulfoxid (DMSO) bzw. für 4 h beim Inhibitor DCI und der dazugehörige Lösemittelkontrolle inkubiert. Das Medium wurde anschließend für eine Immunpräzipitation (4.2.6.1) mit dem α -V5_m Antikörper verwendet, das präzipitierte TfR1-V5-Cp wurde im Immunoblot mit α -V5_p nachgewiesen (Abb. 19). Eine Inhibition

der endogenen Protease würde in einem verringerten Signal des TfR1-Cp gegenüber der DMSO Kontrolle resultieren.

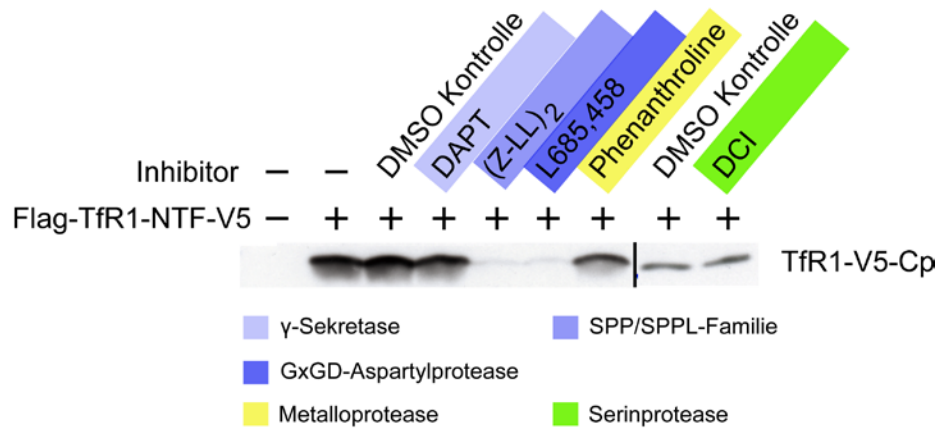


Abbildung 19. Nachweis der verantwortlichen Proteaseklasse. Flag-TfR1-NTF-V5 transfizierte HEK293-Zellen wurden 18 h mit 50 μ M (Z-LL)₂-Keton (mittelblau), 1,5 μ M L685,458 (dunkelblau), 1,5 μ M DAPT (hellblau) oder 100 μ M 1,10-Phenanthroline (gelb) bzw. für 4 h mit 100 μ M DCI (grün) und der dazugehörigen Lösemittelkontrolle (DMSO) behandelt. Das Medium wurde mit 1 μ g α -V5_m und 25 μ g ProteinA Sepharose inkubiert, das an Sepharose gebundene TfR1-Cp wurde in einem nicht-reduzierenden 16 % Tricin-SDS-Gel aufgetrennt und im Immunoblot mit einem α -V5_p nachgewiesen.

Die konstitutive Expression des Flag-TfR1-NTF-V5 in HEK293-Zellen führt zur Entstehung des TfR1-Cp (Abb. 19, 2. Spur von links), als negative Kontrolle wurden HEK293 Zellen verwendet, diese wiesen kein TfR1-Cp Signal auf (Abb. 19, erste Spur von links). Der Inhibitor Dichloroisocoumarin (Abb. 19, grün) hat eine sehr kurze Halbwertszeit und wurde deswegen nur für 4 h eingesetzt, als Kontrolle wurde das Lösemittel DMSO ebenfalls für 4 h verwendet. Es wurde hierbei keine Verringerung des immunpräzipitierten TfR1-Cp beim Zusatz von DCI im Vergleich zur Kontrolle beobachtet. Auch die Verwendung des 1,10-Phenanthroline (Abb. 19, gelb) zeigte keinen Unterschied zur DMSO-Kontrolle. Um die GxGD-Aspartylprotease Familie zu testen, wurde L658,458 verwendet (Abb. 19, dunkelblau), welcher ein Inhibitor sowohl für die γ -Sekretase als auch für die SPP/SPPL-Familie ist. Es wurde eine starke Verringerung des TfR1-Cp Signals im Vergleich zur DMSO Kontrolle beobachtet; um eine Unterscheidung der endogenen Protease zwischen der γ -Sekretase und der SPPL-Familie zu führen, wurde für die γ -Sekretase der spezifische Inhibitor DAPT (Abb. 19, hellblau) eingesetzt, dessen Verwendung keine TfR1-Cp Signalschwächung gegenüber der Kontrolle zeigte. Für die Inhibierung der SPP/SPPL-Familie wurde der spezifische Inhibitor (Z-LL)₂-Keton eingesetzt, dabei kam es zu einer starken Signalabnahme, ähnlich der Verwendung des L685,458, verglichen zur

DMSO Kontrolle. Man kann folglich schlussfolgern, dass es sich aufgrund dieses Ergebnisses bei der endogenen Protease um ein Mitglied der SPP/SPPL-Familie handelt.

Weiterhin wurde geschaut, ob das Einsetzen zunehmender (Z-LL)₂-Keton-Konzentrationen (Abb. 20) auf eine konzentrationsabhängige Inhibition der intramembranären Proteolyse hinweist. Dafür wurden Flag-TfR1-NTF-V5 exprimierende HEK293-Zellen mit verschiedenen (Z-LL)₂-Keton-Konzentrationen von 1–10 µM inkubiert. Als Kontrolle des TfR1-Cp-Signals wurden HEK293-Zellen verwendet. Dabei ist in Abbildung 20 eine zunehmende Abschwächung des TfR1-Cp-Signals von unbehandelten Zellen zu Zellen mit höheren Konzentrationen zu beobachten. Dies weist auf eine konzentrationsabhängige Inhibierung der endogenen Protease hin.

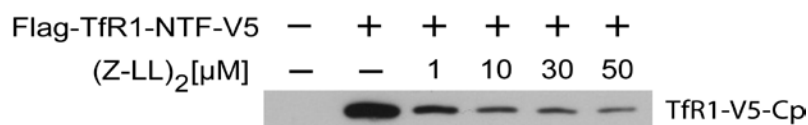


Abbildung 20. Konzentrationsabhängige Inhibition der intramembranären TfR1-NTF Proteolyse. Flag-TfR1-NTF-V5 transfizierte HEK293-Zellen wurden für 18 h mit steigenden Konzentrationen des (Z-LL)₂-Ketons inkubiert. Das Medium wurde für eine Immunpräzipitation mit 1 µg α-V5_m und 25 µg ProteinA-Sepharose inkubiert und das Präzipitat nicht reduzierend in einem 16%igen Tricin-SDS-Gel aufgetrennt. Das TfR1-V5-Cp wurde im Immunoblot mit einem α-V5_p nachgewiesen.

Es gibt beim Menschen 4 bekannte Mitglieder der SPP/SPPL-Familie, das sind SPPL2a, SPPL2b, SPPL3 und SPP. Um herauszufinden, welche der Mitglieder in die intramembranäre Proteolyse von TfR1-NTF involviert sind, wurden die verschiedenen Mitglieder transient mit dem Flag-TfR1-NTF-V5 in HEK293-Zellen transfiziert (Abb. 21). Die einfache Transfektion von Flag-TfR1-NTF-V5 in HEK293 resultierte in der Freisetzung von TfR1-V5-Cp durch die endogen exprimierenden Protease. Eine Verstärkung des Signals sollte demnach einen Hinweis auf die verantwortliche Protease geben. Die Expression von SPP und SPPL3 in der Koftransfektion mit dem Konstrukt (Abb. 21, 6. und 7. Spur von links) zeigte nahezu die gleiche Stärkung des Signals wie die Expression des Konstrukts alleine, während die Koexpression von SPPL2a und SPPL2b mit dem Konstrukt (Abb. 21, 3. und 4. Spur) in einer Verstärkung des TfR1-V5-Cp Signals resultierte. Um zu erkennen, dass die Verstärkung des Signals tatsächlich durch die aktive SPPL verursacht wird, wurden katalytisch inaktive SPPL-Mutanten verwendet. Dafür wurde das Aspartat aus dem katalytisch wichtigen GxGD-Motiv zu einem Alanin mutiert und als D/A gekennzeichnet. Bei der Expression der inaktiven Mutante SPPL2b D/A (Abb. 21, 5.

Spur) konnte kein TfR1-V5-Cp im Medium detektiert werden, dies weist auf einen dominant negativen Effekt der Überexpression der inaktiven SPPL2b D/A hin. Der Versuch zeigte, dass die SPPL2a und die SPPL2b an der intramembranären Proteolyse des TfR1-NTF beteiligt sind. Zudem wurde das Zelllysate auf ein nicht reduzierendes 12%iges SDS-Gel aufgetragen, um eine gleiche Zellmenge bei den einzelnen Transfektionen nachzuweisen. Dazu wurde der Nachweis des Proteins β -Aktin genutzt (Abb. 21). In allen Spuren der Abbildung 21 kann man die gleiche Menge β -Aktin erkennen.

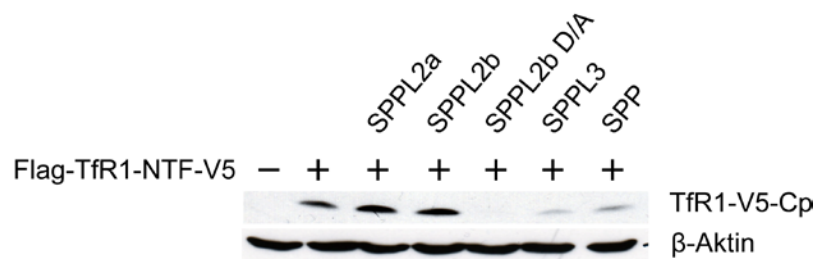


Abbildung 21. SPPL2a und SPPL2b als verantwortliche intramembranäre Proteasen für TfR1-NTF. HEK293-Zellen wurden transient mit FlagTfR1-NTF-V5 und den jeweiligen SPPLs transfiziert. Das Medium wurde für eine Immunpräzipitation mit dem α -V5_m verwendet. Auf einem 16%igen Tricin-SDS-Gel wurden die Proben mit den TfR1-V5-Cp nicht reduzierend aufgetragen und im Immunoblot mit dem α -V5_p bei 4,6 kDa detektiert. Bei der SPPL2b D/A handelt es sich um die katalytisch inaktive SPPL2b. Für den Nachweis des β -Aktins wurde das Zelllysate nicht reduzierend in einem 12%igen SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, der Nachweis erfolgte mit einem anti- β -Aktin (1:10.000) und RAM* (1:3000).

Da auch eine Verstärkung des präzipitierten TfR1-Cp bei überexprimierter SPPL2a zu beobachten war, wurden stabil Flag-TfR1-NTF-V5 exprimierende HEK293-Zellen transient mit den katalytisch inaktiven SPPL2a D/A und SPPL2b D/A sowie mit den aktiven SPPL2a und SPPL2b transfiziert (Abb. 22). Das aus dem Medium der transfizierten Zellen präzipitierte TfR1-V5-Cp wurde im Immunoblot mit einem α -V5_p nachgewiesen. Während die Immunpräzipitation mit α -V5_m wie erwartet kein TfR1-Cp-Signal in normalen HEK293-Zellen hervorruft (Abb. 22, 1. Spur), führt die Expression des Flag-TfR1-NTF-V5 in HEK293-Zellen zu einer endogenen Freisetzung des TfR1-Cp (Abb. 22, 2. Spur). Die Überexpression der beiden aktiven SPPLs, SPPL2a und SPPL2b (Abb. 22, 3. und 5. Spur), führte erneut zu einer Verstärkung des präzipitierten TfR1-V5-Cp. Während die Verwendung der katalytisch inaktiven SPPL2a D/A zu einer Signalverringerng im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 22, 4. Spur) führte, verschwindet bei der katalytisch inaktiven SPPL2b D/A Mutante das TfR1-V5-Cp Signal komplett. Dies lässt den Schluss zu, dass

hauptsächlich die SPPL2b die für das TfR1-NTF zuständige Protease ist und die SPPL2a zu einem geringeren Anteil schneidet.

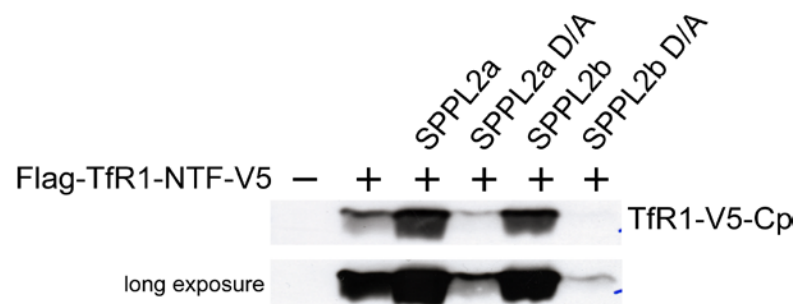


Abbildung 22. Überexpression der katalytisch aktiven und inaktiven SPPL2a und SPPL2b. HEK293-Zellen, die stabil Flag-TfR1-NTF-V5 exprimieren, wurden mit den katalytisch aktiven und inaktiven (D/A) SPPL2a und SPPL2b transfiziert. Das Medium wurde für eine Immunpräzipitation mit dem α -V5_m verwendet. Auf einem 16%igen Tricin-SDS-Gel wurden die immunpräzipitierten Proben nicht reduzierend aufgetragen und im Immunoblot mit einem α -V5_p bei 4,6 kDa detektiert.

Nachdem das TfR1-Cp und die zuständige Protease für die intramembranäre Proteolyse erfolgreich identifiziert werden konnte, wurde versucht den Verbleib der intrazellulären Domäne des TfR1 (TfR1-ICD) aufzuklären. Dafür wurden Zelllysate von HEK293-Zellen verwendet, welche stabil das Flag-TfR1-NTF-V5 Konstrukt exprimieren und keine SPPL überexprimieren (GM), sowie stabil Flag-TfR1-NTF-V5 exprimierende HEK293-Zellen, welche entweder die SPPL2b oder deren inaktive Mutante SPPL2b D/A überexprimieren (Abb. 23). Um den Abbau der TfR1-ICD zu verhindern, wurden die Inhibitoren Epoxomicin (Spur 7–9) und Lactacystein (Spur 10–12) verwendet, als negativ Kontrolle wurden zum einen mit (Z-LL)₂-Keton behandelte Zellen (Spur 13–15) und nicht-Flag-TfR1-NTF-V5 exprimierende Zellen (Spur 1–3) verwendet. In den Spuren 4–6 befinden sich die ohne Inhibitor behandelten Zellen zur Kontrolle der Verstärkung des Signals. Bei den 17-kDa-Banden handelt es sich um das monomere TfR1-NTF, während es sich bei den Banden oberhalb dieser Bande um unspezifische Banden, welche vom Antikörper angefärbt wurden, handelt. Während wie erwartet keine 17-kDa-Bande in den Spuren 1–3 vorhanden sind, da diese Zellen kein Flag-TfR1-NTF-V5 exprimieren, kann man in den folgenden Spuren diese 17-kDa-Banden detektieren. Hierbei ist zu beobachten, dass bei Expression der katalytisch aktiven SPPL2b die Bande schwächer ist als bei der Kontrolle ohne SPPL und bei der Expression der katalytisch inaktiven SPPL2b D/A Mutante (Spuren 4–12). Es wurde jedoch keine Bande bei ungefähr 10 kDa detektiert, welche das erwartete TfR1-ICD repräsentieren würde (Spur 4–6), auch die Verwendung der Inhibitoren Epoxo-

micin und Lactacystein führten nicht zu dem erwarteten Signalen bei 10 kDa. Bei den mit (Z-LL)₂-Keton behandelten Zellen konnten nur sehr schwache Signale bei 17 kDa beobachtet werden.

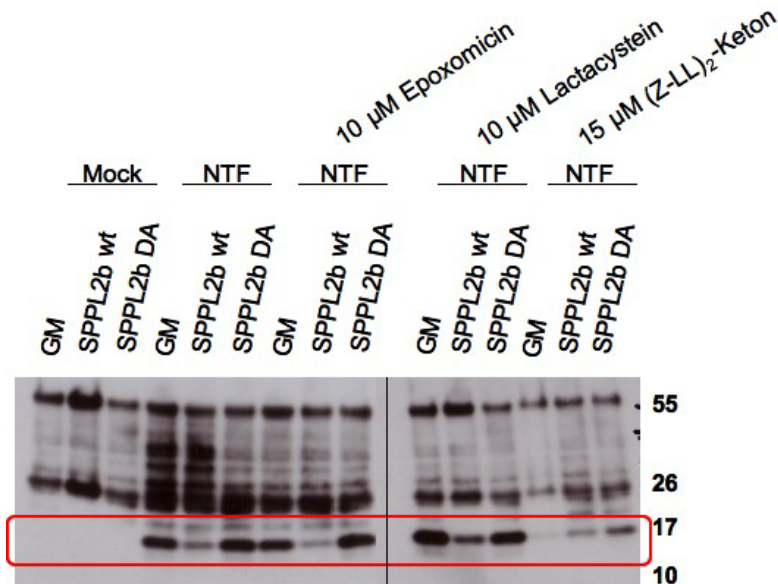


Abbildung 23. Behandlung von HEK293-Zellen mit Inhibitoren zur Wiederfindung der Tfr1-ICD. Zellysate von HEK293-Zellen, welche keine SPPLs überexprimieren (GM), die katalytisch aktive SPPL2b oder die katalytisch inaktive SPPL2b D/A Mutante überexprimieren und zusätzlich das Flag-Tfr1-NTF-V5 exprimieren, wurden reduzierend in einem 16%igen Tricin-SDS-Gel aufgetrennt. Die rot eingerahmten 17-kDa-Banden stellen das monomere Tfr1-NTF dar.

In einer Kooperation mit Regina Fluhrer (DZNE, LMU, München), die HEK293-Zellen stabil mit SPPL2a, SPPL2b, SPPL3, SPP oder ihren jeweiligen katalytisch inaktiven Mutanten transfizierte, wurde unser Konstrukt Flag-Tfr1-NTF-V5 in ihren stabil exprimierenden HEK293-Zellen getestet. Die Expressionskontrolle der stabil transfizierten HEK293-Zellen ist in Abbildung 24 dargestellt. Wie dort zu erkennen, ist in den untransfizierten Zellen und in den ausschließlich mit Flag-Tfr1-NTF-V5 transfizierten Zellen (Spuren 1 und 2) erwartungsgemäß keine der überexprimierten SPPL zu beobachten. Beim Nachweis der SPPL2a und ihrer katalytisch inaktiven Mutante SPPL2a D/A (Spuren 3 und 4, oberster Blot) wurden zwei Banden sichtbar, nämlich die starken Banden bei 100 kDa, welche die ausgereiften Proteine darstellen, und die schwächeren Banden zwischen 148 kDa und 250 kDa, die Dimere anzeigen. Bei der überexprimierten SPPL2b und ihrer katalytisch inaktiven Mutante (Spuren 5 und 6, zweiter Blot) ist die SPPL2b D/A stärker exprimiert, beide zeigen insgesamt drei Banden. Dabei handelt es sich bei der 98-kDa-Bande um die ausgereiften Proteine, während die sehr dünne Bande unterhalb der

98 kDa Bande das unausgereifte Protein darstellt und die dicken Banden zwischen 148 kDa und 250 kDa das Dimer des Proteins. Weiterhin sind die SPPL3 und ihre katalytisch inaktive Mutante SPPL3 D/A in Abbildung 24, dritter Blot, Spuren 7 und 8 anhand der Bande bei ungefähr 40 kDa zu erkennen, dabei wird die SPPL3 D/A etwas stärker exprimiert als die SPPL3. Der Nachweis der SPP und ihrer katalytisch inaktiven Mutante SPP D/A wird in Abbildung 24, vierter Blot, Spuren 9 und 10 geführt, dabei sind bei ungefähr 55 kDa zwei Banden erkennbar, welche das ausgereifte SPP Protein darstellen, die sehr schwachen Banden bei 100 kDa zeigen das Dimer des Proteins. Somit exprimieren die stabil transfizierten HEK293-Zellen die angegebenen SPPs und SPPLs und können für weitere Versuche verwendet werden.

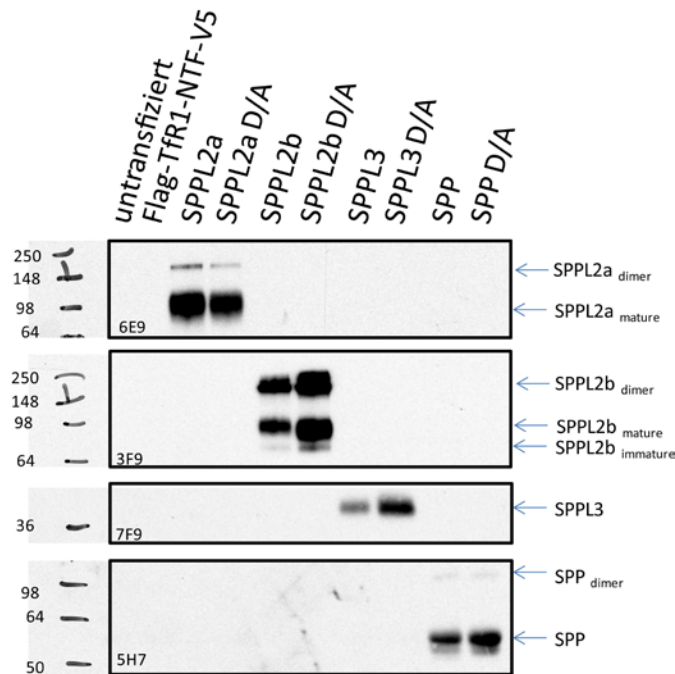


Abbildung 24. Stabile Transfektion der SPPLs in HEK293-Zellen. Frau Fluhner (DZNE, LMU, München) etablierte HEK293-Zellen, die stabil die angegebenen SPPLs oder ihre katalytisch inaktiven (D/A) SPPLs exprimieren. Die Zellysate wurden auf einem 16% igem Tricin-SDS-Gel aufgetrennt, die SPPLs wurden mit Hilfe der verschiedenen SPPL spezifischen Antikörper (6E9-Antikörper für SPPL2a, 3F9-Antikörper für SPPL2b, 7F9 für SPPL3 und 5H7 für SPP) auf einer Nitrozellulosemembran nachgewiesen.

Das Flag-TfR1-NTF-V5 Konstrukt wurde transient in die eben besprochenen HEK293-Zellen transfiziert. Das Medium der transfizierten Zellen wurde für eine Immunpräzipitation mit dem α -V5_m verwendet, die Sepharose wurde in einem 16% igen Tricin-SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, das Ergebnis des Versuches ist in Abbildung 25 oberer Blot dargestellt. Es ist wie zu erwarten keine Bande bei den

nicht transfizierten Zellen zu sehen (Spur 1), während bei den mit Flag-TfR1-NTF-V5 transfizierten Zellen (Spur 2) eine sehr dünne und schwache Bande bei 4 kDa das endogen exprimierende TfR1-Cp darstellt. Diese sehr dünne und schwache Bande bei 4 kDa, welche das endogen exprimierende TfR1-Cp darstellt, ist auch bei den mit SPPL3, SPPL3 D/A und SPP überexprimierten Zellen (Spuren 7 bis 9) zu sehen. Interessanterweise ist keine Bande bei 4 kDa bei der überexprimierten SPP D/A zu erkennen. Die Überexpression der SPPL2b mit dem Flag-TR1-NTF-V5-Konstrukt resultierte in einer starken Freisetzung des TfR1-Cp, während die Verwendung der inaktiven Mutante zu einem kompletten Verschwinden des TfR1-Cp-Signals führte. Auch die Verwendung der SPPL2a führt zu einer höheren Freisetzung des TfR1-Cp im Vergleich zu den Kontrollzellen ohne überexprimierte SPPLs. Wobei das immunpräzipitierte TfR1-Cp bei der Koexpression des Flag-TfR1-NTF-V5 mit der katalytisch inaktiven SPPL2a D/A im Vergleich zur SPPL2a in einer Verringerung resultierte. Das dabei entstehende Signal ist immer noch stärker als bei den Kontrollzellen. Dieser Versuch bestätigte, dass das N-terminale Fragment des TfR1 hauptsächlich von der SPPL2b geschnitten wird und zu einem geringeren Teil von der SPPL2a. Weiterhin wurde mit den transfizierten HEK293-Zellen von Frau Fluhrer eine Membranlysatspräparation (4.2.7) durchgeführt, welche zum Schluss mit einer Methanol/Chloroformfällung zur Lipidfreisetzung und somit zur besseren Auftrennung der Membranproben in dem Gel behandelt wurde. In Abbildung 25 unterer Blot ist das Ergebnis des Versuches dargestellt. Die starken Banden zwischen 16 kDa und 22 kDa stellen das Vollängen-Flag-TfR1-NTF-V5, welches sich in der Membran befindet, dar. Während die schmale Bande oberhalb der 6 kDa Bande, welche bei der Überexpression von SPPL2b (Abb. 25, Spur 5) entstand, die intrazelluläre Domäne des TfR1 (TfR1-ICD) repräsentiert. Dieser Versuch wies zum ersten Mal die intrazelluläre Domäne des TfR1 in Membranlysaten nach. Während in den Abbildungen 21 und 22 das TfR1-V5-Cp-Signal bei der Koexpression mit SPPL2a und SPPL2b gleich stark erscheinen, ist in Abbildung 25 das TfR1-V5-Cp-Signal bei SPPL2b viel stärker als bei SPPL2a. Die Ursache könnte an der transienten Transfektion der Zellen mit SPPL2a und SPPL2b in den Abbildungen 21 und 22 liegen. Da bei der Abbildung 25 stabil transfizierte Zellen verwendet wurden, wäre es möglich, dass die Zellen die SPPLs unterschiedlich stark exprimieren.

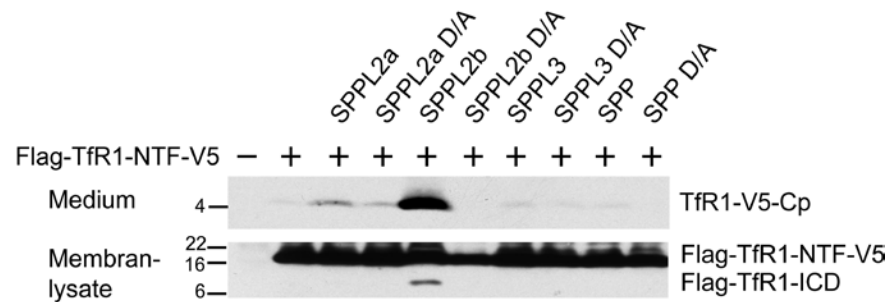


Abbildung 25. Koexpression der katalytisch aktiven und inaktiven SPPLs mit Flag-TfR1-NTF-V5. HEK293-Zellen, die stabil die angezeigten katalytisch aktiven und inaktiven (D/A) SPPLs exprimieren, wurden transient mit dem Flag-TfR1-NTF-V5 transfiziert. Das Medium wurde mit dem α -V5_m präzipitiert und in einem 16% igen Tricin-SDS-Gel aufgetrennt, die Detektion erfolgte mit dem α -V5_p. Für die Detektion der TfR1-ICD wurde die Membranpräparation der transfizierten Zellen auf ein 16% iges Tricin-SDS-Gel aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und mit dem α -Flag_m nachgewiesen.

5.7 LOKALISIERUNG VON TfR1-NTF UND DEN VERSCHIEDENEN SPPLs

Zur Überprüfung eventueller Kollokalisierungen von TfR1-NTF mit den SPPLs wurden Immunfluoreszenzen mit transient transfizierten SPPLs und Flag-TfR1-NTF-V5 durchgeführt (Abb. 26). Es konnte auch bei mehreren verschiedenen Expressionen von SPPL2a mit TfR1-NTF (Abb. 26A) keine Kollokalisierung beobachtet werden, die SPPL2a wurde hauptsächlich in Vesikeln rund um den Nukleus lokalisiert. Die SPPL2b liegt hauptsächlich in der Plasmamembran aber auch in Vesikeln rund um den Nukleus lokalisiert vor (Abb. 26B), dabei ist eine Kollokalisierung des TfR1-NTF mit der SPPL2b in der Plasmamembran zu beobachten. Bei der Clip/Snap-Technologie wurde ein Snap-tag, ein kleines 20 kDa großes DNA-Reparaturprotein, die O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase, an das TfR1-NTF oder an die SPPL fusioniert. Dieser Snap-tag reagiert spezifisch mit einem Fluoreszenz markierten Benzylguaninderivat, während der verwendete Clip-tag entwickelt wurde, um spezifisch Fluoreszenz markiertes O²-Benzylcytosin zu binden. Da beide tags spezifisch mit den orthogonalen Substraten reagieren, welche zellpermeabel sein können, ist eine gleichzeitige Inkubation in lebende Zellen möglich und zeitsparend. Mit Hilfe dieser Technologie konnte auch die Lokalisierung der katalytisch inaktiven SPPL2b D/A-Mutante und des TfR1-NTF in der Plasmamembran und in Vesikeln (Abb. 26C, SPPL2b D/A rot und TfR1-NTF grün) und der Kollokalisierung der beiden in der Plasmamembran gezeigt werden. Zudem wurde diese Technologie für die Lokalisierung der

SPPL3 mit dem TfR1-NTF verwendet (Abb. 26D, SPPL3 rot und TfR1-NTF grün). Dabei ist zu beobachten, dass die SPPL3 in Vesikeln nahe des Zellkerns exprimiert wird. Dies weist auf die Lokalisierung im endoplasmatischen Retikulum hin, und dass TfR1-NTF in der Plasmamembran und in einigen Vesikeln vorliegen. Eine Überlagerung der Signalaufnahmen zeigt keine Kollokalisierung der SPPL3 mit dem TfR1-NTF. Für die Lokalisierung der SPP wurde das Antikörperdetektionssystem verwendet. Die SPP wurde mit dem α -HA_p markiert, während das Flag-TfR1-NTF-V5 mit dem α -Flag_m detektiert wurde. Für die Visualisierung wurden der CAR-Alexa594 und der RAM-Alexa488 verwendet (Abb. 26E, SPP rot und Flag-TfR1-NTF-V5 grün). Bei dieser Markierung wurde das SPP im Zytoplasma detektiert und auch teilweise nahe der oder in der Plasmamembran lokalisiert gefunden, der TfR1-NTF ist in der Plasmamembran und auch in Vesikeln im Zytoplasma detektiert worden, es fand dabei eine mögliche Kollokalisierung mit dem N-terminalen Fragment des TfR1 nahe der Plasmamembran statt. Bei dieser Kollokalisierung ist nicht auszuschließen, dass sie nur aufgrund eines ungünstigen Schnitts der Zelle vorliegt.

Der Versuch des Nachweises einer Kollokalisierung von SPPL2b und dem TfR1-NTF mit Hilfe der Immunfluoreszenz war erfolgreich, leider gelang der Nachweis der Kollokalisierung mit der SPPL2a in der Immunfluoreszenz nicht. Dies kann mehrere Ursachen haben, zum einen ist es möglich, dass nur eine kleine Subpopulation von SPPL2a mit dem TfR1-NTF kollokalisiert z. B. in Lysosomen, zum anderen könnte der Effekt nur zeitweise auftreten z. B. in Abhängigkeit vom Zellwachstum.

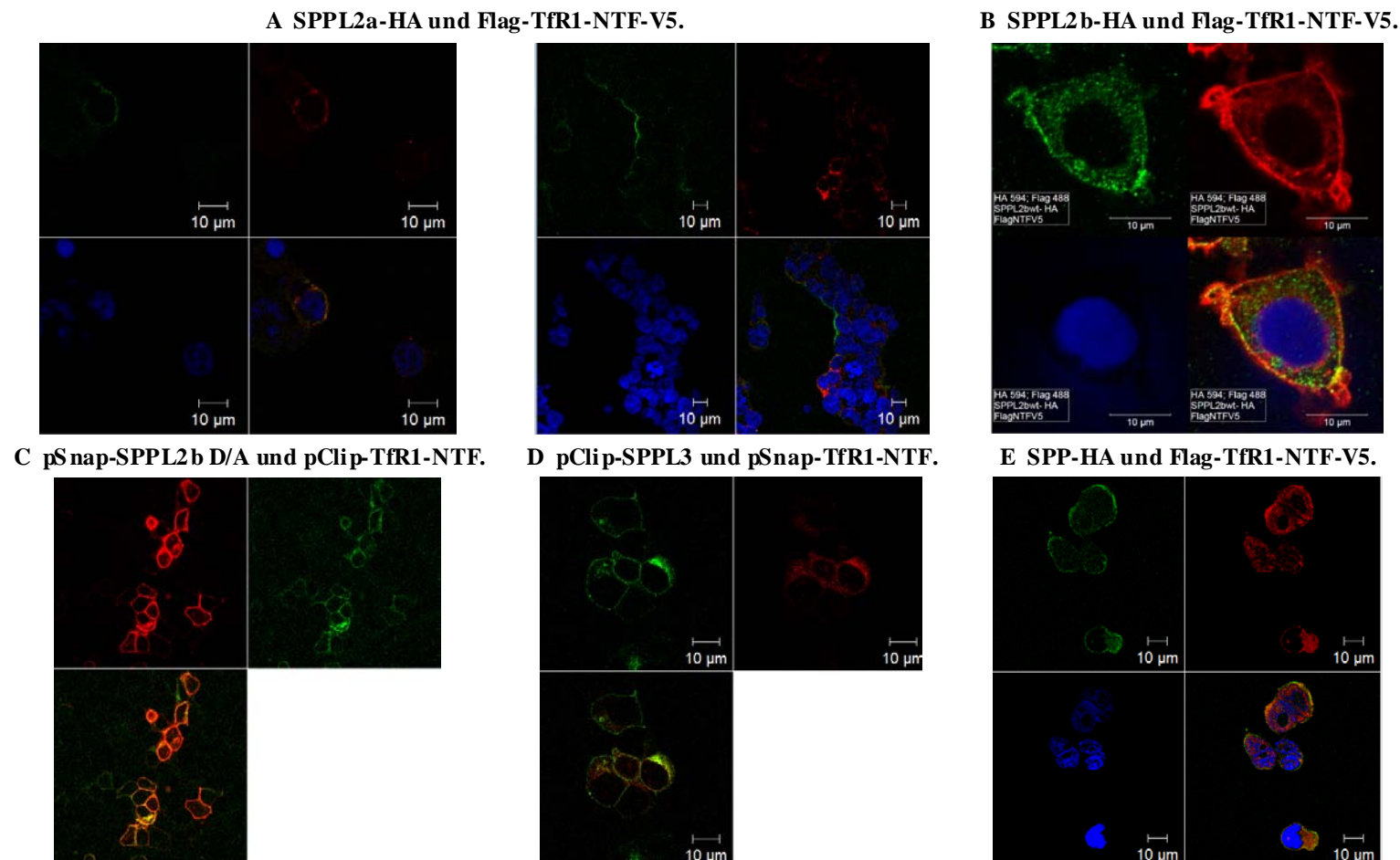


Abbildung 26. Lokalisierung und Orientierung des Flag-TfR1-NTF-V5 und SPPLs in transient exprimierenden HEK293 Zellen. Die Zellen wurden spezifisch mit einem α -Flag_m (1:300), einem α -V5_m (1:100) oder einem α -HA_p (1:100) behandelt, mit den RAM-AlexaFluor488 und CAR-AlexaFluor594 angefärbt und visualisiert durch die konfokale Laserscannmikroskopie. Bei der Snap/Clip-Technologie wurden die im Text angegebenen Fluoreszenzfarbstoffe verwendet. Die verschiedenen SPPLs sind immer rot und das TfR1-NTF grün angefärbt.

6 DISKUSSION

6.1 ENTDECKUNG DES TfR1-C-PEPTID

Als man in den 90er Jahren den Shedding Prozess des Transferrinrezeptors 1 (TfR1) entdeckte und 2004 die verantwortliche Protease, war das Schicksal des verbleibenden N-terminalen Fragments des TfR1 (TfR1-NTF) weiterhin unbekannt. Die Verwendung eines Flag-tags und eines V5-tags sollte das Auffinden des TfR1-C-Peptids (TfR1-Cp) mit Hilfe eines α -V5-Antikörpers und der intrazellulären Domäne (TfR1-ICD) mit Hilfe eines α -Flag-Antikörpers ermöglichen. Die Überprüfung der Lokalisierung und der Orientierung des hergestellten Flag-TfR1-NTF-V5-Konstrukts transfiziert in HEK293-Zellen ergab mit Hilfe der Verwendung eines nicht reduzierenden und eines reduzierenden Probenpuffers im Westernblot, dass das Konstrukt als über Disulfidbrücken verbundenes Dimer vorliegt. Die Immunfluoreszenz zeigte, dass sich das Konstrukt als ein Typ II Transmembranprotein, d. h. dass der Flag-tag intrazellulär und der V5-tag extrazellulär vorliegt, in der Plasmamembran und auch in einigen Vesikeln befindet. Dies entspricht dem Volllängen-TfR1, welcher ein homodimeres Typ II Transmembranprotein ist und hauptsächlich auf der Oberfläche von nahezu allen Zellen exprimiert wird. Zudem wird der TfR1 nach Bindung von ferri-Tf internalisiert und nach Freigabe des Eisens wieder zur Plasmamembran zurückgeführt (16, 19). Kaup et al. wiesen 2002 mit Hilfe einer Membranpräparation von HL60 Zellen nach, dass sich das TfR1-NTF als Dimer in Membranen befindet (46). Somit entspricht das Vorliegen des Flag-TfR1-NTF-V5 als Dimer in der Plasmamembran und auch teilweise in Vesikeln den Literaturdaten und kann für die Untersuchung der Hypothese, dass eine intramembranäre Proteolyse des TfR1-NTF erfolgt, verwendet werden.

Diese Hypothese konnte durch die Auffindung des TfR1-Cp bestätigt werden. Bei der Analyse der MALDI-TOF-MS-Daten konnte das TfR1-Cp als Peak bei 3275,696 Da identifiziert werden. Diese Masse ist durch zwei verschiedene Peptide darstellbar. Die Sequenz des Peptids wurde mit Hilfe einer Fragmentierung mittels MALDI-TOF-TOF-MS bestimmt. Diese Analyse zeigte y-Ionen, welche den Volllängen-V5-tag zeigten und b-Ionen, welche die Schnittstelle bei Tyrosin (Tyr)-85 darstellten. Die Fragmentierung ergab damit ein Peptid mit einem Volllängen-V5-tag, einem Schnitt zwischen dem Glycin (Gly)-84 und dem Tyr-85. Somit handelt es sich beim TfR1-Cp um ein oxidiertes Monomer mit intramolekularer Disulfidbrücke. Interessanterweise erschien das TfR1-Cp in allen gemessenen Proben als oxidiertes Monomer. Da natürlich auch andere Redoxformen möglich sind, kann im Moment

nicht ausgeschlossen werden, dass das Peptid reduziert vorliegt und durch den Aufreinigungsprozess reoxidiert wurde. Somit kann es sich bei der nativen Form des TfR1-Cp auch um ein reduziertes Monomer oder ein oxidiertes Dimer mit zwei Disulfidbrücken handeln. Das TfR1-NTF wird zwischen dem Gly-84 und dem Tyr-85 direkt neben einem GxxxG-Motiv geschnitten, welches als Dimerisierungsmotiv gilt und die Spezifität der γ -Sekretasespaltung moduliert (92, 93). Dieses Motiv findet sich auch in dem *British dementia* Protein (Bri2), einem Typ II Transmembranprotein, für das ebenfalls gezeigt werden konnte, dass es einem Shedding durch eine ADAM-Protease und der anschließenden regulierten intramembranären Proteolyse (RIP) durch die SPPL2a und SPPL2b unterliegt (73). Das GxxxG-Motiv, an dem die Spaltung stattfindet, ist hoch-konserviert zwischen den Spezies in der Transmembrandomäne des TfR1 (Tab. 6), dies weist auf eine wichtige Bedeutung der intramembranären Proteolyse des TfR1 hin. Für Bri2 konnte durch eine Mutation aller Glycine in der Transmembrandomäne zu Alanin (Ala) innerhalb des GxxxG-Motivs gezeigt werden, dass das mutierte Bri2 sich richtig in die Membran einsortieren, es aber keine intramembranäre Spaltung mehr statt findet. Um herauszufinden, welches Gly dafür verantwortlich ist, wurde das erste Gly des GxxxG-Motivs zu einem Ala mutiert. Auch diese Mutation führte zu einer richtigen Sortierung in die Membran jedoch nicht zu einer signifikanten Reduzierung der RIP. Daher wurde das Gly-60, welches sich N-terminal in der Transmembrandomäne des Bri2 befindet, zu einem Ala-60 mutiert, dies führte zu einer Abnahme der RIP aufgrund eines Helix destabilisierenden Effekts (87). Am Beginn der Transmembrandomäne des TfR1 befindet sich ebenfalls ein Gly-69, welches mit dem Gly-60 in Bri2 korreliert und in höheren Vertebraten konserviert ist. Inwiefern das Gly-69 oder das GxxxG-Motiv die intramembranäre Proteolyse beeinflussen, bleibt mit Mutationsanalysen zu klären.

Tabelle 6. Konservierte Transmembrandomänen von TfR1 in verschiedenen Spezies. Die graue Schattierung zeigt die hoch konservierte Region, in der die intramembranäre Proteolyse stattfindet inklusive dem GxxxG-Motiv; die schwarze Linie zeigt die Schnittstelle.

Spezies	Trivialname	TfR1-TMD
Homo sapiens	Mensch	YGTIAVIVFFLIGFMIGYLG Y
Pongo abelii	Orang-Utan	YGTIAV I IFFLIGFMIGYLG Y
Macaca mulatta	Rhesusaffe	YGTIAV I IFFLIGFMIGYLG Y
Bos taurus	Rind	YGI I AVIVFFLIGFMIGYLG Y
Sus scrofa	Schwein	YGI I AVITFFLIGFMIGY L AY
Felis catus	Katze	YGTIA I ILFFLIGFMIGYLG Y
Mus musculus	Maus	FAA I ALV I FFLIGFMSGYLG Y
Rattus norvegicus	Ratte	FATIAV V IFFLIGFMIGYLG Y
Gallus gallus	Huhn	FLVIAAV L LLLLIGFLIGYLS Y
Danio rerio 1a	Zebrafisch	GFVVG I LLLLFLFGYLIGYMS N
Danio rerio 1b	Zebrafisch	VCVGA A LLVFLVGLLIGYS V H

Kleine Peptide wie das TfR1-Cp können als systemisches eisenregulierendes Hormon agieren, ähnlich dem Hepcidin, bei dem es sich um ein kleines Peptid mit 25 AS und vier Disulfidbrücken handelt. Hepcidin kontrolliert negativ den Eisentransport via Ferroportin (Fpn) aus eisenexportierendem Gewebe ins Plasma, indem es an Fpn bindet und die Endozytose und die Degradation des Fpn einleitet (26, 28). Hepcidin ist auch bekannt als antimikrobielles Peptid, das mit der Inflammation assoziiert wird, in diesem Fall wird es durch Interleukin 6 reguliert (94). Die Regulation des Hepcidin über den eisengetriebenen Weg wird von dem *bone morphogenetic protein-6* (BMP6) vermittelt, dabei bindet BMP6 an das Hemojuvelin, welches ein Teil des BMP-Rezeptorkomplexes ist, und dies resultiert anschließend in der Transkription von Hepcidin über den SMAD-Signalweg (zusammengefasst in (95)). Das Shedding des membrangebundenen Hemojuvelins am Arginin (Arg)-288 durch die Matriptase-2 inhibiert den SMAD-Signalweg und somit die Hepcidinexpression (96, 97). Die Quelle des BMP6 und der Mechanismus, wie es durch Eisen reguliert wird, bleiben ungeklärt.

Das Hämochromatoseprotein HFE ist in der Lage beide Transferrinrezeptoren, TfR1 und TfR2, zu binden. Bei erhöhter Transferrinsättigung (Tf-Sättigung) konkurrieren eisenbeladenes Tf (Fe-Tf) und HFE um die Bindung an TfR1, dabei wird HFE von der Bindung an TfR1 frei, bindet an TfR2 und induziert dadurch auf einem noch nicht näher beschriebenen

Weg die Hfeidinxpression (98). Experimente mit HFE-knockout-Mäusen zeigten, dass HFE nicht direkt in die BMP6-Regulation durch Eisen involviert ist, es reguliert das Downstreamsignal von eisenreguliertem BMP6 (99). Es müssen somit andere Signale für die eisenabhängige Regulierung des BMP6 verantwortlich sein. Der Serum-TfR1 (sTfR1) spiegelt die Balance zwischen der funktionellen Eisenverfügbarkeit und dem Eisenbedarf (100), somit kann das TfR1-Cp als Regulator im systemischen Eisenmetabolismus agieren und wichtig für das Verständnis des grundsätzlichen Mechanismus ebenso wie für die diagnostische und therapeutische Bestimmung sein. Eisenmangel führt zu einem verstärkten Shedding des TfR1 (101), somit zu einer Erhöhung des sTfR1 und folglich ebenfalls zu einer Erhöhung des TfR1-Cp und der TfR1-ICD, zudem führt Eisenmangel zu einer verringerten Hfeidinkonzentration.

6.2 ENTWICKLUNG VON NACHWEISMETHODEN

Zur Etablierung eines ELISAs zur Detektion des TfR1-Cp im Serum und somit zur Aufklärung, ob das TfR1-Cp mit Krankheiten korreliert, wurden polyklonale Antikörper in Kaninchen generiert. Mit Hilfe von biotinyliertem TfR1-Cp konnten α -TfR1-Cp-Antikörper im Kaninchenserum erfolgreich nachgewiesen werden, auch bei einer Verdünnung von 1:20.000 konnte ein mittelstarkes Signal erreicht werden. Dies wies darauf hin, dass viele α -TfR1-Cp-Antikörper im Kaninchenserum vorhanden waren. Ein Kompetitionsassay mit steigenden Konzentrationen TfR1-Cp im Kaninchenserum bestätigte mit einer Konzentrationsabhängigkeit das Vorhandensein von α -TfR1-Cp-Antikörpern. Die steigenden Signale bei der Verwendung von 2000 ng und 5000 ng sind eventuell auf eine Aggregation des TfR1-Cp zurückzuführen, welches in dem Fall einer Competition nicht mehr zur Verfügung stehen könnte. Die Aufreinigung eines Antikörperpools aus dem Kaninchenserum mit Hilfe von ProteinA-Sepharose erfolgte bei einem pH von 4,5 und 3,5, die vereinigten Fraktionen wurden anschließend über eine mit TfR1-Cp Biotin-gekoppelte Agarose gegeben, dabei konnte keine weitere Aufreinigung der α -TfR1-Cp-Antikörper erreicht werden. Dies lag eventuell an der sterischen Hinderung des Biotins oder an einer zu starken Bindung der Antikörper an die TfR1-Cp-Biotin-Agarose. Eine genauere Betrachtung der Seitenketten des TfR1-Cp ergab, dass zwar die beiden Cysteine 89 und 98 gut über die Aminosäuresequenz verteilt vorliegen, aber für eine Kopplung des TfR1-Cp zur Aufreinigung der Antikörper ungeeignet sind aufgrund der möglichen Strukturbeeinflussung des Peptids. Weiterhin befinden sich Carboxylgruppen in der Peptidsequenz, diese verteilen sich aber hauptsächlich auf der C-terminalen Seite des Peptids. Anhand der Peptidsequenz konnte man erkennen, dass die

Amingruppen sehr gleichmäßig vom N-Terminus zum C-Terminus verteilt vorliegen und so gekoppeltes TfR1-Cp mehrere mögliche Bindungspunkte für die TfR1-Cp Antikörper aus dem α -Cp Pool bietet. Aus diesem Grund wurde NHS-Sepharose verwendet, da sie die Möglichkeit bietet, die Amingruppen direkt an die Sepharose zu koppeln. Mit Hilfe der TfR1-Cp-gekoppelten NHS-Sepharose konnten die α -TfR1-Cp-Antikörper erfolgreich aus dem α -Cp Pool aufgereinigt werden, da die Elution der Antikörper von der Sepharose gelang. Weiterhin konnten im Durchfluss der Aufreinigung kaum weitere bindungsfähige Antikörper detektiert werden. Die Titrierung des anti-TfR1-Cp AK 1–4 ergab eine sehr starke TfR1-Cp Bindung mit einer Nachweisgrenze im ELISA von ungefähr 1 ng TfR1-Cp. Die Konzentration der aufgereinigten Antikörper konnte mit Hilfe eines Proteinbestimmungsassays nicht bestimmt werden, da die Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze des Proteinbestimmungsassays lag. Trotz geringer Antikörpermenge ist der α -TfR1-Cp AK 1–4 bis zu einer Verdünnung von 1:20.000 einsetzbar.

Zudem wurde der α -Cp Pool auf die Verwendung zur Immunodetektion im Dotblot mit verschiedenen TfR1-Cp Mengen getestet. Mit Hilfe eines Dotblots wurden sowohl bei der Nitrozellulosemembran als auch bei der PVDF-Membran gute Resultate erzielt, es konnte keine unspezifische Proteinbindung nachgewiesen werden. Für den α -TfR1-Cp AK 1–4 ist die Verwendung der PVDF-Membran für einen Westernblot nicht empfehlenswert, da es zu unspezifischen Bindungen des Antikörpers auf der Membran gekommen ist, dies wurde nicht bei der Verwendung der Nitrozellulosemembran beobachtet. Für die Übertragung der Proteine aus dem Gel auf eine Membran wurde der Nassblot verwendet. Dabei ist zu beobachten, dass geringe Mengen TfR1-Cp länger geblottet werden müssen als höhere Mengen. Dies erschwert teilweise die Wiederfindung des TfR1-Cp, es ist daher empfehlenswert beim Blotten zwei Membranen übereinanderzulegen, um eventuell durchgeblottetes TfR1-Cp abzufangen. Zudem sollte ungefähr 30 min lang geblottet werden, um auch geringere TfR1-Cp-Mengen zu detektieren.

Um TfR1-Cp im menschlichen Serum nachzuweisen und zu quantifizieren, wurde ein Sandwich-ELISA mit Hilfe der generierten und aufgereinigten Antikörper etabliert. Um einen Sandwich-ELISA einzuführen, benötigt man zwei verschiedene Antikörper. Da aber ein erster Versuch einer Generierung eines monoklonalen TfR1-Cp-Antikörpers mit Hilfe eines Panningexperiments fehlschlug, wurden polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen verwendet. Aufgrund der hohen Diversität der möglichen Epitope ist die Wahrscheinlichkeit für die Bildung eines Sandwich-ELISA groß. Ein Zweitantikörper gegen das TfR1-Cp war jedoch nicht vorhanden, daher wurde der α -Cp Pool mit einer Meerrettichperoxidase ge-

koppelt. Es war möglich unmarkiertes TfR1-Cp mit Hilfe des Sandwich-ELISA zu detektieren, dabei war das Detektionslimit höher als im direkten Assay, bei dem TfR1-Cp an der Platte beschichtet vorlag. Dies weist auf eine sterische Hinderung bei der Bindung der beiden Antikörper an das kleine TfR1-Cp hin oder auf eine ungenügende Bindung aufgrund der nicht-TfR1-Cp-bindenden Antikörper im α -Cp Pool. Die Verwendung des Sandwich-ELISA ist aber im Prinzip möglich. Ob die konzentrationsabhängigen Signale im Sandwich-ELISA spezifisch für die aufgereinigten Antikörper sind, wurde mit einem Kompetitionsassay überprüft. Durch die Verwendung des α -TfR1-Cp AK 1–4 als Fängerantikörper konnten nicht-TfR1-Cp-bindende Antikörper ausgeschlossen werden. Mit Hilfe von unmarkierten und biotinmarkierten TfR1-Cp konnte eine hohe Spezifität des Sandwich-ELISA gezeigt werden. Der fünffache Überschuss des unmarkierten TfR1-Cp reduzierte das Signal des biotinmarkierten TfR1-Cp auf die halbmaximale Größe. Die kompetitive Beschichtung resultierte in einem leichten Abfall des Signals aufgrund der limitierten Oberfläche der ELISA-Platte. Obwohl beide Experimente, d. h. die Entwicklung des Sandwich-ELISA und die Spezifität des Sandwich-ELISA aufgrund der verschiedenen Detektionssysteme (Antikörper-Peroxidase und Streptavidin-Peroxidase) nicht direkt miteinander verglichen werden können, zeigte die Verwendung des α -TfR1-Cp AK 1–4 eine Verbesserung des Detektionslimits, da 1 ng des Biotin-TfR1-Cp die gleiche Signalstärke aufweisen wie 200 ng unmarkiertes TfR1-Cp auf mit α -Cp Pool beschichteten Mikroplatten. Obwohl gezeigt werden konnte, dass der Sandwich-ELISA sensitiv und spezifisch für den TfR1-Cp ist, war es nicht möglich gespiktes TfR1-Cp in humanem Serum nachzuweisen. Weitere Experimente zeigten, dass das TfR1-Cp an Albumin im Serum bindet. Der Proteinanteil in humanem Serum liegt bei 7 % davon macht Albumin bis zu 65 % aus. Albumin ist bekannt als Träger für eine große Anzahl von endogenen und exogenen Liganden wie Fettsäuren, Hormone, Ionen, Medikamente und ihre Metaboliten (102). Die Inkubation des TfR1-Cp mit verschiedenen Konzentrationen Albumin, wobei auch die serummolaren Mengen an Albumin verwendet wurden, resultierte in einer signifikanten Reduzierung der Signalstärke. Dies ist bedingt durch die wenigen Bindungsstellen am nur 16 Aminosäure langen TfR1-Cp, die für Albumin und zwei Antikörpern gleichzeitig nicht ausreichen. Um das TfR1-Cp im Serum nachweisen zu können, muss erst die Bindung zum Albumin aufgehoben werden. Mit Hilfe der MALDI-TOF-MS-Analysen konnte gezeigt werden, dass es sich nicht um eine kovalente Bindung zwischen dem TfR1-Cp und dem Albumin handelt. Dies entspricht dem Wissen, dass Albumin in der Lage ist, Liganden durch die Bildung von nichtkovalenten Komplexen an spezifischen Bindungsstellen zu binden und zu transportieren (102). Diese Bindung ist eventuell für die Störung der

Detektion in humanem Serum verantwortlich. Um die Bindung zu beeinträchtigen und TfR1-Cp im Serum nachweisen zu können, wurde ein Vorversuch mit Harnstoff zur Denaturierung durchgeführt, dieser konnte jedoch die Bindung zwischen dem Albumin und dem TfR1-Cp nicht hinreichend aufheben. Eine weitere Möglichkeit zur Störung der Bindung könnte die Verwendung von organischen Lösungsmitteln sein. Zudem wäre Bromphenolblau eine weitere Einsatzmöglichkeit, welches das Bilirubin, ein Metabolit von Häm, bei der Bindung zu Albumin ersetzt und somit die Bindung stört (103). Interessanterweise wirkt das Albumin antioxidierend (104-106). Eine neue Studie bewies, dass das Cys-34 des Albumin zumeist reduziert vorliegt und für die antioxidierende Wirkung verantwortlich ist (107). Somit wäre es interessant zu überprüfen, ob das Cys-34 im verwendeten Albumin reduziert vorliegt und ob TfR1-Cp an das reduzierte Cys-34 bindet.

Hepcidin, ein Hormon im Eisenmetabolismus, bestehend aus 25 Aminosäuren mit 8 intramolekularen Disulfidbrücken, bindet ebenfalls an Albumin; für einen Nachweis von Hepcidin in biologischen Flüssigkeiten wurden einige Methoden entwickelt (108-111), auch einige Quantifizierungsmethoden wurden zum Beispiel mit Hilfe der Massenspektrometrie und auch von Immunoassays geplant (112-121). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass das urinale Hepcidinlevel im Laufe des Tages ansteigend und wieder abnehmend ist (113). Es wäre folglich interessant, ob man das TfR1-Cp im Urin nachweisen kann und ob es wie das Hepcidin tagesverlaufabhängig ist.

6.3 INTRAMEMBRANÄRE PROTEOLYSE VON TfR1-NTF DURCH SPPL2A UND SPPL2B

In dieser Arbeit konnte nicht nur gezeigt werden, dass das TfR1-NTF einer intramembranären Spaltung unterliegt, indem das Vorhandensein des TfR1-Cp nachgewiesen wurde, es war auch möglich die verantwortliche Proteaseklasse der endogenen Protease und die verantwortlichen Proteasen selbst zu identifizieren.

Mit Hilfe verschiedener Inhibitoren konnten die unterschiedlichen intramembranären Spaltungsproteasen (I-CLiP) inhibiert und so die Proteaseklasse der endogenen Protease bestimmt werden. Mittels des Metalloproteaseinhibitors 1,10-Phenanthrolin, welcher die *site-2* Protease inhibiert (122), wurde die Menge des freigesetzten TfR1-C-Peptids im Medium im Vergleich zu den Kontrollzellen nicht verändert. Dies konnte ebenfalls bei der Verwendung des Serinproteaseinhibitors Dichloroisocoumarin, welcher die Rhomboidprotease inhibiert (82, 123), gezeigt werden. Somit gehört die endogene Protease nicht den Serin- oder Metallo-

proteasen an. Für die GxGD-Aspartylproteasen konnten verschiedene Gruppen zeigen, dass (Z-LL)₂-Keton die Signalpeptidpeptidase (SPP) und die Signalpeptidpeptidase ähnlichen Proteasen (SPPL) 2a und 2b, aber nicht die γ -Sekretase inhibieren (71-73, 124), während L685,458 die γ -Sekretase, SPP und SPPL2a/2b inhibiert (55, 71, 73, 125). DAPT inhibiert nur die γ -Sekretase Aktivität aber nicht die Aktivität der SPP und der SPPL2a/2b (55, 71, 125). Die Verwendung der Inhibitoren (Z-LL)₂-Keton und L685,458 zeigte eine stark reduzierte endogene Freisetzung des Tfr1-Cp. Die Verwendung des DAPT hingegen führte zu keinem Effekt auf die Tfr1-Cp Freisetzung, da das Signal des immunpräzipitierten Tfr1-Cp dem Signal in den Kontrollzellen entsprach. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der Tfr1-Cp-Freisetzung mit dem (Z-LL)₂-Keton konzentrationsabhängig ist. Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass ein Mitglied der GxGD-Aspartylprotease, genauer ein Mitglied der SPP/SPPL-Familie in die intramembranäre Spaltung des Tfr1-NTF involviert ist. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurden HEK293-Zellen verwendet, die stabil mit dem Flag-Tfr1-NTF-V5 transfiziert waren und mit den verschiedenen SPPLs und den katalytisch inaktiven Mutanten von SPPL2a D/A und SPPL2b D/A transient transfiziert wurden. Das konditionierte Medium wurde anschließend auf Tfr1-Cp-Freisetzung untersucht. Nur die Expression der katalytisch aktiven SPPL2a und SPPL2b zeigte eine verstärkte Freisetzung des Tfr1-Cp, während die Verwendung der katalytisch inaktiven SPPL2b D/A zu einem vollständigen Verschwinden des Tfr1-Cp und die der katalytisch inaktiven SPPL2a D/A zu einer Reduzierung des Tfr1-Cp führte. Dies deutet stark daraufhin, dass diese beiden I-CLiPs in der Prozessierung des Tfr1-NTF involviert sind und SPPL2b als Hauptprotease dient, während SPP und SPPL3 nicht für die Spaltung des Tfr1-NTF verantwortlich sind.

Aus diesem Grund wurden für die Identifizierung der Tfr1-ICD HEK293-Zellen verwendet, die keine SPPL (GM), die SPPL2b oder die katalytisch inaktive SPPL2b D/A Mutante überexprimieren. Um den Abbau der Tfr1-ICD im Proteasom zu verhindern wurde der Inhibitor Epoxomicin verwendet. Dieser inhibiert hauptsächlich die chymotrypsinähnliche Aktivität aber auch die trypsinähnliche Aktivität, Epoxomicin inhibiert nicht die nichtproteasomalen Proteasen (126). Weiterhin wurde Lactacystein als Inhibitor für das 26S-Proteasom (127) verwendet. Es konnte mit Hilfe beider Inhibitoren keine Tfr1-ICD in den Zelllysaten gefunden werden. Die Verwendung des (Z-LL)₂-Keton sollte bestätigen, dass die Inhibierung der SPPL2b zu keiner Freisetzung der Tfr1-ICD führt.

Frau Fluhner (DZNE, LMU, München) konnte in den von ihr etablierten HEK293-Zellen, welche SPPL2a, 2b, 3 und SPP sowie deren katalytisch inaktive Mutanten stabil exprimieren (73), das Ergebnis mit einem transient exprimierendem Flag-TfR1-NTF-V5 bestätigen. Im Gegensatz zu SPPL2a, führte die Expression von SPPL2b mit dem Flag-TfR1-NTF-V5 Konstrukt, zu einer stärkeren Generierung des TfR1-Cp und des TfR1-ICD, zudem konnte die katalytisch inaktive Mutante der SPPL2b D/A zu einer kompletten Verhinderung der Bildung des TfR1-Cp führen. Diese Ergebnisse zusammengenommen zeigen, dass das TfR1-NTF hauptsächlich von der SPPL2b, aber auch von der SPPL2a geschnitten wird und zur Freisetzung von TfR1-Cp und dem TfR1-ICD führt. SPPL2a wird hauptsächlich in späten endosomalen und in lysosomalen Kompartimenten exprimiert (72, 128, 129), während SPPL2b in der Plasmamembran aber auch im sekretorischen Weg lokalisiert vorliegt (72, 128), dies konnte in der Immunfluoreszenz bestätigt werden. Der TfR1 wird sehr effizient von den Endosomen zur Plasmamembran recycelt und kehrt nicht zum trans-Golginetzwerk oder zu anderen biosynthetischen Kompartimenten zurück (130). Daraus kann geschlossen werden, dass der TfR1 mehr in direkten Kontakt zur SPPL2b in der Plasmamembran als zur SPPL2a steht. Nur ein kleiner Anteil des TfR1 ko lokalisiert mit der SPPL2a, wenn der TfR1 zur lysosomalen Degradierung in die Lysosomen sortiert wird, mit Hilfe der Immunfluoreszenz konnte diese Kollokalisierung jedoch nicht nachgewiesen werden. Dies könnte an einer geringen Transfektionsrate der SPPL2a liegen oder daran, dass nur ein geringer Anteil der SPPL2a mit dem TfR1-NTF für die Spaltung kollokalisiert. Die Beobachtung, dass die Expression der katalytisch inaktiven Mutante SPPL2a D/A zu einer Abnahme und nicht zu einem Verschwinden des TfR1-Cp führt, könnte aus einer Kollokalisierung mit einem Teil der TfR1-NTF in späten Endosomen oder in Lysosomen oder einer Lokalisierung der SPPL2a in frühen Endosomen resultieren. Die Lokalisierungen der SPP und der SPPL3 in Vesikeln ist konsistent mit der Literaturangabe, nach der beide hauptsächlich in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) und dem Golgi zu finden sind (128). Während SPP die Signalpeptide von Proteinen in der ER Membran entfernt (51), konnte noch kein Substrat für die SPPL3 identifiziert werden. Es wird vermutet, dass SPPL3 ebenfalls in der Entfernung von Signalpeptiden wie SPP involviert ist (73).

Für das Typ II Membranprotein Fas Ligand (FasL) konnte gezeigt werden, dass es von der SPPL2a geschnitten wird, weiterhin wurde gezeigt, dass die synthetische intrazelluläre Domäne (ICD) in den Nukleus transloziert und die Gentranskription inhibiert (74). Für den Tumornekrosefaktor α (proTNF α), welcher zuerst von ADAM 10 (131) und von der ADAM 17 (132) und anschließend von der SPPL2a und SPPL2b (71, 72) geschnitten wird, konnte

gezeigt werden, dass die TNF α -ICD die Produktion des proinflammatorischen Zytokins Interleukin 12 auslöst (72). Auch Bri2 wird zuerst von ADAM 10 geschnitten und anschließend von den SPPL2a und SPPL2b prozessiert (73). Die Bri2-ICD wurde in Zelllysaten gefunden, welche Funktion sie ausführt oder ob die weitere Prozessierung zur Degradierung des Proteins gehört, ist nicht weiter beschrieben (73). Frau Fluhner konnte aufgrund ihrer Expertise im Wiederfinden der TNF α -ICD und der Bri2-ICD (71, 73) auch die ICD des TfR1 (TfR1-ICD) in Membranlysaten von mit SPPL2b überexprimierenden HEK293 Zellen finden. Im Falle der TfR1-ICD kann nicht ausgeschlossen werden, dass sie auch in den Nukleus transloziert und nur noch nicht dort gefunden werden konnte. In einigen Publikationen wurde beschrieben, dass Palmytylierungen wichtig für Lipid Raft Assoziierung ist. Erst vor kurzem beschrieben Levental et al., dass ein Großteil von integralen Raftproteinen, die sich im Raft anreichern, abhängig von Palmytylierungen an zwei juxtamembranen Cysteinen sind und die Anreicherung durch Oligomerisierung verstärkt werden kann (133). Obwohl der TfR1 nicht in den Lipid Rafts lokalisiert ist (134) und als nicht-Lipid-Raft-Marker benutzt wird, ist der Vollängen-TfR1 an zwei juxtamembranen Cysteinen palmytyliert, welche mit der Inhibierung der rezeptorvermittelten Endozytose assoziiert sind (135). Da diese Palmytylierung innerhalb der TfR1-ICD lokalisiert ist, kann man darüber spekulieren, ob das Shedding und die intramembranäre Proteolyse des TfR1 eher zu einer Aggregation der TfR1-ICD in den Lipid Rafts führt als zu einer Migration in den Nukleus. Mit der Existenz der TfR1-ICD in der Membran könnte man für eine mögliche Rolle im Lipid Raft Signalling argumentieren. Das wird untermauert durch die Beobachtung, dass auch andere wichtige Proteine des Eisenstoffwechsels wie das Ferroportin in Rafts und in detergenzresistenten Membranen in Makrophagen (136) gefunden wurden. Eine Rolle der TfR1-ICD in Lipid Rafts ist vorstellbar und sollte in die Überlegungen für zukünftige Untersuchungen mit einbezogen werden. Bei Eisenmangel wird der TfR1 vermehrt gescheddert, dies führt zu einer erhöhten sTfR1-Freisetzung aus Zellen (101) und sollte somit zu einer erhöhten Freisetzung der TfR1-ICD und des TfR1-Cp führen. Der Einfluss der TfR1-ICD in der zellulären Regulation des Eisenstoffwechsels sollte untersucht werden, sie könnte die Zelle auf einen Eisenmangelzustand vorbereiten, während die TfR1-Cp wie beschrieben als möglicher systemischer Regulator fungieren könnte. Das freigesetzte TfR1-Cp könnte dann bei den retikuloendothelialen Makrophagen und/oder an der basolateralen Seite der Enterozyten an Ferroportin binden, was zur Stabilisierung des Ferroportin führen könnte und so zur Eisenfreisetzung in das Serum. Dies führt zu einem ansteigenden Fe-Tf-Spiegel im Blut, das Fe-Tf bindet anschließend aufgrund der hohen Bindungsaffinität an das TfR1, und es findet kein Shedding des TfR1 mehr statt (100). Zudem führt

die Fe-Tf-Bindung an TfR1 zur Freisetzung des HFE, welches nun mit dem TfR2 und Hemojuvelin interagieren kann (98) und über einen noch unbekanntem Mechanismus zu einem Anstieg des Heparin führt und somit zu einer Degradierung des Ferroportin und zur Beendigung der Eisenfreisetzung (137, 138). Es handelt sich bei der eben beschriebenen Rolle für das TfR1-Cp um eine rein spekulative Hypothese. Zum einen müsste die Annahme, dass es sich bei der intramembranären Proteolyse des TfR1-Cp um einen eisenabhängigen Vorgang handelt, geklärt werden, zum anderen wäre interessant, ob die Bindung zu HFE die intramembranäre Proteolyse beeinflusst. Weiterhin müsste die Bindung des TfR1-Cp an Ferroportin nachgewiesen werden.

Mit Hilfe dieser Arbeit konnte erstmals eine Prozessierung des N-terminalen Fragments des TfR1, das nach Shedding der extrazellulären Domäne in der Membran zurückbleibt, nachgewiesen werden. Das N-terminale Fragment unterliegt einer intramembranären Spaltung durch die Signalpeptidase ähnlichen Proteasen SPPL2b und der SPPL2a. Weiterhin wurde das C-terminale Fragment (TfR1-Cp) dieser Spaltung im Medium entdeckt und seine Sequenz identifiziert. Mittels der generierten Antikörper gegen das TfR1-Cp wurde ein Sandwich-ELISA etabliert, der für die Korrelation der Serumkonzentration des TfR1-Cp bei verschiedenen Krankheiten, speziell im Eisenstoffwechsel, verwendet werden könnte. Die Detektion des intrazellulären Fragments (TfR1-ICD), welches bei dieser intramembranären Spaltung entsteht, in Membranlysaten stellt eine wichtige Grundlage für weitere Forschungen dar, in deren Mittelpunkt eine mögliche Aggregation der TfR1-ICD in Lipid Rafts sowie die Bedeutung dieser Domäne in der zellulären Eisenregulierung stehen sollte.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Aisen, P., Enns, C., and Wessling-Resnick, M. (2001) Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism, *Int J Biochem Cell Biol* 33, 940-959.
2. Koppenol, W. H. (1993) The centennial of the Fenton reaction, *Free Radic Biol Med* 15, 645-651.
3. Galaris, D., and Pantopoulos, K. (2008) Oxidative stress and iron homeostasis: mechanistic and health aspects, *Crit Rev Clin Lab Sci* 45, 1-23.
4. Kell, D. B. (2009) Iron behaving badly: inappropriate iron chelation as a major contributor to the aetiology of vascular and other progressive inflammatory and degenerative diseases, *BMC Med Genomics* 2, 2.
5. Andrews, N. C. (1999) Disorders of iron metabolism, *N Engl J Med* 341, 1986-1995.
6. Olsson, K. S., and Norrby, A. (2008) Comment to: Hepcidin: from discovery to differential diagnosis. *Haematologica* 2008; 93:90-7, *Haematologica* 93, e51; discussion e52.
7. Wang, J., and Pantopoulos, K. (2011) Regulation of cellular iron metabolism, *Biochem J* 434, 365-381.
8. Forth, W., Rummel, W., and Andres, H. (1968) [On the problem of regulating the iron resorption by gastroferrin, an iron binding protein of the gastric juice], *Klin Wochenschr* 46, 1003-1005.
9. McKie, A. T., Barrow, D., Latunde-Dada, G. O., Rolfs, A., Sager, G., Mudaly, E., Mudaly, M., Richardson, C., Barlow, D., Bomford, A., Peters, T. J., Raja, K. B., Shirali, S., Hediger, M. A., Farzaneh, F., and Simpson, R. J. (2001) An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron, *Science* 291, 1755-1759.
10. Fleming, M. D., Romano, M. A., Su, M. A., Garrick, L. M., Garrick, M. D., and Andrews, N. C. (1998) Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 1148-1153.
11. Andrews, N. C. (1999) The iron transporter DMT1, *Int J Biochem Cell Biol* 31, 991-994.
12. Donovan, A., Lima, C. A., Pinkus, J. L., Pinkus, G. S., Zon, L. I., Robine, S., and Andrews, N. C. (2005) The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis, *Cell Metab* 1, 191-200.
13. Griffiths, T. A., Mauk, A. G., and MacGillivray, R. T. (2005) Recombinant expression and functional characterization of human hephaestin: a multicopper oxidase with ferroxidase activity, *Biochemistry* 44, 14725-14731.
14. Brittenham, G. M. (1994) The red cell cycle, in *In Iron Metabolism in Health and Disease* (ed., J. H. B. e., Ed.), pp 31-62, London: W.B. Saunders Company Ltd.
15. Ponka, P., and Lok, C. N. (1999) The transferrin receptor: role in health and disease, *Int J Biochem Cell Biol* 31, 1111-1137.
16. Dautry-Varsat, A., Ciechanover, A., and Lodish, H. F. (1983) pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 2258-2262.
17. Ohgami, R. S., Campagna, D. R., Greer, E. L., Antiochos, B., McDonald, A., Chen, J., Sharp, J. J., Fujiwara, Y., Barker, J. E., and Fleming, M. D. (2005) Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells, *Nat Genet* 37, 1264-1269.
18. Richardson, D. R., Lane, D. J., Becker, E. M., Huang, M. L., Whitnall, M., Suryo Rahmanto, Y., Sheftel, A. D., and Ponka, P. Mitochondrial iron trafficking and the

- integration of iron metabolism between the mitochondrion and cytosol, *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 10775-10782.
19. Klausner, R. D., Van Renswoude, J., Ashwell, G., Kempf, C., Schechter, A. N., Dean, A., and Bridges, K. R. (1983) Receptor-mediated endocytosis of transferrin in K562 cells, *J Biol Chem* 258, 4715-4724.
 20. Vanderpuye, O. A., Kelley, L. K., and Smith, C. H. (1986) Transferrin receptors in the basal plasma membrane of the human placental syncytiotrophoblast, *Placenta* 7, 391-403.
 21. Tsunoo, H., and Sussman, H. H. (1983) Placental transferrin receptor. Evaluation of the presence of endogenous ligand on specific binding, *J Biol Chem* 258, 4118-4122.
 22. Young, S. P., Bomford, A., and Williams, R. (1984) The effect of the iron saturation of transferrin on its binding and uptake by rabbit reticulocytes, *Biochem J* 219, 505-510.
 23. Krause, A., Neitz, S., Magert, H. J., Schulz, A., Forssmann, W. G., Schulz-Knappe, P., and Adermann, K. (2000) LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity, *FEBS Lett* 480, 147-150.
 24. Park, C. H., Valore, E. V., Waring, A. J., and Ganz, T. (2001) Heparin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver, *J Biol Chem* 276, 7806-7810.
 25. Peslova, G., Petrak, J., Kuzelova, K., Hrdy, I., Halada, P., Kuchel, P. W., Soe-Lin, S., Ponka, P., Sutak, R., Becker, E., Huang, M. L., Suryo Rahmanto, Y., Richardson, D. R., and Vyoral, D. (2009) Heparin, the hormone of iron metabolism, is bound specifically to alpha-2-macroglobulin in blood, *Blood* 113, 6225-6236.
 26. Nemeth, E., Tuttle, M. S., Powelson, J., Vaughn, M. B., Donovan, A., Ward, D. M., Ganz, T., and Kaplan, J. (2004) Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization, *Science* 306, 2090-2093.
 27. Hentze, M. W., Muckenthaler, M. U., Galy, B., and Camaschella, C. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism, *Cell* 142, 24-38.
 28. Ganz, T. (2006) Heparin and its role in regulating systemic iron metabolism, *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 29-35, 507.
 29. Nicolas, G., Viatte, L., Bennoun, M., Beaumont, C., Kahn, A., and Vaulont, S. (2002) Heparin, a new iron regulatory peptide, *Blood Cells Mol Dis* 29, 327-335.
 30. Fleming, R. E., and Sly, W. S. (2001) Heparin: a putative iron-regulatory hormone relevant to hereditary hemochromatosis and the anemia of chronic disease, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8160-8162.
 31. Singh, P. K., Parsek, M. R., Greenberg, E. P., and Welsh, M. J. (2002) A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development, *Nature* 417, 552-555.
 32. Nicolas, G., Bennoun, M., Porteu, A., Mativet, S., Beaumont, C., Grandchamp, B., Sirtio, M., Sawadogo, M., Kahn, A., and Vaulont, S. (2002) Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver heparin, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 4596-4601.
 33. Fuchs, H., Lucken, U., Tauber, R., Engel, A., and Gessner, R. (1998) Structural model of phospholipid-reconstituted human transferrin receptor derived by electron microscopy, *Structure* 6, 1235-1243.
 34. Collawn, J. F., Lai, A., Domingo, D., Fitch, M., Hatton, S., and Trowbridge, I. S. (1993) YTRF is the conserved internalization signal of the transferrin receptor, and a second YTRF signal at position 31-34 enhances endocytosis, *J Biol Chem* 268, 21686-21692.
 35. Collawn, J. F., Stangel, M., Kuhn, L. A., Esekogwu, V., Jing, S. Q., Trowbridge, I. S., and Tainer, J. A. (1990) Transferrin receptor internalization sequence YXRF implicates a tight turn as the structural recognition motif for endocytosis, *Cell* 63, 1061-1072.

36. Schneider, C., Sutherland, R., Newman, R., and Greaves, M. (1982) Structural features of the cell surface receptor for transferrin that is recognized by the monoclonal antibody OKT9, *J Biol Chem* 257, 8516-8522.
37. Davis, R. J., Johnson, G. L., Kelleher, D. J., Anderson, J. K., Mole, J. E., and Czech, M. P. (1986) Identification of serine 24 as the unique site on the transferrin receptor phosphorylated by protein kinase C, *J Biol Chem* 261, 9034-9041.
38. Mullner, E. W., and Kuhn, L. C. (1988) A stem-loop in the 3' untranslated region mediates iron-dependent regulation of transferrin receptor mRNA stability in the cytoplasm, *Cell* 53, 815-825.
39. Jing, S. Q., and Trowbridge, I. S. (1987) Identification of the intermolecular disulfide bonds of the human transferrin receptor and its lipid-attachment site, *Embo J* 6, 327-331.
40. Alvarez, E., Girones, N., and Davis, R. J. (1989) Intermolecular disulfide bonds are not required for the expression of the dimeric state and functional activity of the transferrin receptor, *Embo J* 8, 2231-2240.
41. Lawrence, C. M., Ray, S., Babyonyshev, M., Galluser, R., Borhani, D. W., and Harrison, S. C. (1999) Crystal structure of the ectodomain of human transferrin receptor, *Science* 286, 779-782.
42. Chevrier, B., D'Orchymont, H., Schalk, C., Tarnus, C., and Moras, D. (1996) The structure of the *Aeromonas proteolytica* aminopeptidase complexed with a hydroxamate inhibitor. Involvement in catalysis of Glu151 and two zinc ions of the co-catalytic unit, *Eur J Biochem* 237, 393-398.
43. Dello Sbarba, P., and Rovida, E. (2002) Transmodulation of cell surface regulatory molecules via ectodomain shedding, *Biol Chem* 383, 69-83.
44. Kohgo, Y., Nishisato, T., Kondo, H., Tsushima, N., Niitsu, Y., and Urushizaki, I. (1986) Circulating transferrin receptor in human serum, *Br J Haematol* 64, 277-281.
45. Kogan, A., Filatov, V., Gusev, N., Bereznikova, A., Kolosova, O., and Katrukha, A. (2005) Immunological study of complex formation between soluble transferrin receptor and transferrin, *Am J Hematol* 79, 281-287.
46. Kaup, M., Dassler, K., Weise, C., and Fuchs, H. (2002) Shedding of the transferrin receptor is mediated constitutively by an integral membrane metalloprotease sensitive to tumor necrosis factor alpha protease inhibitor-2, *J Biol Chem* 277, 38494-38502.
47. Wolfe, M. S., De Los Angeles, J., Miller, D. D., Xia, W., and Selkoe, D. J. (1999) Are presenilins intramembrane-cleaving proteases? Implications for the molecular mechanism of Alzheimer's disease, *Biochemistry* 38, 11223-11230.
48. Brown, M. S., Ye, J., Rawson, R. B., and Goldstein, J. L. (2000) Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans, *Cell* 100, 391-398.
49. Lal, M., and Caplan, M. Regulated intramembrane proteolysis: signaling pathways and biological functions, *Physiology (Bethesda)* 26, 34-44.
50. Lemberg, M. K., and Martoglio, B. (2002) Requirements for signal peptide peptidase-catalyzed intramembrane proteolysis, *Mol Cell* 10, 735-744.
51. Weihofen, A., Binns, K., Lemberg, M. K., Ashman, K., and Martoglio, B. (2002) Identification of signal peptide peptidase, a presenilin-type aspartic protease, *Science* 296, 2215-2218.
52. Ponting, C. P., Hutton, M., Nyborg, A., Baker, M., Jansen, K., and Golde, T. E. (2002) Identification of a novel family of presenilin homologues, *Hum Mol Genet* 11, 1037-1044.
53. Grigorenko, A. P., Moliaka, Y. K., Soto, M. C., Mello, C. C., and Rogaev, E. I. (2004) The *Caenorhabditis elegans* IMPAS gene, *imp-2*, is essential for development and is

- functionally distinct from related presenilins, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 14955-14960.
54. Martoglio, B., and Golde, T. E. (2003) Intramembrane-cleaving aspartic proteases and disease: presenilins, signal peptide peptidase and their homologs, *Hum Mol Genet* 12 Spec No 2, R201-206.
 55. Weihofen, A., and Martoglio, B. (2003) Intramembrane-cleaving proteases: controlled liberation of proteins and bioactive peptides, *Trends Cell Biol* 13, 71-78.
 56. Wolfe, M. S., Xia, W., Ostaszewski, B. L., Diehl, T. S., Kimberly, W. T., and Selkoe, D. J. (1999) Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity, *Nature* 398, 513-517.
 57. Steiner, H., and Haass, C. (2000) Intramembrane proteolysis by presenilins, *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 217-224.
 58. Selkoe, D. J. (2001) Presenilin, Notch, and the genesis and treatment of Alzheimer's disease, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11039-11041.
 59. Mumm, J. S., and Kopan, R. (2000) Notch signaling: from the outside in, *Dev Biol* 228, 151-165.
 60. Struhl, G., and Adachi, A. (1998) Nuclear access and action of notch in vivo, *Cell* 93, 649-660.
 61. Mizutani, T., Taniguchi, Y., Aoki, T., Hashimoto, N., and Honjo, T. (2001) Conservation of the biochemical mechanisms of signal transduction among mammalian Notch family members, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9026-9031.
 62. De Strooper, B., Saftig, P., Craessaerts, K., Vanderstichele, H., Guhde, G., Annaert, W., Von Figura, K., and Van Leuven, F. (1998) Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein, *Nature* 391, 387-390.
 63. Cao, X., and Sudhof, T. C. (2001) A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60, *Science* 293, 115-120.
 64. Kimberly, W. T., Zheng, J. B., Guenette, S. Y., and Selkoe, D. J. (2001) The intracellular domain of the beta-amyloid precursor protein is stabilized by Fe65 and translocates to the nucleus in a notch-like manner, *J Biol Chem* 276, 40288-40292.
 65. Leissring, M. A., Murphy, M. P., Mead, T. R., Akbari, Y., Sugarman, M. C., Jannatipour, M., Anliker, B., Muller, U., Saftig, P., De Strooper, B., Wolfe, M. S., Golde, T. E., and LaFerla, F. M. (2002) A physiologic signaling role for the gamma-secretase-derived intracellular fragment of APP, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 4697-4702.
 66. Ni, C. Y., Murphy, M. P., Golde, T. E., and Carpenter, G. (2001) gamma-Secretase cleavage and nuclear localization of ErbB-4 receptor tyrosine kinase, *Science* 294, 2179-2181.
 67. Lee, H. J., Jung, K. M., Huang, Y. Z., Bennett, L. B., Lee, J. S., Mei, L., and Kim, T. W. (2002) Presenilin-dependent gamma-secretase-like intramembrane cleavage of ErbB4, *J Biol Chem* 277, 6318-6323.
 68. Braud, V. M., Allan, D. S., Wilson, D., and McMichael, A. J. (1998) TAP- and tapasin-dependent HLA-E surface expression correlates with the binding of an MHC class I leader peptide, *Curr Biol* 8, 1-10.
 69. Lemberg, M. K., Bland, F. A., Weihofen, A., Braud, V. M., and Martoglio, B. (2001) Intramembrane proteolysis of signal peptides: an essential step in the generation of HLA-E epitopes, *J Immunol* 167, 6441-6446.
 70. McLauchlan, J., Lemberg, M. K., Hope, G., and Martoglio, B. (2002) Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets, *Embo J* 21, 3980-3988.

71. Fluhner, R., Grammer, G., Israel, L., Condrón, M. M., Haffner, C., Friedmann, E., Bohland, C., Imhof, A., Martoglio, B., Teplov, D. B., and Haass, C. (2006) A gamma-secretase-like intramembrane cleavage of TNF α by the GxGD aspartyl protease SPPL2b, *Nat Cell Biol* 8, 894-896.
72. Friedmann, E., Hauben, E., Maylandt, K., Schleege, S., Vreugde, S., Lichtenthaler, S. F., Kuhn, P. H., Stauffer, D., Rovelli, G., and Martoglio, B. (2006) SPPL2a and SPPL2b promote intramembrane proteolysis of TNF α in activated dendritic cells to trigger IL-12 production, *Nat Cell Biol* 8, 843-848.
73. Martin, L., Fluhner, R., Reiss, K., Kremmer, E., Saftig, P., and Haass, C. (2008) Regulated intramembrane proteolysis of Bri2 (Itm2b) by ADAM10 and SPPL2a/SPPL2b, *J Biol Chem* 283, 1644-1652.
74. Kirkin, V., Cahuzac, N., Guardiola-Serrano, F., Huault, S., Lucke, K., Friedmann, E., Novac, N., Wels, W. S., Martoglio, B., Hueber, A. O., and Zornig, M. (2007) The Fas ligand intracellular domain is released by ADAM10 and SPPL2a cleavage in T-cells, *Cell Death Differ* 14, 1678-1687.
75. Sun, M., Ames, K. T., Suzuki, I., and Fink, P. J. (2006) The cytoplasmic domain of Fas ligand costimulates TCR signals, *J Immunol* 177, 1481-1491.
76. Lewis, A. P., and Thomas, P. J. (1999) A novel clan of zinc metallopeptidases with possible intramembrane cleavage properties, *Protein Sci* 8, 439-442.
77. Rudner, D. Z., Fawcett, P., and Losick, R. (1999) A family of membrane-embedded metalloproteases involved in regulated proteolysis of membrane-associated transcription factors, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14765-14770.
78. Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1997) The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor, *Cell* 89, 331-340.
79. Rawson, R. B., Zelenski, N. G., Nijhawan, D., Ye, J., Sakai, J., Hasan, M. T., Chang, T. Y., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1997) Complementation cloning of S2P, a gene encoding a putative metalloprotease required for intramembrane cleavage of SREBPs, *Mol Cell* 1, 47-57.
80. Dobrosotskaya, I. Y., Seegmiller, A. C., Brown, M. S., Goldstein, J. L., and Rawson, R. B. (2002) Regulation of SREBP processing and membrane lipid production by phospholipids in *Drosophila*, *Science* 296, 879-883.
81. Ye, J., Rawson, R. B., Komuro, R., Chen, X., Dave, U. P., Prywes, R., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (2000) ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs, *Mol Cell* 6, 1355-1364.
82. Urban, S., Lee, J. R., and Freeman, M. (2001) *Drosophila* rhomboid-1 defines a family of putative intramembrane serine proteases, *Cell* 107, 173-182.
83. Lee, J. R., Urban, S., Garvey, C. F., and Freeman, M. (2001) Regulated intracellular ligand transport and proteolysis control EGF signal activation in *Drosophila*, *Cell* 107, 161-171.
84. Urban, S., Lee, J. R., and Freeman, M. (2002) A family of Rhomboid intramembrane proteases activates all *Drosophila* membrane-tethered EGF ligands, *Embo J* 21, 4277-4286.
85. Shih, Y. J., Baynes, R. D., Hudson, B. G., Flowers, C. H., Skikne, B. S., and Cook, J. D. (1990) Serum transferrin receptor is a truncated form of tissue receptor, *J Biol Chem* 265, 19077-19081.
86. Skikne, B. S., Flowers, C. H., and Cook, J. D. (1990) Serum transferrin receptor: a quantitative measure of tissue iron deficiency, *Blood* 75, 1870-1876.
87. Fluhner, R., Martin, L., Klier, B., Haug-Kroper, M., Grammer, G., Nuscher, B., and Haass, C. The alpha-helical content of the transmembrane domain of the British

- dementia protein-2 (Bri2) determines its processing by signal peptide peptidase-like 2b (SPPL2b), *J Biol Chem* 287, 5156-5163.
88. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680-685.
 89. Schagger, H. (2006) Tricine-SDS-PAGE, *Nat Protoc* 1, 16-22.
 90. Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *J Mol Biol* 166, 557-580.
 91. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.
 92. Mao, G., Tan, J., Cui, M. Z., Chui, D., and Xu, X. (2009) The GxxxG motif in the transmembrane domain of AbetaPP plays an essential role in the interaction of CTF beta with the gamma-secretase complex and the formation of amyloid-beta, *J Alzheimers Dis* 18, 167-176.
 93. Munter, L. M., Botev, A., Richter, L., Hildebrand, P. W., Althoff, V., Weise, C., Kaden, D., and Multhaup, G. (2010) Aberrant amyloid precursor protein (APP) processing in hereditary forms of Alzheimer disease caused by APP familial Alzheimer disease mutations can be rescued by mutations in the APP GxxxG motif, *J Biol Chem* 285, 21636-21643.
 94. Fleming, R. E. (2008) Iron and inflammation: cross-talk between pathways regulating hepcidin, *J Mol Med (Berl)* 86, 491-494.
 95. Deugnier, Y. (2010) The iron driven pathway of hepcidin synthesis, *Gastroenterol Clin Biol* 34, 351-354.
 96. Silvestri, L., Pagani, A., Nai, A., De Domenico, I., Kaplan, J., and Camaschella, C. (2008) The serine protease matriptase-2 (TMPRSS6) inhibits hepcidin activation by cleaving membrane hemojuvelin, *Cell Metab* 8, 502-511.
 97. Maxson, J. E., Chen, J., Enns, C. A., and Zhang, A. S. (2010) Matriptase-2- and proprotein convertase-cleaved forms of hemojuvelin have different roles in the down-regulation of hepcidin expression, *J Biol Chem* 285, 39021-39028.
 98. Gao, J., Chen, J., Kramer, M., Tsukamoto, H., Zhang, A. S., and Enns, C. A. (2009) Interaction of the hereditary hemochromatosis protein HFE with transferrin receptor 2 is required for transferrin-induced hepcidin expression, *Cell Metab* 9, 217-227.
 99. Corradini, E., Garuti, C., Montosi, G., Ventura, P., Andriopoulos, B., Jr., Lin, H. Y., Pietrangelo, A., and Babitt, J. L. (2009) Bone morphogenetic protein signaling is impaired in an HFE knockout mouse model of hemochromatosis, *Gastroenterology* 137, 1489-1497.
 100. Dassler, K., Zydek, M., Wandzik, K., Kaup, M., and Fuchs, H. (2006) Release of the soluble transferrin receptor is directly regulated by binding of its ligand ferritransferrin, *J Biol Chem* 281, 3297-3304.
 101. Chitambar, C. R., and Zivkovic-Gilgenbach, Z. (1990) Influence of cellular iron status on the release of soluble transferrin receptor from human promyelocytic leukemic HL60 cells, *J Lab Clin Med* 116, 345-353.
 102. Bertucci, C., and Domenici, E. (2002) Reversible and covalent binding of drugs to human serum albumin: methodological approaches and physiological relevance, *Curr Med Chem* 9, 1463-1481.
 103. Kim, B. B., Abdul Kadir, H., and Tayyab, S. (2008) Bromophenol blue binding to mammalian albumins and displacement of albumin-bound bilirubin, *Pak J Biol Sci* 11, 2418-2422.
 104. Halliwell, B. (1996) Antioxidants in human health and disease, *Annu Rev Nutr* 16, 33-50.

105. Phillips, A., Shaper, A. G., and Whincup, P. H. (1989) Association between serum albumin and mortality from cardiovascular disease, cancer, and other causes, *Lancet* 2, 1434-1436.
106. Bourdon, E., and Blache, D. (2001) The importance of proteins in defense against oxidation, *Antioxid Redox Signal* 3, 293-311.
107. Iwao, Y., Ishima, Y., Yamada, J., Noguchi, T., Kragh-Hansen, U., Mera, K., Honda, D., Suenaga, A., Maruyama, T., and Otagiri, M. Quantitative evaluation of the role of cysteine and methionine residues in the antioxidant activity of human serum albumin using recombinant mutants, *IUBMB Life* 64, 450-454.
108. Tomosugi, N., Kawabata, H., Wakatabe, R., Higuchi, M., Yamaya, H., Umehara, H., and Ishikawa, I. (2006) Detection of serum hepcidin in renal failure and inflammation by using ProteinChip System, *Blood* 108, 1381-1387.
109. Kemna, E. H., Tjalsma, H., Podust, V. N., and Swinkels, D. W. (2007) Mass spectrometry-based hepcidin measurements in serum and urine: analytical aspects and clinical implications, *Clin Chem* 53, 620-628.
110. Murphy, A. T., Witcher, D. R., Luan, P., and Wroblewski, V. J. (2007) Quantitation of hepcidin from human and mouse serum using liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Blood* 110, 1048-1054.
111. Murao, N., Ishigai, M., Yasuno, H., Shimonaka, Y., and Aso, Y. (2007) Simple and sensitive quantification of bioactive peptides in biological matrices using liquid chromatography/selected reaction monitoring mass spectrometry coupled with trichloroacetic acid clean-up, *Rapid Commun Mass Spectrom* 21, 4033-4038.
112. Swinkels, D. W., Girelli, D., Laarakkers, C., Kroot, J., Camprostrini, N., Kemna, E. H., and Tjalsma, H. (2008) Advances in quantitative hepcidin measurements by time-of-flight mass spectrometry, *PLoS One* 3, e2706.
113. Ganz, T., Olbina, G., Girelli, D., Nemeth, E., and Westerman, M. (2008) Immunoassay for human serum hepcidin, *Blood* 112, 4292-4297.
114. Ward, D. G., Roberts, K., Stonelake, P., Goon, P., Zampronio, C. G., Martin, A., Johnson, P. J., Iqbal, T., and Tselepis, C. (2008) SELDI-TOF-MS determination of hepcidin in clinical samples using stable isotope labelled hepcidin as an internal standard, *Proteome Sci* 6, 28.
115. Kobold, U., Dulffer, T., Dangl, M., Escherich, A., Kubbies, M., Roddiger, R., and Wright, J. A. (2008) Quantification of hepcidin-25 in human serum by isotope dilution micro-HPLC-tandem mass spectrometry, *Clin Chem* 54, 1584-1586.
116. Ashby, D. R., Gale, D. P., Busbridge, M., Murphy, K. G., Duncan, N. D., Cairns, T. D., Taube, D. H., Bloom, S. R., Tam, F. W., Chapman, R. S., Maxwell, P. H., and Choi, P. (2009) Plasma hepcidin levels are elevated but responsive to erythropoietin therapy in renal disease, *Kidney Int* 75, 976-981.
117. Koliarakis, V., Marinou, M., Vassilakopoulos, T. P., Vavourakis, E., Tsochatzis, E., Pangalis, G. A., Papatheodoridis, G., Stamoulakatou, A., Swinkels, D. W., Papanikolaou, G., and Mamalaki, A. (2009) A novel immunological assay for hepcidin quantification in human serum, *PLoS One* 4, e4581.
118. Li, H., Rose, M. J., Tran, L., Zhang, J., Miranda, L. P., James, C. A., and Sasu, B. J. (2009) Development of a method for the sensitive and quantitative determination of hepcidin in human serum using LC-MS/MS, *J Pharmacol Toxicol Methods* 59, 171-180.
119. Grebentchikov, N., Geurts-Moespot, A. J., Kroot, J. J., den Heijer, M., Tjalsma, H., Swinkels, D. W., and Sweep, F. G. (2009) High-sensitive radioimmunoassay for human serum hepcidin, *Br J Haematol* 146, 317-325.

120. Peters, H. P., Laarakkers, C. M., Swinkels, D. W., and Wetzels, J. F. Serum hepcidin-25 levels in patients with chronic kidney disease are independent of glomerular filtration rate, *Nephrol Dial Transplant* 25, 848-853.
121. Kroot, J. J., Laarakkers, C. M., Geurts-Moespot, A. J., Grebenchtchikov, N., Pickkers, P., van Ede, A. E., Peters, H. P., van Dongen-Lases, E., Wetzels, J. F., Sweep, F. C., Tjalsma, H., and Swinkels, D. W. Immunochemical and mass-spectrometry-based serum hepcidin assays for iron metabolism disorders, *Clin Chem* 56, 1570-1579.
122. Feng, L., Yan, H., Wu, Z., Yan, N., Wang, Z., Jeffrey, P. D., and Shi, Y. (2007) Structure of a site-2 protease family intramembrane metalloprotease, *Science* 318, 1608-1612.
123. Urban, S., and Wolfe, M. S. (2005) Reconstitution of intramembrane proteolysis in vitro reveals that pure rhomboid is sufficient for catalysis and specificity, *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 1883-1888.
124. Friedmann, E., Lemberg, M. K., Weihofen, A., Dev, K. K., Dengler, U., Rovelli, G., and Martoglio, B. (2004) Consensus analysis of signal peptide peptidase and homologous human aspartic proteases reveals opposite topology of catalytic domains compared with presenilins, *J Biol Chem* 279, 50790-50798.
125. Shearman, M. S., Behr, D., Clarke, E. E., Lewis, H. D., Harrison, T., Hunt, P., Nadin, A., Smith, A. L., Stevenson, G., and Castro, J. L. (2000) L-685,458, an aspartyl protease transition state mimic, is a potent inhibitor of amyloid beta-protein precursor gamma-secretase activity, *Biochemistry* 39, 8698-8704.
126. Meng, L., Mohan, R., Kwok, B. H., Elofsson, M., Sin, N., and Crews, C. M. (1999) Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10403-10408.
127. Kim, D., Kim, S. H., and Li, G. C. (1999) Proteasome inhibitors MG132 and lactacystin hyperphosphorylate HSF1 and induce hsp70 and hsp27 expression, *Biochem Biophys Res Commun* 254, 264-268.
128. Krawitz, P., Haffner, C., Fluhrer, R., Steiner, H., Schmid, B., and Haass, C. (2005) Differential localization and identification of a critical aspartate suggest non-redundant proteolytic functions of the presenilin homologues SPPL2b and SPPL3, *J Biol Chem* 280, 39515-39523.
129. Behnke, J., Schneppenheim, J., Koch-Nolte, F., Haag, F., Saftig, P., and Schroder, B. Signal-peptide-peptidase-like 2a (SPPL2a) is targeted to lysosomes/late endosomes by a tyrosine motif in its C-terminal tail, *FEBS Lett* 585, 2951-2957.
130. Volz, B., Orberger, G., Porwoll, S., Hauri, H. P., and Tauber, R. (1995) Selective reentry of recycling cell surface glycoproteins to the biosynthetic pathway in human hepatocarcinoma HepG2 cells, *J Cell Biol* 130, 537-551.
131. Lunn, C. A., Fan, X., Dalie, B., Miller, K., Zavodny, P. J., Narula, S. K., and Lundell, D. (1997) Purification of ADAM 10 from bovine spleen as a TNFalpha convertase, *FEBS Lett* 400, 333-335.
132. Black, R. A. (2002) Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme, *Int J Biochem Cell Biol* 34, 1-5.
133. Levental, I., Lingwood, D., Grzybek, M., Coskun, U., and Simons, K. Palmitoylation regulates raft affinity for the majority of integral raft proteins, *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 22050-22054.
134. Harder, T., Scheiffele, P., Verkade, P., and Simons, K. (1998) Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components, *J Cell Biol* 141, 929-942.
135. Alvarez, E., Girones, N., and Davis, R. J. (1990) Inhibition of the receptor-mediated endocytosis of diferric transferrin is associated with the covalent modification of the transferrin receptor with palmitic acid, *J Biol Chem* 265, 16644-16655.

136. Auriac, A., Willemetz, A., and Canonne-Hergaux, F. Lipid raft-dependent endocytosis: a new route for hepcidin-mediated regulation of ferroportin in macrophages, *Haematologica* 95, 1269-1277.
137. Kawabata, H., Fleming, R. E., Gui, D., Moon, S. Y., Saitoh, T., O'Kelly, J., Umehara, Y., Wano, Y., Said, J. W., and Koeffler, H. P. (2004) Expression of hepcidin is down-regulated in TfR2 mutant mice manifesting a phenotype of hereditary hemochromatosis, *Blood*.
138. Niederkofler, V., Salie, R., and Arber, S. (2005) Hemojuvelin is essential for dietary iron sensing, and its mutation leads to severe iron overload, *J Clin Invest* 115, 2180-2186.

8 ANHANG

PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

Originalarbeiten (in Fachzeitschriften)

K. Wandzik, **C. Zahn**, K. Dassler, H. Fuchs

Substantial changes of cellular iron homeostasis during megakaryocytic differentiation of K562 cells.

Dev. Growth Differ., 51(6):555-65 (2009)

C. Bachran, S. Schneider, S.B. Riese, D. Bachran, N. Schellmann, **C. Zahn**, M. Sutherland, H. Fuchs

A lysine-free mutant of epidermal growth factor targeting moiety of a targeted toxin.

Life Sci., 88(5-6):226-32 (2011)

C. Zahn, M. Kaup, R. Fluhner, H. Fuchs

The transferrin receptor-1 membrane stub undergoes 2 intramembrane proteolysis by SPPL2b
FebsJ. (2012), *submitted*

Poster

C. Zahn, R. Fluhner, H. Fuchs

“Regulated intramembrane proteolysis of transferrin receptor-1”

Signal Transduction and Disease, Trinational Fall Meeting of the Biochemical Societies
(2009)

C. Zahn, R. Fluhner, H. Fuchs

“Regulated intramembrane proteolysis of transferrin receptor-1 and the extracellular release of a C-terminal peptide”

Regulated intramembrane proteolysis in Cancer Development and Neurodegenerative Diseases, 7th Fabisch Symposium for Cancer Research and Molecular Cell Biology (2011)

Vortrag

C. Zahn, M. Kaup, R. Fluhner, H. Fuchs

“Regulated intramembrane proteolysis of TfR1 by SPPL2a and SPPL2b”

Europe an Iron Club – Meeting Rennes (2012), **3. Platz für den Vortrag**

DANKSAGUNG

Einleitend bedanke ich mich sehr bei Frau Prof. Petra Knaus und Herrn Prof. Hendrik Fuchs für die Begutachtung meiner Dissertation.

Für die Überlassung des Themas und der Möglichkeit diese Forschung in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen, sowie der Beantragung und Beschaffung von Geldmitteln für diese Arbeit möchte ich mich ganz herzlich bei Hendrik bedanken. Zudem danke ich ihm für seine stete Diskussionsbereitschaft und seinen Kommentaren und Anregungen, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben. Vielen Dank auch für die schnelle Durchsicht meiner Arbeit und den wertvollen Tipps.

Frau Dr. Regina Fluhner danke ich für die Bereitstellung der SPPL-Plasmide und für die fortwährende Bereitschaft Ergebnisse zu diskutieren und für die Anregungen von Versuchen.

Bei Herrn Dr. Chris Weise bedanke ich mich für die Hilfestellung der Auswertung der MALDI-TOF-TOF-MS-Spektren.

Christopher danke ich für die Einführung in das für mich neue Labor und in den Laboralltag. Sowie für die immerwährende Bereitschaft Ergebnisse zu diskutieren und Hilfestellungen bei Methoden zu geben. Es war sehr traurig, dass du uns für Amerika verlassen hast.

Sebastian danke ich für die Hilfsbereitschaft mir in methodischen Fragestellungen immer hilfreich zur Seite zu stehen. Ohne Luise und Christel würden die Labore wohl nicht so toll funktionieren, vielen Dank, dass ihr so fleißig seid und uns somit den Rücken frei gehalten habt.

Diana und Nicole danke ich sehr für ihre Freundschaft und fortwährendem Willen Ergebnisse und weitere eventuelle Schritte zu diskutieren. Ich habe eine Menge von Euch gelernt, vor allen Dingen erst einmal Ruhe bewahren. ☺

Meinem Labor und der AG Dervedde danke ich für die Diskussionen und Anregungen in unseren Dienstagsseminaren, ich habe eine Menge dabei gelernt.

Für ihre Freundschaft und Hilfe bei den Vorbereitungen zur Geburt unserer Tochter Sophie bedanke ich mich bei Silvia und Ronny. Was hätte ich nur ohne Euch getan?

Meinem Mann und seiner Familie danke ich für ihre tolle Unterstützung, und dass sie immer für mich da sind.