

**FUNKTION UND REGULATION DER
TRANSFERRINREZEPTOR-
FREISETZUNG**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften

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

vorgelegt von

Katrin Dassler

Die praktischen Arbeiten für die hier vorliegende Dissertation wurden am Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie am Campus Benjamin Franklin der Charité — Universitätsmedizin Berlin durchgeführt.

Gutachter: Prof. Dr. M. Ziegler

Priv.-Doz. Dr. H. Fuchs

Tag der Disputation: 19. Mai 2005

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	III
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Grundlagen des Eisenstoffwechsels	1
1.1.1 Biologische Bedeutung von Eisen.....	1
1.1.2 Eisenaufnahme in den Organismus	2
1.1.3 Eisentransport im Blut.....	2
1.1.4 Zellulärer Eisenstoffwechsel	3
1.2 Rolle des Transferrinrezeptors.....	3
1.2.1 Membranständiger Transferrinrezeptor.....	3
1.2.2 Transferrinrezeptor 2	5
1.2.3 Transferrin-Transferrinrezeptor-Komplex	6
1.3 Shedding des Transferrinrezeptors	6
1.3.1 Ectodomänenshedding.....	6
1.3.2 Transferrinrezeptor-Protease	9
1.3.3 Regulation der Serumtransferrinrezeptor-Freisetzung	10
1.4 Regulation des systemischen Eisenstoffwechsels	11
1.4.1 Eisenhomöostase und HFE.....	11
1.4.2 Hepcidin	12
1.4.3 Rolle des löslichen Transferrinrezeptors in der Eisenhomöostase	13
1.5 Zielsetzung für die vorliegende Arbeit.....	14
2 MATERIAL UND METHODEN	16
2.1 Allgemeine Hinweise	16
2.2 Geräte.....	16
2.2.1 Zell- und Bakterienkultur	16
2.2.2 Elektrophorese und Westernblot	17
2.2.3 Zentrifugen	17
2.2.4 Sonstige Geräte.....	17

2.3	Verbrauchsmaterialien.....	17
2.3.1	Zell- und Bakterienkultur.....	17
2.3.2	Chemikalien.....	18
2.3.3	Antikörper.....	18
2.3.4	Enzyme.....	19
2.3.5	Proteaseinhibitoren.....	19
2.3.6	Weitere Proteine.....	20
2.3.7	Sonstiges Verbrauchsmaterial.....	20
2.4	Reagenziensätze und Molekulargewichtsmarker.....	20
2.5	Nukleotide und Primer.....	21
2.6	Vektoren.....	22
2.7	Bakterienstämme.....	22
2.8	Zelllinien.....	22
2.9	Pufferlösungen und Bakterienmedien.....	23
2.10	Zellbiologische Methoden.....	23
2.10.1	Kultivierung von HepG2-Zellen und TRVb-Zellen.....	23
2.10.2	Kultivierung von Suspensionszellen.....	24
2.10.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	24
2.10.4	Transfektion von HepG2- und TRVb-Zellen.....	24
2.10.5	Transfektion von HL60-Zellen.....	24
2.10.6	Selektion von transfizierten Zellen.....	25
2.10.7	Immunfluoreszenz von HepG2- und TRVb-Zellen.....	25
2.10.8	Fluoreszenzdurchflusscytometrie.....	25
2.10.9	Markierung von Zelloberflächenproteinen mit Biotin.....	26
2.11	Proteinchemische Methoden.....	26
2.11.1	Lyse von Zellen.....	26
2.11.2	Luciferaseassay.....	26
2.11.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	26
2.11.4	Denaturierende Proteinfällung mit Aceton.....	27
2.11.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	27
2.11.6	Immunoblot.....	28
2.11.7	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest.....	29
2.11.8	Liliom-Plot.....	30
2.11.9	Darstellung von Transferrin-Sepharose.....	30
2.11.10	Immunpräzipitation.....	30
2.11.11	Fällung des Serumtransferrinrezeptors mittels Transferrinpräzipitation.....	31
2.11.12	Membranpräparation durch differentielle Zentrifugation.....	31
2.12	Molekularbiologische Methoden.....	32
2.12.1	Agarosegelelektrophorese.....	32
2.12.2	Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	32
2.12.3	Restriktionsverdau.....	32
2.12.4	Ligation von DNA-Fragmenten.....	32

2.12.5	Herstellung kompetenter Bakterienzellen	33
2.12.6	Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i>	33
2.12.7	Gefrierkulturen von <i>E. coli</i>	33
2.12.8	Präparation von Plasmid-DNA.....	33
2.12.9	Vorbereitung von Oligonukleotiden zur Klonierung	34
2.12.10	Polymerasekettenreaktion.....	34
2.12.11	DNA-Sequenzierung	35
3	ERGEBNISSE	36
3.1	Serumtransferrinrezeptor-Freisetzung in Zelllinien	36
3.1.1	Nachweis des Serumtransferrinrezeptors	36
3.1.2	Nachweis zellulärer Transferrinrezeptor-Fragmente.....	37
3.2	Entwicklung von Modellsystemen	38
3.2.1	Charakterisierung von TRVb-Zellen.....	38
3.2.2	Sheddingreporterassay.....	39
3.3	Die Transferrinrezeptor-Sheddingprotease in TRVb-Zellen.....	46
3.3.1	Serumtransferrinrezeptor-Freisetzung aus mikrosomalen Membranen von TRVb-Zellen.....	47
3.3.2	Inhibition der Serumtransferrinrezeptor-Freisetzung	47
3.4	Mutationsanalyse des Transferrinrezeptor- <i>stalk</i>	48
3.4.1	Punktmutanten.....	49
3.4.2	Der <i>stalk</i> -Austausch.....	53
3.5	Regulation des Transferrinrezeptor-Sheddings	56
3.5.1	Einfluss von ferri-Transferrin auf das Transferrinrezeptor-Shedding.....	56
3.5.2	Transferrinrezeptor-Mutanten mit unterschiedlicher Affinität zu ferri- Transferrin	58
3.5.3	Serumtransferrinrezeptor-Freisetzung aus transfizierten Zellen	63
3.5.4	Inhibition der Serumtransferrinrezeptor-Freisetzung durch ferri- Transferrin an Membranen	64
4	DISKUSSION	66
4.1	Charakterisierung geeigneter Testsysteme	66
4.1.1	Transferrinrezeptor-Enzym-Konstrukte	66
4.1.2	Zellen ohne endogenen Transferrinrezeptor.....	67
4.1.3	Zellfreies Testsystem für die Untersuchung von Proteolyseereignissen in Membranproteinen	68
4.2	Transferrinrezeptor-Shedding als ubiquitäres Ereignis Transferrinrezeptor tragender Zellen.....	69
4.3	Charakterisierung des Transferrinrezeptor-Sheddings in TRVb-Zellen.....	70
4.4	Alternatives Shedding.....	71
4.5	Einfluss des <i>stalk</i> auf Sheddingprozesse	73
4.6	Bindung von Transferrin an den Transferrinrezeptor.....	76
4.7	Transferrin als Inhibitor der Serumtransferrinrezeptor-Freisetzung.....	77

4.8	Der Serumtransferrinrezeptor als Regulator der Eisenhomöostase.....	79
5	ZUSAMMENFASSUNG	83
6	LITERATURVERZEICHNIS	87
7	ANHANG	95
	DNA-Code.....	95
	Hergestellte Plasmide.....	96
	Publikationsverzeichnis.....	97
	Lebenslauf.....	99
	Danksagung.....	100

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

% (v/v)	Prozentgehalt Volumen am Gesamtvolumen (ml/100 ml)
% (w/v)	Prozentgehalt Masse am Gesamtvolumen (g/100 ml)
*	Peroxidase konjugiert
<i>A</i>	Bindungsstärke durch Absorption im ELISA bestimmt
ACE	<i>angiotensin converting enzyme</i>
Anti-Biotin	polyklonaler Antikörper aus der Ziege gegen Biotin
apo-Tf	eisenfreies Transferrin
APP	<i>β-amyloid precursor protein</i>
AS	Aminosäure
BCA	2,2'-Bicinchoninsäure
BSA	Rinderserumalbumin
<i>c</i>	Konzentration
ca.	circa
cDNA	die der <i>messenger</i> -RNA komplementäre DNA
CHO	Ovarien des chinesischen Hamsters
d	Tage
D	Dalton (g/mol)
Desferrioxamin	Handelsbezeichnung für Deferoxaminmesylat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium mit L-Alanyl-L-Glutamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> , Sicherheitsstamm K 12
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
ELISA	Enzym gekoppelter Immunadsorptionstest
F	Farad
FCI	Decanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-chlormethylketon
FCS	fötale Kälberserum
ferri-Tf	Eisen beladenes Transferrin
ferri-Tf-FITC	Fluorescein konjugiertes Eisen beladenes Transferrin
FITC	Fluorescein
FL	<i>firefly</i> -Luciferase
$x \times g$	x -faches der Erdbeschleunigung ($g = 9.80665 \text{ m/s}^2$)
GAM	polyklonaler Antikörper aus der Ziege gegen Maus
H68.4	monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen die Aminosäuren 3–28 des humanen Transferrinrezeptors
HB-EGF	Heparin bindender epidermaler Wachstumsfaktor

HFE	Hämochromatoseprotein des Typs I
HRP	Peroxidase aus Meerrettich
IgG	Immunglobuline der Klasse G
IR	<i>stalk</i> des Interleukin6-Rezeptor
IRE	<i>iron-responsive element</i>
K_A	Assoziationskonstante
K_D	Dissoziationskonstante
LV	Leervektor
M	mol/l
min	Minute
MMP	Matrixmetalloprotease
MP	Metalloprotease
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MT-MMP	<i>membrane type</i> Matrixmetalloprotease
OKT9	monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen die Ectodomäne des humanen Transferrinrezeptors
pAB063	polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen gegen humanen Transferrinrezeptor
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PBS ⁺⁺	phosphatgepufferte Salzlösung mit Ca ²⁺ (0,9 mM) und Mg ²⁺ (0,5 mM)
PBSB	phosphatgepufferte Salzlösung mit 1 % Brij 58
PNK	T4-Polynukleotidkinase
RAFL	polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen gegen <i>firefly</i> -Luciferase
RAG	polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen gegen Ziege
RAM	polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen gegen Maus
RNA	Ribonukleinsäure
RU	<i>response units</i>
s	Sekunden
S.A.M.	Standardabweichung vom Mittelwert
SAR	polyklonaler Antikörper aus dem Schwein gegen Kaninchen
SDS	Natriumdodecylsulfat
SP	Serinprotease
sTfR	<i>soluble</i> oder Serum-Transferrinrezeptor
TfR	Transferrinrezeptor
TfRFL	Transferrinrezeptor- <i>firefly</i> -Luciferase
TfRRL	Transferrinrezeptor- <i>renilla</i> -Luciferase
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor
TNF α	Tumornekrosefaktor α
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol
TRS	Transferrinrezeptorsegment ohne Ectodomäne
TRSFL	Transferrinrezeptorsegment mit <i>firefly</i> -Luciferase als Ectodomäne
T α	<i>stalk</i> der Proform des Tumornekrosefaktors α
U	die für einzelne Substanzen und Enzyme in spezifischen Testsystemen ermittelte Aktivität in Einheiten (Unit)
V	Volt
wt	Wildtyp