

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Grundlagen des Eisenstoffwechsels

### 1.1.1 Biologische Bedeutung von Eisen

Für den menschlichen Organismus besitzt das Eisenion mit seiner Fähigkeit zwischen seinen Oxidationszuständen +II und +III zu wechseln eine entscheidende Bedeutung. Es ist essentiell für die Funktion verschiedenster Proteine fundamentaler biochemischer Reaktionen. Das bedeutende Spurenelement (durchschnittlich 4–5 g pro Person) ist insbesondere notwendig für den Sauerstofftransport im Blut, die Sauerstoffspeicherung im Muskel, Elektronentransportprozesse und die Katalyse von Redoxreaktionen wie beispielsweise bei der DNA-Synthese. Es liegt vorwiegend komplexiert mit einem Porphyrinring als Hämmolekül vor. Die Eigenschaft des Hämmoleküls Sauerstoff zu binden, wird für die Funktionsweise des Hämoglobins und des Myoglobins ausgenutzt. In Peroxidasen und Katalasen ist das Hämmolekül im katalytischen Zentrum bei der Zersetzung von zelltoxischem Wasserstoffperoxid zu Wasser beteiligt. Cytochrome tragen die Hämgruppen, um über den reversiblen Wechsel zwischen Eisen II und Eisen III Elektronen innerhalb der Elektronentransportkette übertragen zu können. Andere Komponenten der Atmungskette tragen Eisen-Schwefel-Zentren als prosthetische Gruppe, um einen Elektronentransport zu vermitteln (NADH-Q-Reduktase, Succinat-Q-Reduktase und Cytochromreduktase). In der Aconitase des Citratzyklus sind Eisen-Schwefel-Cluster notwendig für die reversible enzymatische Umsetzung von Citrat zu Isocitrat. Der Komplex aus zwei Eisenatomen im binukleären Zentrum der Ribonukleotidreduktase stellt eine dritte Form einer Eisenverbindung dar. Das Enzym reduziert die Ribonukleotide zu Desoxyribonukleotiden und nimmt somit eine Schlüsselrolle im Geschwindigkeit bestimmenden Schritt der DNA Synthese ein.

Die besonderen Charakteristika von Eisen bedingen auch seine Gefahr. Eisen II-Ionen katalysieren im Wasser die Bildung von hochtoxischen Hydroxylradikalen aus Sauerstoff. Daher ist eine genaue Kontrolle der systemischen Eisenaufnahme in den Organismus, des Eisentransportes im Blut und der zellulären Eisenaufnahme und Speicherung zwingend erforderlich.

### 1.1.2 Eisenaufnahme in den Organismus

Die Eisenaufnahme aus dem Darm erfolgt kontrolliert in Abhängigkeit des Eisenbedarfs. Diätetisches Eisen wird in duodenalen Villuszellen nach Reduktion durch eine Ferrireduktase mit Homologie zum Cytochrom b561 [133] über den Dimetalltransporter DMT1 (auch DCT1 oder Nramp2) [72,83,85] in die Enterocyten aufgenommen und auf der basolateralen Seite über einen weiteren Metalltransporter namens Ferroportin (auch IREG1 oder MTP1) in das Blut transportiert [58], wo es nach Reoxidation an Serumtransferrin gebunden, geschützt vorliegt. Es ist unstrittig, dass der gesamte Mechanismus der Eisenaufnahme streng kontrolliert erfolgen muss. Wie diese Regulation erfolgt, ist bisher jedoch insbesondere auf systemischer Ebene ungeklärt. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression der zellulären Eisentransporter einerseits unter Eisenmangelbedingungen ansteigt und andererseits sinkt, wenn die Eisenversorgung ausgeglichen ist [71,134]. Weiterhin ist bekannt, dass die Expression von Ferroportin und *splice*-Varianten des DMT1 über *iron regulatory proteins* reguliert wird [58,85,134]. Diese Proteine binden im eisenarmen Zustand an einen 3'-gelegenen Teil der DMT1- oder Ferroportin-mRNA, den so genannten *iron-responsive elements* (IREs). Dadurch wird die mRNA gegen den Abbau durch Ribonukleasen stabilisiert und die Expression ihrer korrespondierenden Proteine erhöht. Die Eisenabgabe aus den duodenalen Enterocyten hängt eng mit dem Kupferstoffwechsel dieser Zellen zusammen. Ein Kupfermangel in Tieren führt zur Akkumulation von Eisen in den Enterocyten. Die Abgabe ins Blut ist gestört [118,148]. Diese Beobachtung stützt die Rolle der kupferabhängigen Ferroxidase Hephaestin [209]. Gendefekte dieses Enzyms bewirken, dass Eisen in die Enterocyten absorbiert, jedoch nicht ins Blut freigesetzt wird. Es scheint somit eine wichtige Rolle beim Eisenexport durch Ferroportin zu spielen.

### 1.1.3 Eisentransport im Blut

Das von den Enterocyten exportierte Eisen wird im Blutkreislauf sofort an Transferrin gebunden. Nur 30 % der Eisenbindungsstellen aller Transferrinmoleküle des Organismus sind abgesättigt, so dass der größte Teil der Transferrine eisenfrei vorliegt und somit ständig als Akzeptor zur Verfügung steht. Das 80 kD schwere Glykoprotein ist in einen *N*-terminalen und einen *C*-terminalen Bereich gegliedert [12]. Jeder Bereich besteht aus zwei unterschiedlichen Domänen, die zusammen eine tiefe hydrophile Tasche bilden, in der sich eine Eisenbindungsstelle für genau ein Eisen III-Ion befindet. In Abwesenheit von Eisen liegen die Domänen weit auseinander. Bindet Eisen, rotieren die Domänen derart, dass die Bindungsstelle geschlossen wird [80]. Das zirkulierende Transferrin im Blut sorgt für die Eisenversorgung der Zellen. Nicht an Transferrin gebundenes Eisen liegt nur bei starkem Eisenüberschuss vor, der durch exzessive Aufnahme, genetische Defekte oder wiederholte Bluttransfusion verursacht werden kann. In diesem Fall wird Eisen III von Citrat komplexiert, wie im Blut von Hämochromatosepatienten nachgewiesen werden konnte [125].

### 1.1.4 Zellulärer Eisenstoffwechsel

Von der Zelle aufgenommenes Eisen wird vorwiegend in dem hoch konservierten, cytosolischen Ferritinprotein gespeichert. Das 450-kD-Heteropolymer ist aus insgesamt 24 H-Ketten (H für *heart-type* oder *heavy*) und L-Ketten (L für *liver-type* oder *light*) aufgebaut. Beide Ketten sind für die Funktion des Proteins notwendig, jedoch sind die Untereinheiten je nach Organ zu verschiedenen Anteilen im Ferritinprotein enthalten. Sie formen in ihrer Gesamtheit eine Höhle mit einem Durchmesser von 70 bis 80 Å, in der bis zu 4500 Sauerstoff- oder Wasserstoffbrücken verknüpfte Eisenatome Platz finden könnten. Isoliertes Ferritin aus Geweben trägt jedoch durchschnittlich nur 2000–2500 Eisenatome, die sich in mineralischen Kernen aus Eisenhydrit und zu geringeren Anteilen auch aus Magnetit oder Hematit zusammensetzen [48,200].

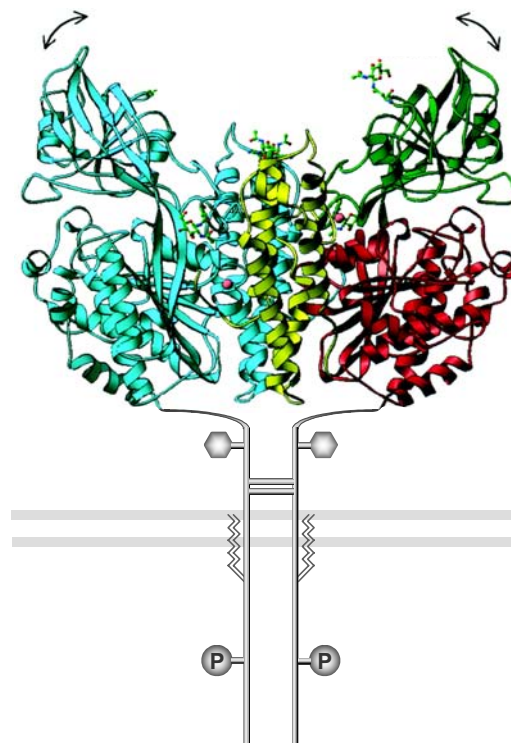
Ein wasserunlösliches Degradationsprodukt des Ferritins, das Hämosiderin, besitzt ebenfalls Eisenspeicherfunktion. Es entsteht durch unvollständige lysosomale Prozessierung des Ferritins [164], verliert jedoch im Gegensatz zu diesem die Fähigkeit, Eisen schnell zu mobilisieren [214]. Man vermutet daher eine schützende Funktion des Proteins bei Eisenüberladung der Zelle. Die Aufnahme von Eisen in die Zelle erfolgt über den Transferrinrezeptor (TfR). Eisenbeladenes Transferrin bindet an der Zelloberfläche bei pH 7,4 an diesen Rezeptor. Der Komplex wird in Clathrin beschichteten Vertiefungen internalisiert, die durch den AP2-Adapterproteinkomplex schnell zu unbeschichteten Vesikeln und weiter zu sauren protonenpumpenhaltigen Endosomen reifen. Bei niedrigem pH wird das Eisen vom Transferrin freigesetzt, von einer NADH-abhängigen Ferricyanidoreduktase zu Eisen II reduziert und über DMT1 durch die endosomale Membran transportiert. Der eisenfreie Transferrin-TfR-Komplex gelangt zurück zur Zelloberfläche, wo der neutrale pH eine Dissoziation des Komplexes bewirkt. Freier TfR kann nun erneut Eisen beladenes Transferrin aufnehmen [2].

## 1.2 Rolle des Transferrinrezeptors

### 1.2.1 Membranständiger Transferrinrezeptor

Der Transferrinrezeptor ist ein 180 kD großes, heterodimeres Membranprotein des Typs II, dessen Untereinheiten aus einer 61 AS (Aminosäuren)-kurzen cytosolischen Domäne, dem Membrandurchgang und der Ectodomäne (AS 89 bis 760) aufgebaut sind (Abbildung 1-1). In der cytosolischen Domäne konnte eine Phosphorylierungsstelle am S24 identifiziert werden, deren Funktion bislang ungeklärt ist. Zahlreiche Arbeiten an unterschiedlichsten Zellen zeigen oder widerlegen einen Einfluss der Phosphorylierung auf die Endocytose [23,49,54,61,130,131,168,177,223]. An den Positionen C62 und C67 befinden sich Palmitoylierungsstellen, die die Verankerung des Rezeptors in der Membran unterstützen [147] und notwendig sind für die Endocytose [10]. Der globuläre Teil der Ectodomäne wird durch einen so genannten Abstandshalter (*stalk*) von der Membran getrennt (AS 89–120) [77]. Die

AS C89 und C98 des *stalk* verknüpfen die Untereinheiten des TfR-Homodimers über Disulfidbrücken, sind jedoch für die Dimerisierung nicht essentiell [9]. Die Ectodomäne des TfR weist eine *O*-verknüpfte Glycosylierung am T104 innerhalb des *stalk*-Bereichs [89] und drei *N*-verknüpfte Glycosylierungen vom manosereichen und komplexen Typ an N251, N317 und N727 auf [91]. Die Struktur der Ectodomäne (AS 121–760) konnte 1999 von Lawrence *et al.* aufgeklärt werden [115]. In einer Röntgenkristallographie mit einer Auflösung von 3,2 Å wurden drei Domänen identifiziert: Erstens die *stalk*-nahe proteaseähnliche Domäne (AS 122–188, 384–606), die ein ähnliches Faltungsmuster wie die Membranglutamatcarboxypeptidase aufweist, jedoch keine eigene proteolytische Aktivität besitzt, zweitens die apikale Domäne (AS 189–383) und drittens die helikale Domäne (AS 607–760), die für die Dimerisierung des Rezeptors verantwortlich ist.



**Abbildung 1-1: Schematische Darstellung des TfR-Moleküls und die Struktur der Ectodomäne.**

Der TfR wird mit Ausnahme von reifen Erythrocyten und wenigen anderen terminal differenzierten Zellen sehr wahrscheinlich ubiquitär exprimiert, jedoch unterscheidet sich das Expressionslevel in den Geweben erheblich. Die höchste TfR-Dichte wird auf erythroiden Vorläuferzellen, der Plazenta, Spermatozyten und schnell teilenden Zellen erreicht, gerade solche Zellen, die aufgrund ihrer Funktion (Produktion von Hämoglobin, erhöhter Hämbedarf oder verstärkte DNA-Synthese) einen stark erhöhten Eisenbedarf besitzen. In Geweben wird der TfR vorwiegend in der basalen Epidermisschicht, dem endokrinen Pankreas, den Hepatozyten und Kupfferzellen, den Testis und der Hypophyse exprimiert [78].

Die TfR-Expressionsregulierung erfolgt vorwiegend auf transnationaler Ebene, jedoch besteht kein Zweifel darin, dass auch die Transkriptionskontrolle von Bedeutung ist. Mitogene

Stimulation [93,136], B- und T- Zellaktivierung [31,109,181], Infektion mit dem SV40-Virus [22] aktivieren seine Transkription, während bei der terminalen Differenzierung von myeloiden Leukämiezelllinien [124] sowie der Erythrocytenreifung [36,39,40] die TfR-Transkription herunterreguliert wird. Die 5'-flankierende DNA des Transkriptionsstarts enthält regulative Elemente ähnlich zu AP-1, die kritisch für die Promotoraktivität des TfR sind und für die regulierende Transkriptionsfaktoren gefunden wurden [93,124,166].

Die Funktion des TfR als zellulärer Rezeptor für die Eisenaufnahme erfordert eine genaue Expressionskontrolle in Abhängigkeit des zellulären Eisenstatus. Hohe Konzentrationen an Eisen bewirken die Herabregulation des TfR und die Aktivierung der Ferritinexpression, um den Anteil an freiem Eisen und der damit verbundenen toxischen Gefahr gering zu halten. Dieser Mechanismus wird auf translationaler Ebene über *iron regulatory proteins* gesteuert. Wie schon weiter oben beschrieben, binden diese Proteine bei Eisenmangel an 3'-gelegene IREs und stabilisieren diese im Fall des TfR gegen Abbau durch Ribonukleasen. Ferritin besitzt 5'-gelegene IREs. Die Bindung der gleichen *iron regulatory proteins* bewirkt hier deshalb im Gegensatz zum TfR eine Translationsrepression. Bei Eisenüberschuss entfällt dieser Mechanismus. Es wird nur wenig TfR exprimiert, während die Ferritintranslation aktiviert wird. Der freie Eisenpool wird damit gering gehalten.

## 1.2.2 Transferrinrezeptor 2

Neben dem lang bekannten TfR wurde 1999 ein zweiter Rezeptor für Transferrin entdeckt, der in seiner Ectodomäne 45 % Identität und 66 % Homologie unter Berücksichtigung chemisch verwandter AS zum TfR aufweist und deshalb als TfR2 $\alpha$  bezeichnet wurde [103]. Wie sein Name vermuten lässt, existiert neben dem TfR2 $\alpha$  auch eine  $\beta$ -Form, deren Transkript die Exons eins bis drei fehlen. Da diese für die cytoplasmatische, transmembranäre und einen Teil der extrazellulären Domäne codieren, wird vermutet, dass der TfR2 $\beta$  cytosolisch lokalisiert ist.

Im Unterschied zum TfR wird die Translation des TfR2 $\alpha$  nicht durch IREs reguliert und ist vollständig eisenunabhängig. Seine Expression erfolgt vorwiegend in differenzierenden Hepatozyten und Erythroblasten. Geringe Konzentrationen wurden auch in Milz, Lunge, Muskel, Prostata und mononukleären Blutzellen gefunden. Seine Gewebeverteilung und das Expressionslevel unterscheiden sich deutlich vom TfR, der in nahezu allen teilungsfähigen Zellen exprimiert wird. Der TfR2 $\alpha$  bindet jedoch Transferrin genau wie sein Homolog in pH-abhängiger Art und Weise und sorgt für die Eisenabgabe in die Zelle. Seine Affinität zu Transferrin ist aber 25-mal geringer [202]. Neben seiner Lokalisation ist dies vermutlich der Grund, warum er die Funktion des TfR nicht zu kompensieren vermag, denn TfR *knock out* Mäuse sterben bereits im Uterus [121]. Mutationen im TfR2 $\alpha$  können Eisenüberladung verursachen [167]. Ihm wird deshalb eine wichtige Funktion bei der Wahrung der Eisenhomöostase zugeschrieben.

## 1.2.3 Transferrin-Transferrinrezeptor-Komplex

Die Struktur des Transferrin-TfR-Komplexes war bis vor kurzem nur unzureichend geklärt. Verschiedene Chimäre aus humanem und Hühnchen-TfR, letzterer bindet kein humanes Transferrin, zeigten, dass die helikale Domäne wichtig für die Transferrinbindung ist [35]. Eine weitere Studie, die löslichen TfR, der mit Phosphatase gekoppelt war, verwendete, identifizierte eine RGD-Sequenz in der helikalen Domäne des TfR als Bindungsstelle [60]. Diese Beobachtung konnte durch eine umfangreiche Mutationsstudie bestätigt werden, in der neben dem G647 weitere wichtige Aminosäuren für die Transferrinbindung gefunden wurden [81]. Einige sind ebenfalls in der helikalen Domäne lokalisiert (L619, R629, Y643 und F650), andere konnten jedoch auch zwischen der proteaseähnlichen Domäne und dem *stalk* identifiziert werden (Y123, W124, D125). Strukturanalysen mit *X-ray hydroxyl radical footprinting* zeigten, dass die helikale Domäne des TfR mit dem C-terminalen Bereich des Transferrinmoleküls interagiert [123]. Kürzlich konnte nun die Struktur des Komplexes aufgelöst werden [41]. Kryoelektronenmikroskopische Daten wurden mit den bekannten Kristallstrukturen des TfR [115] und des N- und C-terminalen Bereichs des Transferrins [87,129] kombiniert und zeigten, dass der N-terminale Bereich des Transferrins zwischen der Membran und der Ectodomäne des TfR eingekeilt ist, während der C-terminale Bereich an die helikale Domäne des TfR bindet. Die Interaktion des Transferrins mit dem Rezeptor bewirkt eine relative Positionsänderung der beiden Transferrinbereiche zueinander. Es wird postuliert, dass zunächst der C-terminale Bereich mit relativ hoher Affinität an den Rezeptor bindet und dadurch der N-terminale Bereich durch eine Verschiebung in Position zu seiner Bindungsstelle gebracht wird. Bei niedrigem pH öffnet sich der C-terminale Bereich und Eisen kann direkt von einer Ferrireduktase, die mit der apikalen Domäne des TfR interagieren könnte, aufgenommen werden, so dass kein direkter Kontakt mit Wasser erfolgt und damit die Bildung von hochtoxischen Hydroxylradikalen verhindert wird. Die Eisenbindungstasche des N-terminalen Bereichs ist zur Membran gerichtet. Nach Freisetzung des Eisenmoleküls aus dem C-terminalen Bereich kommt es deshalb vermutlich zu einer Positionsänderung des N-terminalen Bereiches [41].

## 1.3 Shedding des Transferrinrezeptors

### 1.3.1 Ectodomänenshedding

Der TfR kann durch Proteolyse als lösliche Form ins Blut freigesetzt werden. Dieser als Shedding bezeichnete Prozess ist für viele Proteine unterschiedlichster Struktur und Eigenschaften beschrieben, dazu gehören Rezeptoren, Liganden, Zelladhäsionsmoleküle und Ectoenzyme (siehe Tabelle 1-1). Für den Sheddingprozess spielen die *a disintegrin and metalloprotease domain* (ADAM)-Proteasen eine zentrale Rolle. Sie können den Zinkpeptidasen der Metzincinsuperfamilie zugeordnet werden, deren katalytische Domäne durch die Konsensussequenz HEXXH charakterisiert ist. Die ADAM-Proteasen sind zumeist membranständige Glykoproteine mit einer konservierten Domänenstruktur bestehend aus

einer *N*-terminalen Signalsequenz gefolgt von Prodomäne, Metallo- und Disintegrindomäne, einer cysteinreichen Region, die normalerweise einen *EGF-Repeat* enthält und schließlich dem Transmembranbereich und dem cytosolischen Teil [29,30].

**Tabelle 1-1: Merkmale des Ectodomänensheddings für eine Auswahl an Proteinen <sup>a</sup>.**

Name	beteiligte Proteasen	Schnittstelle (...P1↓P1'...)	AS von der Membran
ACE	MP, nicht TACE	NSAR↓SEGP	27
APP	α-Sekretase: ADAM10, TACE	HHQK↓LVFF	12
	β-Sekretase: BACE1, BACE2	EVKM↓DAEF	28
	γ-Sekretase: Komplex aus Presenilin1, Nicastein, Pen2, Aph1	GGVV↓IATV	in der Membran
IL6-Rezeptor	TACE	LAVQ↓DSSS	1
L-Selektin	TACE	KLDK↓SFSM	11
Notch1-Rezeptor	TACE, ADAM10 / KUZ	KIEA↓VKSE	13
proTGFα	TACE	DLLA↓VVAA	9
proTNFα	TACE ADAM10 Matrilysin (MMP7)	LAQA↓VRSS	20
	MT4-MMP	SPLA↓QAVR	18
	Proteinase3	AQAV↓RSSS	21
proTRANCE	MT-MMP	GPQR↓FSGA	68
TfR	ADAM	ECER↓LAGT	12
TNFαR1	MP	QIEN↓VKGT	10
TNFαR2	TACE, SP	PGAV↓HLPQ	43

<sup>a</sup> In Anlehnung an Kaup [100]. SP Serinprotease, MP Metalloprotease.

Die zuerst entdeckte und am besten untersuchte Sheddingprotease wird als *tumor necrosis factor α converting enzyme* (TACE) bezeichnet. Diese als ADAM17 bezeichnete Protease spaltet die Membran gebundene Proform des Tumornekrosefaktors α (TNFα) [28,139], wurde jedoch nach ihrer Entdeckung auch für zahlreiche weitere Sheddingprozesse verantwortlich gemacht, inklusive des Sheddings von L-Selektin, *pro transforming growth factor α* (proTGFα), TNFα2-Rezeptor [157], Interleukin6-Rezeptor [7], Notch1-Rezeptor [34], β-amyloid precursor protein (APP) [187] und dem Prionprotein [207]. Neben ADAM17 stellen ADAM19, ADAM10 und ADAM9 weitere Mitglieder dieser Proteinfamilie dar, die in

Sheddingprozesse involviert sind. ADAM10 (auch KUZ in *Drosophila*) ist wie ADAM17 an der Freisetzung von TNF $\alpha$  [128], APP [113], Notch1-Rezeptor [150] und dem Prionprotein [207] beteiligt. ADAM9 wird für das Shedding des Heparin bindenden epidermalen Wachstumsfaktors (HB-EGF) [97] verantwortlich gemacht und ADAM19 für die Freisetzung von Neuregulin- $\beta$ 1, einem Mitglied der EGF-Familie [185].

Neben den ADAM-Proteasen sind auch die Matrixmetalloproteasen (MMP) von großer Bedeutung für das Ectodomänenshedding. So konnte für die Matrixmetalloproteinase Stromelysin1 (MMP3) gezeigt werden, dass diese wie ADAM9 HB-EGF freisetzt [190], während Matrilysin (MMP7) sowohl aktiven löslichen Fas-Liganden generiert [160] als auch TNF $\alpha$  aus Makrophagen freisetzt [88]. Weitere Proteasen, die ebenfalls an der Freisetzung von TNF $\alpha$  beteiligt sind, konnten als membranständige (MT) MMP17 (MT4-MMP) [63] und als die Serinprotease Proteinase3 identifiziert werden [165].

Die wichtigsten biologischen Funktionen des Sheddings sind erstens die Herabregulation von Zelloberflächenproteinen, um Rezeptorligandinteraktionen und Adhäsionseffekte zu reduzieren, zweitens die Erzeugung löslicher Proteine für systemische Signaltransduktion, drittens die Freisetzung von löslichen Rezeptoren als Kompetitor für membranständige Rezeptoren um den Liganden und viertens die Bildung von transmembranären und cytoplasmatischen Proteinfragmenten, die neue Signalfunktionen innerhalb der Zelle ausüben können [56]. Damit wird deutlich, dass Ectodomänenshedding hochspezifisch und reguliert ablaufen muss und Fehlfunktionen schwere pathophysiologische Konsequenzen nach sich ziehen können.

Es ist immer noch weitgehend unklar, wie dieser Prozess reguliert wird. MMPs werden als inaktive Proform exprimiert und erst anschließend durch proteolytische Abspaltung der Prodomäne im Extrazellularraum funktionsfähig, wodurch ihre Aktivität reguliert wird. MT-MMP und ADAM-Proteasen werden dagegen konstitutiv durch furinähnliche Serinproteasen bei ihrer Prozessierung im trans-Golgi aktiviert [56]. Verschiedene Reagenzien können das Shedding stimulieren und geben Hinweise auf beteiligte Signalwege. So wirken bei vielen Freisetzungsprozessen PMA und Ca<sup>2+</sup>-Ionophoren stimulierend. In einigen Fällen wird auch der Tyrosinphosphataseinhibitor Pervanadat als Aktivator beschrieben. Diese Mediatoren deuteten darauf hin, dass einerseits Proteinkinase C-abhängige Signalwege und andererseits Tyrosinkinasen oder calciumabhängige Signalwege involviert sind. Wie jedoch diese Signale Einfluss auf die Sheddingproteasen nehmen, bleibt ungeklärt. Bekannt ist, dass sowohl MMPs als auch ADAM-Proteasen durch *tissue inhibitors of metalloproteases* (TIMPs) inhibiert werden. Diese kleinen Proteine mit unterschiedlichen Expressionsmustern binden an Metalloproteasen und üben so ihre hemmende Wirkung aus. Die Regulation der TIMP-Expression kann somit die Sheddingaktivität beeinflussen. Ein weiterer Regulationsmechanismus wäre über die gezielte Kolokalisation von Protease und Substrat denkbar. Es konnte gezeigt werden, dass das L1-Adhäsionsmolekül an der Zelloberfläche reguliert gespalten wird. Ein Transport in die multivesikulären Körper bewirkt jedoch ein konstitutives Shedding dieses Proteins durch ADAM10 [86].



Ectodomänenshedding ist in einer Reihe von pathophysiologischen Prozessen wie Inflammation, Zelldegeneration und Apoptose sowie Onkogenese involviert. Die Komplexität der Sheddingprozesse und die notwendige Regulation werden darin deutlich, dass eine Protease unterschiedliche Substrate spaltet, umgekehrt aber auch ein Substrat von verschiedenen Proteasen erkannt und freigesetzt wird. Die Mehrheit der Zelloberflächenproteine ist jedoch resistent gegenüber diesem Prozess [56], folglich ist anzunehmen, dass das Shedding eines Proteins mit einer biologischen Funktion verknüpft ist, die jedoch in einigen Fällen noch zu untersuchen bleibt. So wird der TfR proteolytisch ins Blut freigesetzt und sein lösliches (*soluble*) Fragment, der Serum-TfR (sTfR), schon seit langem als diagnostischer Marker eingesetzt, obwohl seine Funktion am Beginn der hier vorliegenden Arbeit noch gänzlich unklar war.

### 1.3.2 Transferrinrezeptor-Protease

Der sTfR konnte bereits 1986 im humanen Serum [106] und später auch im Serum anderer Säugetiere [25,99] nachgewiesen werden. Die beim Menschen um 100 AS verkürzte Form komplexiert im Blut mit Transferrin [182]. Die Freisetzung des sTfR erfolgt durch proteolytische Spaltung am R100 [182]. Lange Zeit wurde dafür eine Serinprotease verantwortlich gemacht, die in den multivesikulären Körpern den sTfR von der Exosomenoberfläche freisetzen sollte [18,20]. Die Ergebnisse beruhten auf Inhibitionsstudien mit den Serinproteaseinhibitoren Diisopropylfluorophosphat oder Phenylmethylsulfonylfluorid, die die sTfR-Bildung aus aufgereinigtem TfR durch Inkubation mit HL60-Membranen inhibieren. Die Metalloprotease-Inhibitoren 1,10-Phenanthrolin und Ethylendiamintetraacetat (EDTA) zeigten dagegen keine Wirkung. Auch die Inkubation des TfR mit aktivierten MMP1, MMP2, MMP3 und MMP9 vermochte keine sTfR-Produktion auszulösen. Fraktionen aus weißen Blutzellen besitzen wie HL60-Membranen die Fähigkeit, exogenen TfR freizusetzen [1]. Dieser Vorgang kann ebenfalls durch Phenylmethylsulfonylfluorid inhibiert werden [98]. Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen zeigten Serinproteaseinhibitoren, wie auch Inhibitoren anderer Proteaseklassen, in Inhibitionsstudien an CHO-Zellen keine Wirkung auf die sTfR-Freisetzung [172]. In unserem Labor konnte kürzlich gezeigt werden, dass Serinproteaseinhibitoren in hohen Konzentrationen tatsächlich das Shedding aus HL60-Membranen inhibieren, jedoch zahlreiche andere Inhibitoren die gleiche oder eine bessere Wirkung aufweisen (Tabelle 1-2), insbesondere solche, die spezifisch für MMP und ADAM-Proteasen sind [102]. Im Unterschied zu den obigen Experimenten wurde dabei das TfR-Shedding aus Membranen beobachtet, die sowohl den TfR als auch die Protease enthielten. Die Ergebnisse legen nahe, dass die hemmende Wirkung von Serinproteaseinhibitoren und einem spezifischen Inhibitor für furinähnliche Proteasen (FCI) darauf beruht, dass durch diese die Aktivierung der eigentlichen Protease verhindert wird. Ferner konnte gezeigt werden, dass der Sheddingprozess in HL60-Zellen durch eine membranintegrale Metalloprotease vermittelt wird, die sensitiv gegenüber dem TNF $\alpha$ -Proteaseinhibitor2 (TAPI2) ist [102].

**Tabelle 1-2: Inhibition des sTfR-Freisetzungprozesses aus HL60-Zellen [102]<sup>a</sup>.**

Inhibitor	Konzentration	Inhibition ± S.A.M. <sup>b</sup>	inhibierte Proteasen
Pepstatin A	1 mM	0 %	verschiedene Aspartylproteasen
E64	85 µM	0 %	allgemeiner Inhibitor von Cysteinproteasen
Antipain	1 mM	0 %	Cysteinproteasen und schwächer gegenüber Serinproteasen
Chymostatin	1 mM	0 %	Serinproteasen aus der Chymotrypsinfamilie und lysosomale Cysteinproteasen
PefablocSC	1 mM	(31 ± 4) %	allgemeiner Inhibitor von Serinproteasen
Leupeptin	1 mM	0 %	Serinproteasen der Trypsinfamilie
FCI	1 mM	(87 ± 2) %	Proteinconvertasen
1,10-Phenanthrolin	3 mM	(94 ± 4) %	Metalloproteasen
EDTA	3 mM	(99 ± 0) %	Metalloproteasen und calciumabhängige Serinproteasen
EGTA	3 mM	(88 ± 7) %	Metalloproteasen und calciumabhängige Serinproteasen
Phosphoramidon	100 µM	0 %	Thermolysin und andere bakterielle Metalloproteasen sowie Kollagenase
MMP-Inhibitor1	1 mM	0 %	MMPs (MMP1, MMP3, MMP8 und MMP9)
MMP-Inhibitor2	1 mM	(92 ± 4) %	MMPs (MMP1, MMP3, MMP7 und MMP9)
TAPI2	1 mM	(87 ± 2) %	TNFα-Sheddingproteasen
TIMP1	1 µM	(55 ± 3) %	MMPs und ADAMs
TIMP2	1 µM	(15 ± 2) %	MMPs und ADAMs
TIMP3	1 µM	(19 ± 5) %	MMPs und ADAMs

<sup>a</sup> E64, L-trans-epoxysuccinyl-leucylamido-(4-guanidino)butan; EGTA, Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)N,N,N',N'-tetraacetat.

<sup>b</sup> in Relation zur Kontrolle ohne Inhibitor.

### 1.3.3 Regulation der Serumtransferrinrezeptor-Freisetzung

Über die Regulation der sTfR-Freisetzung ist nur wenig bekannt. Die sTfR-Konzentration im humanen Serum ist eng an den Eisenstatus gekoppelt. Auch im Zellkulturmodell zeigt sich, dass Kultivierung von HL60-Zellen in Eisen angereichertem Medium zur Verringerung der sTfR-Freisetzung um 60 % führt. Der TfR auf der Zelloberfläche nimmt dabei um 70 % ab. Der Eisenchelator Desferrioxamin weist die entgegengesetzte Wirkung auf [44]. Die Tatsache, dass die sTfR-Freisetzung proportional zur eisenabhängigen TfR-Expression ist, konnte später auch *in vivo* gezeigt werden [174]. Demnach repräsentiert der sTfR in Gleichgewichtssituationen 5 bis 6 % der gesamten TfR-Menge. Die sTfR-Freisetzung hängt also mit der Bereitstellung des Substrats, dem zellulären TfR, zusammen und kann deshalb als konstitutives Shedding eingeordnet werden. Eigene Untersuchungen an HL60-Zellen bestätigen, dass die sTfR-Freisetzung mit der Zellproliferation und damit mit der Zahl der zellulären TfR einhergeht [102]. Das für die Stimulation allgemeiner Sheddingprozesse

bekannte Reagenz PMA führt bei HL60-Zellen bemerkenswerter Weise zu keiner Erhöhung der sTfR-Freisetzung, sondern zu einer Reduktion [102]. Dieser Effekt beruht sehr wahrscheinlich auf der durch PMA ausgelösten Reduktion der TfR-Zelloberflächenexpression [44]. Pervanadat vermag dagegen das Shedding zu aktivieren [102]. Bei Veränderungen der Eisensituation sind aber vermutlich weitere Regulationsmechanismen beteiligt. Eine bedeutende Rolle scheint die *O*-Glycosylierung am T104 nahe der R100-Spaltstelle zu spielen. Sowohl die Entfernung des gesamten *O*-Glycans als auch die alleinige Entfernung des Sialinsäurerestes bewirken eine erhöhte Sheddingaktivität, die durch Mutation des T104 zu AS mit großen, stark geladenen Seitenketten wieder reduziert wird [170,173]. Die biologische Relevanz dieser Untersuchung bleibt jedoch fraglich, da der aus humanem Serum gereinigte sTfR sensitiv gegenüber *O*-Glycanase ist und mit Jacalinlektin, das spezifisch an *O*-Glycane bindet, nachgewiesen werden konnte [57]. Folglich verhindert die physiologisch vorhandene *O*-Glycosylierung den Sheddingprozess nicht, ein modulierender Einfluss ist aber denkbar.

## 1.4 Regulation des systemischen Eisenstoffwechsels

### 1.4.1 Eisenhomöostase und HFE

Die Regulation des Eisenhaushalts im Organismus erfolgt über eine bedarfsabhängige, kontrollierte Eisenaufnahme aus dem Darm. Die Regulationsmechanismen für den Eisentransport in das Blut sind jedoch ungeklärt. Die Entdeckung des Hämochromatoseproteins HFE erbrachte neue Aspekte in dieses Forschungsfeld. Das zunächst als HLA-A3 identifizierte Protein wird mit  $\beta$ 2-Microglobulin an der Zelloberfläche exprimiert. Mutationen in diesem Protein verursachen die vererbare Hämochromatose des Typs I, die mit starker Eisenüberladung des Körpers einhergeht und somit progressive Organfehlfunktionen verursacht. Der *knock out* des HFE-Gens in Mäusen bewirkt den gleichen Effekt [226]. Der genaue molekulare Mechanismus hinter diesem Phänotyp ist jedoch unbekannt. Die Hämochromatose des Typs I ist einer der meist verbreiteten Erbkrankheiten (3–8 Personen pro 1000) [50]. Es wird davon ausgegangen, dass etwa 10 % aller Kaukasier Träger eines krankhaften Allels sind [14]. Über 83 % der erkrankten Personen tragen die Mutation C282Y im HFE, die die Bindung zum  $\beta$ 2-Microglobulin verhindert, wodurch der Transport zur Zelloberfläche unterdrückt wird [67,211]. Den ersten Anhaltspunkt für die HFE-Funktion im Eisenstoffwechsel erbrachte die Entdeckung, dass HFE und der TfR einen Komplex bilden können [66]. Die Kristallstrukturen des HFE und des HFE-TfR-Komplexes zeigten, dass sich die HFE- und Transferrin-Bindungsstellen überlappen und beide Bindungspartner mit dem TfR-Dimer einen ternären Komplex des Typs HFE:TfR:TfR:Transferrin ausbilden können [26,116]. Die Bindung des TfR an HFE ist notwendig für dessen Endocytose [163]. In verschiedensten Studien wurde der Effekt von HFE auf die Bindung von Transferrin an den TfR untersucht und gefolgert, dass die Überexpression von Membran gebundenem oder

löslichem HFE eine Reduktion der Transferrinbindung bewirkt und damit die Eisenaufnahme reduziert [66,82,117,169]. Die Affinität des Transferrins an den TfR ist jedoch sehr hoch, so dass unter physiologischen Bedingungen bei deutlichem Transferrinüberschuss diese Effekte kaum eine Rolle spielen. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass eine HFE-Mutante, die eine 5000fach geringere Affinität zum TfR aufweist, ebenso vermag, die Eisenkonzentration in Zellen zu reduzieren [224]. Dies lässt einen anderen Mechanismus als eine Konkurrenz mit Transferrin für die Regulation des Eisenstoffwechsels erwarten. Da HFE nicht an den TfR2 bindet, ist ein gemeinsamer Signalweg dieser beiden Proteine ebenfalls ausgeschlossen [216].

HFE wird *in vivo* vorwiegend in Kryptzellen, Kupffer-Makrophagen und Monocyten exprimiert [15,155]. Dies sind bemerkenswerterweise die Zellen, die im Gegensatz zu den anderen Körperzellen bei der Hämochromatoseerkrankung nicht mit Eisen überladen sind, sondern einen Eisenmangel aufweisen. Genau diese Zellen sind auch an der Aufnahme von Eisen beteiligt, sei es aus dem Darm oder aus Bakterien und gealterten Erythrocyten. Diese *In-vivo*-Daten sprechen folglich gegen eine inhibitorische Wirkung von HFE bezüglich der Eisenaufnahme. Vielmehr scheint HFE die Eisenabgabe in das Blut zu inhibieren, denn die Expression von nicht mutiertem HFE in Makrophagen von Patienten, die homozygote Träger der C282Y-Mutation sind, normalisierte die Eisensituation in diesen Zellen [138]. Weitere Studien an der Makrophagen-Zelllinie THP-1 und der intestinalen Zelllinie HT29 zeigten, dass HFE den Eisenexport aus diesen Zellen beeinflusst, jedoch nicht die Eisenaufnahme [53,59]. Damit ist es nahe liegend, dass HFE direkt oder indirekt den Eisenexporter Ferroportin inhibiert und eine wichtige Funktion bei der Sensorik des Eisenstatus ausübt. Wie jedoch das Signal für den Eisenstatus im Organismus an die Retikuloendothelzellen und die duodenalen Kryptzellen gegeben wird, ist unklar. Es werden hierfür besonders zwei Mediatoren diskutiert, der sTfR als Funktionseisenregulator und Heparin als Eisenspeicherregulator [201].

## 1.4.2 Heparin

Das *hepatic bacterial protein* (Heparin), auch LEAP1 genannt für *liver expressed antimicrobial peptide 1*, wurde in seiner Funktion als antimikrobielles Peptid unabhängig von zwei Gruppen entdeckt [108,153]. Heparin wird nahezu ausschließlich in der Leber exprimiert. Geringe mRNA-Konzentrationen sind auch in Magen, Darm, Lunge und Herz gefunden worden [153,158]. Das 84 AS lange Präproheparin wird nach Abspaltung des 24 AS langen Signalpeptides und der Weiterprozessierung in seine 25 Aminosäuren lange Form in Blut und Urin freigesetzt. Die Expression des Proteins ist inflammationsabhängig [142]. Seine Rolle in der Eisenhomöostase konnte durch transgene Mausversuche geklärt werden [143-145]. Ein *knock out* des Genes bewirkt Eisenüberladung ähnlich der bei vererbbarer Hämochromatose. Die Überexpression von Heparin führt zur Anämie, während die konstitutive Expression eine Eisenüberladung im Mausmodell für Hämochromatose verhindern kann. Es konnte eine Korrelation zwischen Serumferritinkonzentration und Heparin-mRNA-Menge einerseits und Heparinexkretion in den Urin andererseits gezeigt werden [79,142]. In Hämochromatosepatienten war dieser Zusammenhang nicht mehr gültig,

jedoch konnte hier eine umgekehrte Korrelation zwischen Hepcidin-mRNA-Menge und Transferrinsättigung nachgewiesen werden [79]. Mit einem kompetitiven ELISA wurde im Blut eine Prohepcidinkonzentration von  $106 \pm 32$  ng/ml (entspricht 10,6 nM) detektiert, wobei die Messwertspanne von 52 bis 153 ng/ml reichte. Bei Patienten mit vererbbarer Hämochromatose reichte die Spannbreite von 12 bis 154 ng/ml ( $70 \pm 38$  ng/ml) [110]. In dieser Studie konnte weder eine Korrelation zwischen Prohepcidin und Transferrinsättigung im Serum nachgewiesen werden, noch ein Zusammenhang zwischen der Konzentration von Prohepcidin und der von Eisen und Ferritin. Kürzlich wurde neben dem Gendefekt von Hepcidin (Hämochromatose des Typs IIa) ein zweiter Gendefekt für juvenile Hämochromatose entdeckt und der pathobiologische Befund als Hämochromatose des Typs IIb bezeichnet. Das zum Gen gehörige Protein Hämojuvelin wird ähnlich wie Hepcidin in Leber, Herz und Muskel exprimiert. Da in juveniler Hämochromatose die Hepcidinkonzentration im Urin reduziert ist, wird vermutet, dass Hämojuvelin die Hepcidinexpression zu modulieren vermag [152].

Aufgrund der Expression in der Leber und der Konzentrationsänderung in verschiedenen Eisenstatussituationen sowohl auf mRNA-Ebene als auch im Blut wird Hepcidin als Speicherregulator des systemischen Eisenstoffwechsels diskutiert. Allerdings ist noch weitgehend unklar, wie der Eisenstatus in der Leber die Hepcidinexpression beeinflusst. Es wird spekuliert, dass Tfr2, HFE und Hämojuvelin auf die Hepcidinexpression wirken [75,152]. Im Gegensatz zur Maus wurde bisher jedoch keine HFE-Expression in humanen Leberzellen nachgewiesen, abgesehen von Kupfferzellen, die aber kein Hepcidin exprimieren. Die Injektion von Hepcidin in das Blut von Mäusen reduziert die mukosale Eisenaufnahme unabhängig von HFE. Hepcidin hat jedoch keinen Einfluss auf die Eisenabgabe aus dem Duodenum ins Blut [112], so dass es vermutlich eher auf die Aktivität von DMT1 als auf die von Ferroportin wirkt. Diese Ergebnisse konnten an CaCo2-Zellen bestätigt werden [219]. Im Gegensatz dazu zeigen neueste Untersuchungen, dass Hepcidin an Ferroportin bindet und dessen Internalisation in die Zelle bewirkt. Dies führt zu einer Inhibition des Eisenexports und einer Anreicherung von Ferritin im Zellinneren [141].

### 1.4.3 Rolle des löslichen Transferrinrezeptors in der Eisenhomöostase

Die sTfR-Konzentration im humanen Serum Erwachsener beträgt  $5,0 \pm 1,0$  mg/ml und ist unabhängig vom Geschlecht [5]. Bei Kindern sind die Konzentrationen auf 7,8 mg/ml erhöht und sinken dann nach und nach auf das Erwachseneniveau [189,208]. Die Menge an sTfR ist eng an den Eisenstatus gekoppelt. Da bei der Erythropoese der höchste Eisenbedarf besteht, spiegelt die sTfR-Konzentration die erythropoetische Aktivität wider. Gestörte Eisenzufuhr zum Erythron bewirkt erhöhte sTfR-Konzentrationen, die durch intravenöse Injektion von Eisenionen wieder korrigiert werden [24]. In Situationen erythroider Hypoplasmien, die durch Hypertransfusionen, verschiedene aplastische Anämien oder Chemotherapie hervorgerufen werden können, sinkt die sTfR-Konzentration, während sie bei pathophysiologischer Erythropoesestimulation, wie beispielsweise bei Thalassämien, hämolytischen Anämien

oder auch Sichelzellanämien ansteigt. Die Konzentrationen reichen von 0,5 mg/ml bei vollständig gestörter Erythropoese bis 100 mg/ml in Thalassämien [95].

Neben der erythropoetischen Aktivität beeinflussen auch andere Eisenstatus verändernde Situationen die sTfR-Konzentration. Erhöhte Transferrinsättigung [197], afrikanische Siderose [17] und genetische Hämochromatose [3,17,95] bewirken eine Reduktion der sTfR-Menge um 20 %. Bei anämischem Eisenmangel wird dagegen die sTfR-Konzentration um ein Vielfaches erhöht [25,73,95,146,161]. Skikne *et al.* konnten zeigen, dass bei häufigen Blutspendern zunächst nur die Menge an Serumferritin im Blut sinkt und der sTfR solange unverändert bleibt bis die Eisenspeicher in der Leber geleert sind. Erst bei funktionellem Eisenmangel, d. h. beim Absinken der Transferrinsättigung, steigt die sTfR-Konzentration signifikant an [186]. Im Gegensatz zu anderen Markern bleibt sie bei inflammatorischen Erkrankungen unverändert, es sei denn, diese bewirken eine Änderung des Eisenstatus [24]. Der sTfR repräsentiert somit einen wertvollen Marker sowohl für erythropoetische Aktivität als auch Gewebeeisenmangel.

Da der sTfR genau wie seine membranständige Form das Hämochromatoseprotein HFE auf Zellen und Geweben bindet [82,155,210] und er einen Marker für den zellulären Eisenbedarf darstellt, wird der sTfR als erythroider Regulator des systemischen Eisenstoffwechsels diskutiert [201]. Andererseits wird dem sTfR auch eine Rolle bei der Regulation des Hepcidins zugeschrieben [75]. Demnach nimmt der sTfR durch Bindung an HFE Einfluss auf die Hepcidinexpression in der Leber.

## 1.5 Zielsetzung für die vorliegende Arbeit

Der sTfR ist ein lang bekanntes Serumprotein, das als diagnostischer Marker und zur Verlaufskontrolle zahlreicher Krankheiten des Eisenstoffwechsels und der Erythropoese Verwendung findet. Trotz seiner diagnostischen Bedeutung ist nur sehr wenig über die molekularen Grundlagen seiner Entstehung bekannt. Insbesondere die Regulation des Sheddingprozesses ist ungeklärt. Die Sheddingprotease, die seinen Freisetzungsprozess vermittelt, wurde lange der Familie der Serinproteasen zugeordnet. Vor kurzem konnte jedoch gezeigt werden, dass in HL60-Zellen eine membranintegrale Metalloprotease, die sensitiv gegenüber TAPI2 reagiert, die Abspaltung des sTfR katalysiert. Seine physiologische Funktion war bei Beginn der hier vorgestellten Arbeit noch völlig unklar.

Im ersten Teil der Arbeit sollte zunächst ein Assay entwickelt werden, mit dem es möglich ist, das TfR-Shedding unabhängig von endogenem TfR zu untersuchen und zu quantifizieren. Dazu sollten verschiedene Zelllinien auf ihre sTfR-Freisetzungsaktivität hin überprüft werden, um anschließend in ausgewählten Zelllinien den Sheddingprozess genauer zu analysieren. Zum sensitiven und einfachen Nachweis der Freisetzungsaktivität sollte ein Sheddingreportersystem auf der Basis von Luciferase entwickelt werden. Für die Analyse von Mutationen standen zusätzlich Hamsterzellen zur Verfügung, die keinen endogenen TfR exprimieren. Insbesondere in diesen Zellen sollten die Eigenschaften der Sheddingprotease

genauer charakterisiert werden, um im Weiteren die Freisetzung von mutiertem TfR zu untersuchen. Den Schwerpunkt dieser Experimente sollten Inhibitionsstudien mit hoch spezifischen Inhibitoren bilden.

Zur Aufklärung der Regulationsmechanismen des TfR-Sheddings sollten im zweiten Teil der Arbeit umfangreiche Mutationsanalysen an sheddingrelevanten Bereichen des TfR durchgeführt werden. Dazu sollten Aminosäuren der TfR-*stalk*-Sequenz auf ihre strukturelle Funktion beim Shedding untersucht werden und Erkenntnisse über die Spezifität der Sheddingprotease gesammelt werden. Es sollten einerseits Punktmutationen um die Spaltstelle des TfR eingeführt werden und andererseits der gesamte TfR-*stalk* gegen die *stalk*-Bereiche anderer dem Shedding unterliegenden Membranproteine ausgetauscht werden.

Im dritten Teil der Arbeit sollten mögliche Mediatoren des TfR-Sheddings gefunden und analysiert werden. Insbesondere die Rolle des Transferrins, das einerseits die Eisenverfügbarkeit widerspiegelt und andererseits die Fähigkeit besitzt, an den TfR zu binden, sollte hier näher untersucht werden. Aus vorherigen Untersuchungen ging hervor, dass die RGD-Sequenz im TfR von hoher Bedeutung für die Transferrinbindung ist. Aus diesem Grund sollte dieser Bereich mutiert und sein Einfluss auf die Transferrinbindung hin überprüft werden, um so eine mögliche Wirkung von Transferrin auf das Shedding zu untersuchen.