

4 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde der Sheddingprozess des Transferrinrezeptors untersucht. Es konnten neue Erkenntnisse über beteiligte Proteasen gefunden werden. Weiterhin wurde ein Regulationsmechanismus aufgeklärt, der im unmittelbaren Zusammenhang mit der Eisenhomöostase steht. Zur Durchführung der dafür notwendigen Experimente war es erforderlich, ein System zu entwickeln, mit dem das Shedding sensitiv quantifiziert und die Auswirkungen von Mutationen im TfR auf dessen Freisetzung analysiert werden können.

4.1 Charakterisierung geeigneter Testsysteme

4.1.1 Transferrinrezeptor-Enzymkonstrukte

Ziel war es zunächst, ein System zu entwickeln, mit dem die sTfR-Freisetzung sehr sensitiv und unabhängig von endogener TfR-Expression untersucht werden kann. Hierzu wurde die cDNA des TfR mit der cDNA eines Enzyms verknüpft, das als Sheddingreporter dienen sollte. Chimäre Proteine, die aus dem zu untersuchenden Protein und einer funktionellen Einheit bestehen, finden bei einer Vielzahl von unterschiedlichsten Fragestellungen Anwendung. So werden Proteinkonstrukte mit fluoreszierendem Anteil, wie dem gelb fluoreszierenden Protein, in Zellen exprimiert, um die intrazelluläre Lokalisation [198] oder die Bindung an andere Proteine mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers zu untersuchen [176,195]. Extrazelluläre Botenstoffe werden mit IgG-Anteilen verknüpft, um ihre Wirkungsweise zu untersuchen [47,84]. Immunotoxine, bei denen das Toxin mit einem tumorspezifischen Antikörper verbunden ist, finden Anwendung in der Krebstherapie [33]. Protein-Enzym-Konstrukte, wie sie auch in dieser Arbeit hergestellt wurden, werden für die Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen Proteinen im Biolumineszenzenergietransferverfahren angewendet [135] oder für direkte Nachweise der Proteine im ELISA eingesetzt. Auch für den TfR ist ein solches System beschrieben. Die extrazelluläre Domäne des Rezeptors wurde als lösliches Fusionsprotein mit alkalischer Phosphatase an Stelle der *stalk*-Region in eukaryontischen Zellen exprimiert und in den Zellüberstand sekretiert [60]. Nach Aufreinigung konnten dieses Konstrukt und davon abgeleitete Mutanten auf ihre Ligandenbindung im ELISA untersucht werden. Feehan *et al.* setzten ein Enzym-Konstrukt für die Untersuchung des L-Selektin-Sheddings ein [68]. Sie fusionierten sekretorische alkalische

Phosphatase mit dem cytosolischen, transmembranären und membranahen Teil des L-Selektins und konnten damit Phosphataseaktivität sowohl in Zelllysaten als auch im Zellüberstand nachweisen. Die Aktivität im Zellüberstand war abhängig von L-Selektin-Shedding stimulierenden Reagenzien und konnte durch Hydroxamat basierte Proteaseinhibitoren gehemmt werden.

Für die Herstellung von TfR-Enzymkonstrukten erschien die Fusion mit sekretorischer alkalischer Phosphatase als ungeeignet, da der TfR ein TypII-Membranprotein ist. Das bedeutet, dass bei der Translation der *N*-Terminus im Cytosol verbleibt und die extrazelluläre Domäne mit dem *C*-Terminus endend durch die Membran geschleust wird. Die alkalische Phosphatase besitzt jedoch ihr sekretorisches Signalpeptid am *N*-Terminus. In dieser Arbeit wurden daher zunächst TfR-Enzymkonstrukte mit *firefly*-Luciferase hergestellt und später solche mit *renilla*-Luciferase. Die Enzyme sind evolutionär nicht miteinander verwandt und unterscheiden sich völlig in ihrer AS-Zusammensetzung. Sie lassen sich sehr gut in eukaryontischen Systemen unabhängig von posttranslationalen Modifikationen exprimieren. Es konnte gezeigt werden, dass die Fusionsproteine aus TfR und beiden Luciferaseformen enzymatische Aktivität aufweisen. Die Fusionsproteine werden in die Membran integriert, können jedoch nicht in den Überstand freigesetzt werden (3.2.2). Untersuchungen zur Glycosylierung des TfR zeigen, dass die Konstrukte keine Sialinsäurereste aufweisen und nur teilweise *N*-glycosyliert sind. Das veränderte Glycosylierungsmuster deutet darauf hin, dass der TfR nicht richtig gefaltet werden konnte und deshalb keine korrekte Glycosylierung möglich war. Bekannt ist, dass die Entfernung aller drei *N*-Glycosylierungen zur Degradation des Rezeptors im endoplasmatischen Retikulum führt [221]. Der Austausch von AS N727 und damit die Unterdrückung der *N*-Glycosylierung an dieser Stelle behindert die Prozessierung des TfR im Golgi-Apparat und seine Dimerisierung. Die *N*-Glycosylierung ist essentiell für die Produktion von aktivem TfR [90]. Durch Fusion des TfR-*C*-Terminus mit größeren Proteinen (61 kD für *firefly*-Luciferase, 36 kD für *renilla*-Luciferase) wird die Glycosylierung des TfR offenbar behindert und damit seine Lokalisation in der Zelle beeinflusst. Nach den Erkenntnissen dieser Arbeit sind demnach solche TfR-Fusionsproteine für funktionelle Studien nicht verwendbar.

4.1.2 Zellen ohne endogenen Transferrinrezeptor

Für die Expression von eukaryontischen Proteinen wird sehr häufig die Zelllinie CHO (*chinese hamster ovary*) verwendet. Diese Zellen lassen sich hervorragend transfizieren. Sie besitzen eine hohe Zellteilungsrate (Zellverdopplung in 24 h) und sind in der Lage große Mengen eines rekombinanten Proteins herzustellen. Die Transferrinaufnahme in CHO-Zellen wurde charakterisiert und entspricht der in anderen Zelltypen [220]. CHO-Zellen sind generell in der Lage, Eisen über alternative Wege aufzunehmen. Eine endocytosedefiziente CHO-Mutante zeigte die Fähigkeit, Eisen aus Eisensalzen ins Zellinnere zu transportieren, um Zellproliferation zu ermöglichen [105]. Für die Charakterisierung des humanen TfR und die Untersuchung seiner Endocytose und seines Recyclings mit Hilfe von Mutationen sollte eine Zelllinie ohne endogene TfR-Expression verwendet werden. Zur Herstellung einer solchen

TfR-defizienten Zelllinie wurden von McGraw *et al.* CHO-Zellen solange mit radioaktiv markiertem Transferrin behandelt, bis eine Zelllinie selektiert werden konnte, die keinen funktionsfähigen Hamster-Transferrinrezeptor besitzt und deren Endocytosemaschinerie nicht gestört ist [132]. Sie wurden als TfR-variante Zellen (TRV) bezeichnet. Diese neue Zelllinie TRVb diente als Grundlage für zahlreiche Versuche, in denen TfR-Mutationen getestet wurden [199,221]. Die TRVb-Zellen fanden auch Anwendung in der Untersuchung des TfR-Sheddingprozesses. So konnte von Rutledge *et al.* gezeigt werden, dass die sTfR-Freisetzung wie in anderen Zelllinien und im humanen Organismus durch Spaltung am R100 vermittelt wird [19,173,182]. Die Zellen sind somit hervorragend dazu geeignet, das TfR-Shedding genauer zu untersuchen.

4.1.3 Zellfreies Testsystem für die Untersuchung von Proteolyseereignissen in Membranproteinen

Die Charakterisierung von Proteolyseprozessen ist problematisch, wenn einer oder beide beteiligten Reaktionspartner membrangebunden vorliegen. Für lösliche Reaktanten sind der Nachweis ihrer Kolokalisation in der Zelle und die Durchführung der Reaktion *in vitro* durch einfaches Zusammengeben in der Regel ausreichend, um Prozesse unter physiologisch nahen Bedingungen zu untersuchen. Liegt jedoch eines der beiden Edukte Membran gebunden vor, wird die Analyse schwieriger. *In vitro* ermittelte Daten lassen sich *in vivo* oft nicht bestätigen. Für die proteolytische Aktivität bei Sheddingprozessen wurden beispielsweise über Peptidanalyse Proteasen für das Shedding von TNF α identifiziert, die in Zell-*knock down*- und *knock out*-Versuchen nicht bestätigt werden konnten [225]. Auch für die sTfR-Freisetzung wurden Untersuchungen durchgeführt, in denen Zellfraktionen mit aufgereinigtem TfR inkubiert wurden. Die Spaltung des TfR konnte durch Serinproteaseinhibitoren inhibiert werden, nicht jedoch durch den generellen Metalloproteaseinhibitor 1,10-Phenanthrolin oder durch EDTA [20]. Inhibitorversuche an CHO-Zellen konnten die Wirkung von Serinproteaseinhibitoren nicht bestätigen, jedoch erwiesen sich auch Inhibitoren anderer Proteaseklassen als unwirksam [172]. In den Studien von Kaup *et al.* zeigten dagegen TAPI2, MMP-Inhibitor2 (Inhibitoren für Matrixmetalloproteasen und ADAMs) und Furinkonvertaseinhibitor eine 40 bis 60 % Inhibition des TfR-Sheddings in HL60-Zellen [102]. Zellversuche mit Inhibitoren sind vor allem deshalb so problematisch, weil häufig toxische Nebenwirkungen auftreten, die einerseits durch das Lösungsmittel erzeugt werden, in denen der Inhibitor vorliegt, und andererseits durch den drastischen Einfluss, den viele weniger spezifische Inhibitoren auf Signalwege der Zelle nehmen. Die Alternative, die direkte Inkubation von Protease und Substrat, kann jedoch nur schwierig in einer physiologischen Umgebung erfolgen. Die Membranproteine müssen in Detergenzien solubilisiert werden, wodurch die Funktion der Protease beeinflusst werden kann. Außerdem bleibt dabei nicht gewährleistet, dass Substrat und Protease in korrekter Orientierung zueinander angeordnet sind. Zur Lösung dieser Schwierigkeiten wurde ein Membranassay eingesetzt [102]. Durch Isolierung von Membranfraktionen aus den zu untersuchenden Zellen, erhält man ein System, in dem Protease und Substrat in ihrer natürlichen Umgebung vorliegen und richtig zueinander orientiert sind. Beim

Einsatz von Inhibitoren und Stimulantien bleiben cytotoxische Prozesse ausgeschlossen. Für die funktionelle Charakterisierung des TfR-Sheddings auf TRVb-Zellen und die Untersuchung von Mutanten konnte dieser Membranassay für adhärenzte Zellen etabliert werden. Dieser ermöglichte es, die Freisetzung des sTfR unter physiologisch nahen Bedingungen zu analysieren. In einem Zeitintervall von 6 h konnte dabei eine ständige Zunahme des freigesetzten sTfR beobachtet werden, danach trat eine Sättigung ein. Nach 6 h war immer noch ausreichend TfR vorhanden, sodass die Stagnation der Freisetzung eher mit Abbau oder Inaktivierung der Protease zu erklären ist (3.3.1). Die Ursache dafür liegt demnach nicht in fehlender Substratverfügbarkeit sondern möglicherweise in der Freisetzung des proteolytischen Enzym in den Überstand wie es bereits für die Proteasen MT5-MMP und Furin beschrieben wurde [156,206]. In allen anderen Eigenschaften bestätigte sich die Effektivität des Assays. Es war damit auf zuverlässige Weise möglich, den Einfluss von Inhibitoren und Mutationen zu untersuchen. Der Membranassay ist somit ein hervorragendes Mittel zur Analyse des TfR-Sheddings.

4.2 Transferrinrezeptor-Shedding als ubiquitäres Ereignis Transferrinrezeptor tragender Zellen

Die Existenz des sTfR im humanen Serum ist bereits seit 1986 bekannt [106]. Da der Vorgang der Erythropoese der des höchsten Eisenbedarfs im Körper ist, weisen erythroide Zellen eine hohe TfR-Expression auf und werden deshalb als Hauptquelle der sTfR-Entstehung angesehen [24]. In Abhängigkeit der erythropoetischen Aktivität steigt seine Konzentration um den Faktor 20 oder sinkt auf ein Achtel des Normalwertes [25,95]. Tatsächlich konnte *in vitro* gezeigt werden, dass sowohl Reticulocyten als auch Erythroblasten sTfR freisetzen können [1,42,184]. In Ratten wurden die Ergebnisse durch *In-vivo*-Daten bestätigt [174]. Die Injektion von Reticulocyten bewirkte einen Anstieg der sTfR-Konzentration im Blut dieser Tiere. Der sTfR spiegelt jedoch neben der erythropoetischen Aktivität vor allem den Eisenstatus der Zellen wieder [24]. Seine Konzentration stimmt in Gleichgewichtssituationen nahezu exakt mit der Menge an Gesamt-TfR in allen Körperzellen überein [174]. Diese Untersuchung impliziert, dass alle TfR tragenden Zellen zur sTfR-Konzentration im Blut beitragen. Tatsächlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass alle untersuchten Zelllinien sTfR mit einer molekularen Masse um 80 kD freisetzen (3.1.1). Dies beinhaltete Zellen des Blutsystems sowohl myeloiden und promyeloiden Ursprungs als auch lymphatische Vorläuferzellen, Monocyten, T-Zellen und B-Vorläuferzellen. Die Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen bestätigen die Ergebnisse für HL60- und K562-Zellen [19,43]. Die Menge an freigesetzten sTfR unterscheidet sich in den verschiedenen Zellen. Neben den Unterschieden in der proteolytischen Freisetzungsaktivität variiert auch die molekulare Masse des sTfR von Zelllinie zu Zelllinie. Diese Unterschiede weisen auf unterschiedliche Glycosylierungen hin. Von Lee und Do konnte gezeigt werden, dass die *N*-Glycosylierungen im TfR je nach Zelllinie sehr unterschiedlich aufgebaut sind und in ihrer

Größe von Man5-R bis Man9-R variieren [119]. Erstmals konnte im Rahmen dieser Arbeit auch in einer Nichtblutzelllinie hepatozytären Ursprungs Sheddingaktivität bestimmt werden (3.1.1). Weitere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass auch Zellen epithelialen Ursprungs (HeLa, HEK293, HaCaT und H184A1) sTfR-Freisetzungaktivität aufweisen [213]. Diese Experimente lassen vermuten, dass alle TfR exprimierenden Zellen einen Beitrag zur sTfR-Konzentration im Blut leisten.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die Freisetzung des sTfR unterschiedliche TfR-Fragmente in der Zelle zurückbleiben (3.1.2). Neben dem vollständigen TfR ist ein kleines Fragment detektierbar, das der Größe nach dem in der Membran verbliebenen Teil entspricht. Weiterhin konnte ein etwa 115 kD großes Fragment nachgewiesen werden. Dies entspricht der Größe nach einem TfR-Dimer, dem eine der beiden Ectodomänen fehlt. Gleiches konnten auch andere Autoren in HL60- und K562-Zellen beobachten [21,102]. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der TfR in seiner intakten Form als Dimer gespalten wird. Zudem zeigen sie, dass erst eine TfR-Polypeptidkette gespalten wird, während die andere zunächst unversehrt bleibt. Für andere Membranproteine wurde dagegen beobachtet, dass gerade das Vorliegen eines Monomers Voraussetzung für das Shedding ist [114].

4.3 Charakterisierung des Transferrinrezeptor-Sheddings in TRVb-Zellen

Obwohl das TfR-Shedding schon seit langem bekannt ist, gibt es konträre Untersuchungen zur Identität der Protease. Wie in Abschnitt 4.1.3 beschrieben, liegen die Schwierigkeiten häufig in den gewählten Systemen. Trotz der Differenzen wird die TfR-Protease bis heute als Serinprotease beschrieben [24]. In unserer Arbeitsgruppe konnte jedoch eindeutig an lebenden HL60-Zellen und im Membranassay nachgewiesen werden, dass die membranständige TfR-Protease zur Familie der Metalloproteasen gehört und sich durch den TNF α -Proteaseinhibitor TAPI inhibieren lässt [102]. In der vorliegenden Arbeit konnten diese Ergebnisse an transfizierten TRVb-Zellen bestätigt werden (3.3 und 3.4.1). Die Freisetzung des TfR kann an gereinigten Membranen beobachtet werden, was darauf hindeutet, dass die beteiligten Proteasen auch in TRVb-Zellen membranständig sind. Die strukturelle Anordnung von TfR und Protease zueinander scheint dabei von besonderer Wichtigkeit zu sein. Die Freisetzung der Hauptspaltform des TfR kann durch den allgemeinen Metalloproteaseinhibitor 1,10-Phenanthrolin inhibiert werden. Weiterhin wirken auch die spezifischen Inhibitoren MMP-Inhibitor2 und TAPI2 (3.4.1). Solche Hydroxamat basierten Metalloprotease-Inhibitoren wirken durch Komplexierung des Zinkions im katalytischen Zentrum der Protease. Zwei Wasserstoffbrücken zu den AS-Resten von Glutamat und Alanin stabilisieren den Komplex. Die Selektivität der unterschiedlichen Inhibitoren wird durch verschiedene Seitenketten erzielt. MMP-Inhibitor2 wurde als hoch wirksamer Inhibitor für MMP1, MMP3, MMP7 und MMP9 beschrieben [159], jedoch können auch andere verwandte Proteasen inhibiert werden.

TAPI2 wurde entwickelt zur Inhibition des proTNF α -Sheddings [137]. Später wurde gezeigt, dass TAPI2 auch die Spaltung von *protease-activated receptor-1* [127], *placental leucine amino peptidase* [96], HER2 [45], proTGF α , L-Selektin, Interleukin6-Rezeptor und β -*amyloid precursor protein* (APP) [13] zu inhibieren vermag.

Da die gesuchte Protease in die Membran integriert ist, können nur membranständige MMPs, so genannte MT-MMPs, und Proteasen der ADAM-Familie in Frage kommen. Zur exakten Charakterisierung wurden kleine natürlich vorkommende Proteine, TIMPs, getestet, die an der Regulation der MMP- und ADAM-Aktivität beteiligt sind. Die Membran integrierten MMPs MT-MMP1, MT-MMP2 und MT-MMP3 reagieren sensitiv gegenüber TIMP2 und TIMP3 [37,104,183,218]. Die GPI-verankerten MMPs MT-MMP4 und MT-MMP6 können dagegen durch TIMP1, TIMP2 und TIMP3 inhibiert werden [63,64,107]. Da die sTfR-Freisetzung von TIMP1 gehemmt wird (3.4.1), können die untersuchten MT-MMPs als Proteasen ausgeschlossen werden, möglicherweise existieren jedoch weitere bisher nicht identifizierte MT-MMPs, die ein anderes Inhibitionsmuster aufweisen.

Über das Inhibitionsprofil der ADAM-Proteasen ist noch nicht sehr viel bekannt. Für ADAM17 (TACE) wurde beschrieben, dass es sich durch TIMP3 inhibieren lässt, nicht jedoch durch TIMP1, TIMP2 oder TIMP4 [11,70]. ADAM10 kann dagegen von TIMP1 gehemmt werden und zu geringeren Anteilen auch von TIMP3 [11]. Weiterhin wurden noch ADAM28, dass weder von TIMP1 noch von TIMP2 inhibiert wird [94], getestet und die lösliche Spleißvariante des ADAM12, die durch TIMP3 blockiert wird. Nach diesen Informationen würde für das TfR-Shedding insbesondere ADAM10 in Frage kommen. Allerdings wäre dann nicht der geringe Effekt von TIMP2 erklärt, sodass nicht auszuschließen ist, dass eine bisher nicht untersuchte oder noch unbekannte ADAM-Protease in das TfR-Shedding in TRVb-Zellen involviert ist. Erste Versuche mit RNAi-Experimenten bestätigen jedoch eine Beteiligung von ADAM10 am TfR-Shedding [52]. Die Beobachtung, dass auch der Furininhibitor FCI die TfR-Spaltung inhibiert (3.4.1), unterstützt die Vermutung, dass ADAMs in den Sheddingprozess involviert sind. Diese Metalloproteasen werden durch Furin und furinähnliche Proteasen aus ihrer Proform aktiviert. Da Furin und furinähnliche Proteasen durch höhere Konzentrationen des allgemeinen Serinproteaseinhibitors PefablocSC inhibiert werden, ist der Effekt dieses Inhibitors auf das TfR-Shedding ebenso erklärbar. Da auch die Untersuchungen an HL60-Zellen auf eine Zugehörigkeit der TfR-Protease zur ADAM-Familie hindeuten [102], kann das Shedding in TRVb-Zellen als hervorragende Grundlage für weitere Experimente dienen.

4.4 Alternatives Shedding

Alternatives Ectodomänenshedding wird bei einer Reihe von Membranproteinen beobachtet. Die Ectodomäne des in die Alzheimersche Krankheit involvierten APPs kann durch eine α -Sekretase (TACE oder ADAM10) 12 AS von der Membran entfernt freigesetzt werden. Im pathophysiologischen Fall spaltet eine β -Sekretase (BACE, Aspartatprotease) 28 AS von der

Membran entfernt. Durch einen weiteren Proteolyseprozess innerhalb der Membran wird das so genannte β A4-Peptid freigesetzt, das in der Lage ist, die amyloiden Filamente der Krankheit zu formen. Auch für die Freisetzung von TNF α werden neben TACE weitere Proteasen diskutiert, die an unterschiedlichen Stellen spalten (siehe Tabelle 1-1). PMA-Stimulierung führt beim Interleukin6-Rezeptor zur Spaltung zwischen Q357 und D358 [140]. Wird jedoch das Shedding durch bakterielle Toxine induziert, erfolgt die Proteolyse 10 AS *N*-terminal der oben beschriebenen Spaltstelle [212]. Die freigesetzten Rezeptoren sind unabhängig von der Spaltstelle biologisch aktiv. Auch für andere Proteine, wie TRANCE, wurde beobachtet, dass verschiedene Stimulantien zur Aktivierung verschiedener Sheddingprozesse beitragen [179].

Für den TfR wurde bisher sowohl im Blut als auch in der Zellkultur von HL60-, K562- und CHO-Zellen ein Spaltprodukt bei R100 beschrieben. Deletionen im cytoplasmatischen Teil des Rezeptors führen zu einer Spaltung am G91 schon frühzeitig auf dem Biosyntheseweg [171]. Von uns konnte gezeigt werden, dass auch natürliche TfR-Formen alternative Spaltprodukte hervorbringen. Viele der in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien setzen neben der Hauptform des TfR auch ein alternatives Spaltprodukt frei. Kaup *et al.* konnte zeigen, dass in U937-Zellen CathepsinG und Neutrophile Elastase in der Lage sind, TfR bei K95 bzw. V108 zu spalten [101]. Aus dem Zellüberstand von U937-Zellen konnte überraschenderweise ein sTfR isoliert werden, der mit der AS E111 beginnt [101]. Möglicherweise wird der sTfR nach seiner Freisetzung noch weiter prozessiert. Da CathepsinG und Elastase jedoch hauptsächlich in granulocytären Zellen exprimiert werden, kann damit kaum das alternative Shedding der anderen Zelllinien erklärt werden. Turkewitz *et. al.* identifizierten die AS R121 als Spaltstelle für Trypsin [203]. Unter physiologischen Bedingungen ist jedoch ein Kontakt des Verdauungsenzyms mit dem TfR ausgeschlossen. In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass die alternative Sheddingprotease zur Familie der Metalloproteasen gehört (3.4.1). Das membranständige Enzym zeigt ein ähnliches Inhibitionsmuster wie die R100-Protease. Sie lässt sich nicht durch Elastatinal inhibieren und reagiert sensitiv gegenüber 1,10-Phenantrolin, TAPI2 und MMP-Inhibitor2. Im Gegensatz zur R100-Protease kann das alternative Shedding auch durch den MMP-Inhibitor1 gehemmt werden, während TIMP2 kaum eine Wirkung zeigt und auch TIMP1 weniger aktiv ist (3.4.1). Das TIMP-Inhibitorprofil deutet darauf hin, dass MT-MMPs als Proteasen ausgeschlossen werden können. Die alternative Protease gehört demnach sehr wahrscheinlich zur Familie der ADAMs. Die Studien mit den TIMPs zeigen weiterhin, dass von den bereits mit TIMPs charakterisierten ADAMs besonders ADAM28 als alternative TfR-Protease in Betracht zu ziehen ist, jedoch können andere Mitglieder nicht ausgeschlossen werden.

Die Funktion solcher alternativen Sheddingprozesse ist nicht geklärt. Es wäre jedoch vorstellbar, dass das alternative Shedding durch andere Signale ausgelöst wird als das Hauptshedding. Ein solches Beispiel wurde bereits im Abschnitt 4.4 für den Interleukin6-Rezeptor beschrieben. PMA-Stimulierung führt bei diesem Rezeptor zur Spaltung zwischen Q357 und D358 [140]. Wird jedoch das Shedding durch bakterielle Toxine induziert, erfolgt die Proteolyse 10 AS *N*-terminal der oben beschriebenen Spaltstelle durch eine andere

Protease [212]. Sowohl intrazelluläre Signalwege als auch extrazelluläre Stimulantien können damit auf unterschiedlichem Wege zur Freisetzung des Rezeptors führen und somit seine Funktion beeinflussen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass alternatives Shedding in der Lage ist, eine durch Mutationen gestörte sTfR-Freisetzung zu kompensieren. Unterschiedliche Spaltstellen könnten sowohl die Funktion des freigesetzten Proteins als auch die des in der Membran verbliebenen Teils beeinflussen. Insbesondere dem in der Membran verbleibenden Fragment wird immer mehr Bedeutung zugeschrieben. So konnte gezeigt werden, dass die Membranfragmente zahlreicher freisetzbaren Proteine dem so genannten Ripping (regulierte Intramembranproteolyse) unterliegen. Dazu zählen das APP, der Notch-Rezeptor, E-Cadherin und der ErbB4-Rezeptor [205]. Eine wichtige Voraussetzung für das Ripping vieler Membranproteine ist die Abspaltung der Ectodomäne. Nur bei einem kurzen extrazellulären Anteil kann die Proteolyse in der Membran erfolgen. Alternatives Shedding wie beim APP beeinflusst diesen Vorgang. Durch das Ripping werden kurze Peptide sowohl in den Extrazellularraum als auch in das Cytosol freigesetzt. Letztere können wie das Peptid des Notch-Rezeptors und des ErbB4-Rezeptors als Transkriptionsfaktor im Zellkern wirken [205]. Die Funktion der freigesetzten Proteine kann durch alternative Spaltstellen beeinflusst sein. Beim sTfR wäre vorstellbar, dass eine verkürzte *stalk*-Region die Bindung an Transferrin beeinflusst. Bekannt ist, dass der *N-loop* von Transferrin zwischen Membran und Ectodomäne bindet [41]. Der sTfR bindet im Blut an Transferrin, wodurch seine postulierte Funktion als Regulator der Eisenhomöostase beeinflusst würde. Verringerte Bindungsaffinität bewirkt eine erhöhte Konzentration an freiem sTfR und beeinflusst seine Signalfunktion.

4.5 Einfluss des *stalk* auf Sheddingprozesse

Das Ectodomänenshedding stellt ein weit verzweigtes Netzwerk aus kompetitiven Prozessen dar. Ein Protein kann durch verschiedene Protease gespalten werden und umgekehrt kann ein Protease unterschiedlichste Proteinsubstrate spalten. Obgleich sehr viele Sheddingenzyme in den letzten Jahren identifiziert wurden, bleibt immer noch unklar, welchem Mechanismus die Substraterkennung unterliegt. Es werden sowohl TypI- und TypII-Membranproteine als auch Glycosylphosphatidylinositol (GPI) verankerte Proteine als Targets für Sheddingproteasen erkannt [13]. Systematische Analysen zu Konsensussequenzen mittels Substitutions- und Deletionsmutanten erbrachten keine generellen Erkenntnisse über den Erkennungsmechanismus von Sheddingproteasen. Untersuchungen weisen jedoch darauf hin, dass die cytoplasmatische Domäne nicht essentiell notwendig für das Shedding ist. Der Austausch von Transmembranteil und cytosolischer Domäne des L-Selektins gegen die des CD44 oder des CD33 haben keine Einfluss auf das PMA-induzierte Shedding [74]. Parkin *et al.* zeigten, dass das *angiotensin converting enzyme* (ACE) auch dann gesheddet wird, wenn Cytosol- und Transmembrandomäne durch einen GPI-Anker ersetzt werden [154]. Das Shedding des IL6R bleibt ebenfalls unverändert nach Deletion der cytoplasmatischen Domäne [140]. Für den TfR konnte gezeigt werden, dass die Entfernung der cytoplasmatischen Domäne eine Spaltung

während der Biosynthese bewirkt [171]. Die Funktion der Ectodomäne für den Sheddingprozess scheint dagegen unklar. Der Austausch der Ectodomäne des L-Selektins gegen Alkalische Phosphatase hatte keinen Einfluss auf das Shedding [68]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass für das Shedding des ACE vor allem der *stalk* von essentieller Bedeutung ist [151]. Das Ersetzen der ACE-Ectodomäne gegen die der Membrandipeptidase, ein nicht gesheddetes, GPI verankertes Enzym, verändert das Shedding nicht. Wird jedoch der *stalk* entfernt, bleibt der Proteolyseprozess aus. Das Ersetzen der Ectodomäne des ACE durch die von CD4, ein weiteres nicht gesheddetes Protein, führt dagegen zur Inhibition des Sheddings [175]. Umgekehrt vermag die Ectodomäne des ACE eine Spaltung des CD4 hervorzurufen. Zheng *et al.* schreiben der Ectodomäne des TNF α eine inhibitorische Funktion zu [225]. Sie sei insofern für das Shedding von Bedeutung, als dass sie andere Proteasen an der Spaltung hindert und somit die Selektivität des TNF α -Sheddings wahrt. Für den TfR konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Ectodomäne wichtig für das Shedding ist. Das Ersetzen der Ectodomäne durch Luciferase verhindert das Shedding (3.2.2). Die Ectodomäne dient beim TfR vor allem der korrekten Lokalisation in der Zelle, die offensichtlich auch für die Freisetzung des Membranproteins von Bedeutung ist.

Die führende Rolle für das Ectodomänenshedding übernimmt jedoch der *stalk*. Ohne ihn findet keine proteolytische Spaltung statt. Umgekehrt bewirkt das Einführen des *stalk* in Membranproteine eine Freisetzung von ansonsten sheddingresistenten Proteinen [6]. Bemerkenswert ist die Entdeckung zweier Spleißvarianten des HER4-Rezeptors, die sich lediglich im *stalk*-Bereich unterscheiden. Eine der beiden Varianten wird durch PMA-Stimulierung gesheddert (HER4 JMa), während die andere resistent gegen ihre Freisetzung ist (HER4 JMb) [62]. Entscheidend scheint die Funktion des *stalk* als Abstandhalter zur Membran. Seine Länge muss mindestens 11 AS betragen, damit Ectodomänenshedding möglich ist [56]. Eine Verkürzung des IL6R-*stalk* um fünf oder zehn AS bewirkt eine Inhibition der Proteolyse [140]. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch für p55 TNF-Rezeptor [32], p75 Neurotrophinrezeptor [215], proTGF α [92] und proTNF α [193]. Dabei ist vor allem die Größe der Deletion von Bedeutung. Kleine Deletionen von zwei bis drei Aminosäuren haben nur Einfluss, wenn sie direkt in der Spaltstelle vorgenommen werden.

Für die Aminosäurezusammensetzung des *stalk* unterschiedlicher shedbarer Membranproteine gibt es keine Gemeinsamkeit. Für einzelne Proteine sind jedoch bestimmte AS im *stalk* von entscheidender Bedeutung für den Proteolyseprozess und können mitunter auch eine besondere physiologische Relevanz besitzen. Eyries *et al.* identifizierten in drei nicht verwandten Individuen eine Mutation im *stalk* des ACE, die zu einer erhöhten Sheddingaktivität führt und damit einen Konzentrationsanstieg des Enzyms im Plasma bewirkt [65]. Die Freisetzung der Mutante konnte durch die gleichen Stimulatoren und Inhibitoren beeinflusst werden wie der Wildtyp. Für das Shedding von TGF α scheint die P2-P2'-Sequenz von Bedeutung zu sein [92]. Auch im TNF α ist die Spaltstelle notwendig und ausreichend für das Shedding durch TACE [225].

Die Bedeutung des TfR-*stalk* für das Shedding des Rezeptors wurde bisher kaum untersucht. Bekannt ist, dass die *O*-Glycosylierung am T104 die Freisetzung beeinflusst (1.3.3) [170]. Im ACE konnte gezeigt werden, dass die Entfernung der *O*-Glycosylierung zu alternativen Sheddingprodukten führt [180]. Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurden systematische Mutationen in den *stalk* des TfR eingeführt. In transfizierten TRVb-Zellen konnte gezeigt werden, dass die AS P1 und P1' wichtig für die korrekte Spaltung des TfR sind. Punktmutationen an diesen Stellen bewirken drastische Veränderungen im Freisetzungsprozess, unabhängig davon, ob die Aminosäurereste sanft verändert (L101G) oder durch die Mutation Ladungsänderungen leichter (R100G, L101D) und starker Art (R100D) hervorgerufen werden (3.4.1). Die Beobachtung, dass Mutationen ein verstärktes alternatives Shedding hervorrufen können, stimmt mit den Befunden von Alfalah *et al.* überein. Sie identifizierten im *stalk* des ACE eine Aminosäure, deren Mutation eine Freisetzungaktivität drei AS *N*-terminal der natürlichen Spaltstelle aktiviert [4]. Der proteolytische Prozess wird durch eine Serinprotease vermittelt. Die AS V108 und R109 des TfR zeigen keinen Einfluss auf seine Freisetzung. Sie stellen die P1- bzw. P1'-Position für die *in vitro* identifizierte TfR-Spaltstelle von Neutrophiler Elastase dar [101]. Das Enzym wurde aus U937-Zellen als alternative TfR-Protease isoliert. Die Mutationen V108G und R109G bewirken in einem Peptidassay eine vollständige bzw. 70 % Reduktion der Elastaseaktivität. Damit wird deutlich, dass in TRVb-Zellen das alternative Shedding durch eine andere Protease erzeugt wird. Die Inhibitionsuntersuchungen unterstützen diese Ergebnisse (3.4.1).

Der Austausch des gesamten TfR-*stalk* durch die *stalk*-Sequenzen von proTNF α und IL6R führt nicht zu einer Inhibition des Sheddings, im Gegenteil, das Einfügen des proTNF α -*stalk* führt zu einer zehnfachen Erhöhung der Sheddingaktivität (3.4.2). Diese Beobachtung stimmt damit überein, dass die Ectodomäne des proTNF α eine inhibitorische Wirkung auf das Shedding hat und ihr Austausch gegen TRANCE dazu führt, dass vermehrt durch eine andere Protease gespalten wird [225]. Das Spaltpattern von TfR-T α unterscheidet sich im Gegensatz zum TfR-IR deutlich vom wt-TfR. Das ist insofern erstaunlich als dass proTNF α wie der TfR zu den TypII-Membranproteinen zählt, während IL6R ein TypI-Membranprotein darstellt. Frühere Studien zeigten, dass der *stalk*-Austausch von proTNF α gegen den von IL6R in jeder Orientierung die Freisetzung von TNF α verhindert, während der umgekehrte Austausch im IL6R dazu führte, dass das Shedding nicht mehr durch PMA induziert werden musste, sondern spontan ablief [7]. Die Inhibitionsstudien innerhalb dieser Arbeit zeigen, dass an der Spaltung des TfR-IR die gleichen oder sehr ähnliche Proteasen beteiligt sind, wie am Shedding des wt-TfR, jedoch überwiegt bei dieser Mutante das alternative Sheddingprodukt (3.4.2). Dies kann möglicherweise dadurch erklärt werden, dass die Spaltreaktion an der R100-entsprechenden Stelle nur verlangsamt abläuft und damit das Gleichgewicht mehr zu dem des alternativen Sheddings verschoben wird, so wie es auch schon in verstärkter Weise bei den Punktmutationen beobachtet werden konnte. Die Inhibitoren der TIMP-Familie und der MMP-Inhibitor1 zeigen keinen Einfluss auf die Freisetzung des sTfR-T α . Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass in diesen Sheddingprozess eine weitere Protease involviert

sein muss, die ebenfalls zu den membranständigen Metalloproteasen, vermutlich zur Familie der ADAM-Proteasen gehört.

Generell zeigt der Austausch des gesamten TfR-*stalk* durch die *stalk*-Sequenzen von proTNF α und IL6R, dass die Spaltung des TfR nicht von seiner einzigartigen AS-Sequenz und der dadurch gegebenen Struktur abhängt. Dies wird unterstützt durch die Tatsache, dass in dem Bereich des *stalk* die geringsten Sequenzhomologien zwischen TfR unterschiedlicher Spezies bestehen [77]. Bemerkenswert ist jedoch, dass die AS P1 aber auch P1' der Hauptspaltstelle des TfR innerhalb der Ordnung der Säugetiere chemisch sehr ähnlich sind (siehe Tabelle 4-1). Alle Ergebnisse zusammengenommen weisen darauf hin, dass für die Spaltung vor allem die Gesamtstruktur des *stalk* von Bedeutung dafür ist, ob ein Protein gespalten wird oder nicht. Bestimmte AS sind jedoch nicht ohne weiteres durch strukturell ähnliche zu ersetzen. Sie sind für die jeweilige Proteasespaltstelle spezifisch.

Tabelle 4-1: Aminosäuresequenz der TfR-Spaltstelle in Säugetieren.

Spezies	Sequenz
Mensch	CERLAGT
Hund	CERPTGT
Katze	CERLAGT
Maus	CVKLAET
Hamster	CVRLAET

Die AS P1 und P1' sind grau unterlegt.

4.6 Bindung von Transferrin an den Transferrinrezeptor

Die Bindung des Liganden Transferrin an seinen Rezeptor stellt ein intensiv untersuchtes Modellsystem für Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen dar. Zur Bestimmung von Affinitätskonstanten wurden lebende Zellen, Zellmembranen, Zelloberflächen-TfR und löslicher TfR herangezogen. Sowohl für lösliche als auch membrandomänenhaltige Formen wurden K_D -Werte von 0,16 bis 39 nM bestimmt [43,76,81,116,216,217]. In dieser Arbeit konnte die Affinität des TfR zu ferri-Tf mit einem K_D -Wert von 7 nM bestimmt werden (3.5.2). Sie liegt damit im Bereich der bisher gemessenen Werte.

Zur Aufklärung des regulativen Einflusses von ferri-Tf auf das TfR-Shedding wurden TfR-Mutanten mit unterschiedlicher Affinität zu ferri-Tf hergestellt. In früheren Untersuchungen wurde bereits gezeigt, dass der Austausch von Glycin 647 zu Alanin innerhalb der RGD-Sequenz die Affinität von sTfR zu Transferrin stark verringert auf $K_D = 2345$ nM [81]. Für die AS Arginin und Aspartat innerhalb dieser Sequenz wurden bisher nur prozentuale Bindungswerte bestimmt, die darauf hinwiesen, dass die Mutation R646K in einer schwächeren

Transferrinbindung resultiert, während die Mutation D648E nur einen geringen Einfluss hat [60]. In den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnte für die Mutation R646K sowohl auf Zellen als auch *in vitro* erstmals eine genaue K_D bestimmt werden ($K_D = 93$ nM). Diese gegenüber dem wt schwächere Transferrinbindung untermauert frühere semiquantitative Messungen anderer Autoren [60]. Die Mutation D648E hat dagegen nur einen geringen Einfluss. Auch hier wurde erstmal eine konkrete K_D bestimmt werden ($K_D = 26$ nM). Die gemessene Dissoziationskonstante von 3160 nM für G647A (3.5.2) stimmt gut mit den Ergebnissen anderer überein ($K_D = 2345$ nM [81]). Im Gegensatz zu vielen anderen Studien wurde in der vorliegenden Arbeit Volllängen-TfR zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten eingesetzt, während andere Autoren löslichen TfR verwendeten, der sekretorisch exprimiert wurde.

4.7 Transferrin als Inhibitor der Serumtransferrinrezeptor-Freisetzung

Bisher sind nur wenige Mediatoren bekannt, die das Ectodomänenshedding beeinflussen. Kürzlich wurde über das Hefe-Zweihybrid-System ein Protein identifiziert, das an die cytosolische Domäne von ADAM12 bindet [192]. Die Herabregulation dieses als Eve1 bezeichneten Proteins reduziert das Shedding von proHB-EGF, proTGF α , Proamphiregulin und Proepiregulin. Da diese Proteine vorwiegend von anderen ADAMs gespalten werden, ist es nahe liegend, dass Eve1 generell eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von ADAMs spielt. Auch Cytokine und Hormone können indirekt unterschiedliche Sheddingprozesse beeinflussen [194,204].

Innerhalb der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein Ligand das Shedding seines Rezeptors beeinflusst. Der durch Shedding freigesetzte sTfR wird neben Hepcidin als systemischer Eisenregulator diskutiert [75,201]. Die Eisensättigung seines Liganden Transferrin repräsentiert im Blut einen zuverlässigen Indikator für funktionelle Eisenverfügbarkeit des Organismus. Soweit bisher bekannt ist, vermag Transferrin jedoch nicht die Eisenaufnahme aus dem Darm zu beeinflussen [59]. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass steigende ferri-Tf-Konzentrationen sowohl in HL60-Zellen als auch TRVb-Zellen eine Reduktion des TfR-Sheddings bewirken. Der Eisenchelator Desferrioxamin weist dagegen eine umgekehrte Wirkung auf. Der Effekt des Transferrins ist dabei unabhängig von der TfR-Expression. Unter den experimentellen Gegebenheiten änderte sich die TfR-Transkription und Translation durch die Zugabe steigender Transferrinkonzentrationen für HL60-Zellen nur geringfügig. In TRVb-Zellen, wo die TfR-mRNA ohne IREs exprimiert wurde, hatte Transferrin wie erwartet keinerlei Effekt auf die TfR-Expression (3.5.1). Bei einer normalen Transferrinsättigung von 30 % liegt ein ferri-Tf:TfR-Verhältnis von 10:1 vor, wenn man $1,4 \times 10^8$ Zellen /l Blut mit je 300 000 Rezeptormolekülen zugrunde legt. Dies entspricht unter den hier gewählten experimentellen Bedingungen einer ferri-Tf-Konzentration von 40 μ g/ml, bei der eine 52 % Reduktion der sTfR-Freisetzung erreicht wird.

Unter Eisenmangel (Transferrinsättigung unter 10 %, dies entspricht im Experiment einer ferri-Tf-Konzentration unter 14 $\mu\text{g/ml}$) würde die sTfR-Freisetzung um mehr als 20 % ansteigen.

Die hier gezeigten Daten stimmen mit Ergebnissen von Baynes überein [16]. Er zeigte, dass durch ferri-Tf die TfR-Expression und das Shedding abnehmen, der Effekt beim Shedding jedoch deutlich stärker ist. Gegensätzlich zu den Ergebnissen dieser Arbeit sind Untersuchungen von Chitambar *et. al.* zu bewerten [44]. In Dotblotanalysen des Zellüberstandes wurde kein Einfluss von ferri-Tf auf die freigesetzte sTfR-Konzentration nachgewiesen. Möglicherweise konnte kein Effekt festgestellt werden, weil das eingesetzte Transferrin mit sTfR verunreinigt war. Tatsächlich konnte in unserem Labor festgestellt werden, dass alle ferri-Tf-Chargen, die getestet wurden, mit geringen Mengen an sTfR verunreinigt waren (in der Arbeit nicht gezeigt). Bei hohen ferri-Tf-Konzentrationen über 200 $\mu\text{g/ml}$ wirkten sich diese Verunreinigungen auf die Messung aus.

Um herauszufinden, auf welchem Mechanismus die inhibitorische Wirkung von ferri-Tf beruht, wurden TfR-Mutanten mit unterschiedlicher Affinität zu ferri-Tf hergestellt. Die Untersuchung des Sheddings an den TRVb-Zellen, die diese verschiedenen TfR-Mutanten exprimieren, bestätigt den Einfluss von ferri-Tf. Die sTfR-Freisetzungaktivität in diesen Zellen ist direkt proportional zum pK_D -Wert der ferri-Tf-Bindung (3.5.3). Damit wird deutlich, dass die Wirkung des Transferrins von der Bindung zum TfR abhängt. Die Wirkung wird folglich nicht über einen indirekten Mechanismus durch Einflussnahme auf TfR-unabhängige Signalwege vermittelt, wie sie für das apo-Transferrin beschrieben sind [120,149,222]. Genauso kann eine Bindung an andere Proteine, wie der Protease und an deren Wirkmechanismus beteiligte Komponenten, ausgeschlossen werden.

Experimente an mikrosomalen Membranen zeigen, dass ferri-Tf auch hier einen inhibitorischen Effekt auf die sTfR-Freisetzung aufweist und die Wirkung mit der Bindungsstärke an den TfR zusammen hängt (3.5.4). Der inhibitorische Mechanismus des ferri-Tf wird somit weder durch TfR-abhängige Signalereignisse oder durch verstärkte Endocytose des TfR hervorgerufen, wie es von Baynes vermutet wurde [16], noch von einer veränderten intrazellulären Verteilung des TfR. Vielmehr beruht der Effekt des ferri-Tf auf einem direkten Einfluss auf die Spaltung des TfR. Möglicherweise verhindert ferri-Tf eine Spaltung der Disulfidbrücken und eine nachfolgende Dissoziation des Rezeptordimers und unterbindet so, dass der Rezeptor als Monomer gespalten werden kann. Ein ähnlicher Mechanismus wurde für den Thyrotropinrezeptor beschrieben [114]. Hier bewirkt der Ligand eine Monomerisierung des Rezeptors und aktiviert dadurch seine Spaltung. Da bei der Freisetzung des sTfR jedoch ein 115 kD Zwischenprodukt entsteht, das den Rezeptor in seiner dimerisierten Form mit nur einer Ectodomäne darstellt, scheint die Monomerisierung keine Voraussetzung für sein Shedding zu sein. Viel wahrscheinlicher blockiert ferri-Tf die Spaltstelle des TfR und dieser ist gerade dadurch vor Proteolyse geschützt. Diese These wird unterstützt durch neue Strukturanalysen des ferri-Tf:TfR-Komplexes. Demnach liegt der *N-Lobe* des Transferrins zwischen Ectodomäne und Membran [41], also in der *stalk*-Region des

TfR. Dies befähigt das ferri-Tf als kompetitiver Inhibitor für die Bindung der Protease an den TfR zu fungieren.

4.8 Der Serumtransferrinrezeptor als Regulator der Eisenhomöostase

Die Aufklärung des Regulationsmechanismus für das TfR-Shedding durch Transferrin gibt auch neue Einblicke in den systemischen Eisenstoffwechsel. Zur Zeit ist noch weitgehend unklar, wie die Eisenhomöostase gewahrt bleibt. Der sTfR spiegelt einerseits die Erythropoeseaktivität wider, bei der ein sehr großer Anteil des Körpereisens verbraucht wird, und ist andererseits ein Marker für den zellulären Eisenbedarf [95,186]. In der vorliegenden Arbeit konnte zusätzlich gezeigt werden, dass der sTfR nicht nur den Eisenbedarf der Zellen anzeigt, sondern auch bei mangelnder Eisenverfügbarkeit im gesamten Körper, widerspiegelt durch ferri-Tf, ansteigt (Abbildung 4-1, oben). Damit steht dem Körper ein Maß zur Verfügung, mit dem die Möglichkeit besteht, zu einem frühen Zeitpunkt auf ein Ungleichgewicht zwischen Eisenbedarf und Eisenverfügbarkeit zu reagieren. Hoher zellulärer Eisenbedarf führt zur verstärkten TfR-Expression in den Zellen und somit zur erhöhten sTfR-Freisetzung auf Grund konstitutiven Sheddings. Dieser Effekt kann durch ferri-Tf vermittelte Inhibition der TfR-Sheddings antagonisiert werden. Die resultierende sTfR-Konzentration reflektiert damit die Balance zwischen Eisenverfügbarkeit und zellulärem Eisenbedarf.

Es erscheint zunächst unklar, warum die Zellen ihren TfR gerade dann vermehrt abspalten, wenn sie seine Funktion als Transferrinrezeptor benötigen. Da jedoch nur ein kleiner Anteil aller TfR-Moleküle abgespalten wird, entsteht dadurch für die Zelle kein akuter Mangel an TfR. In *In-vivo*-Untersuchungen wurde bestätigt, dass der sTfR 5 bis 6 % des Körper-TfR ausmacht [174]. Im Blut kann der freigesetzte sTfR an zirkulierendes ferri-Tf binden (Abbildung 4-1, in der Mitte). Tatsächlich können bei normaler Transferrinsättigung 95 ± 3 % des sTfR mit Antikörpern gegen Transferrin kopräzipitiert werden [95]. Eine Berechnung des Gleichgewichts zwischen freiem sTfR und sTfR, der mit ferri-Tf komplexiert vorliegt, ergibt jedoch, dass die Konzentration an freiem sTfR drastisch ansteigt, wenn die Transferrinsättigung unter 10 % fällt (Abbildung 4-1, unten). Berücksichtigt man eine K_D von 7 nM für die Dissoziation des sTfR vom ferri-Tf, dann führt eine fünffach erhöhte sTfR-Konzentration von 25 mg/l, wie sie bei Eisenmangel und geringer Transferrinsättigung von 10 % auftritt, zu einer freien sTfR-Konzentration von 1000 pM im Blut. Dies ist ein Wert, der 20mal größer ist als unter normalen Bedingungen, bei denen 50 pM freier sTfR bei 35 % Transferrinsättigung und einer sTfR-Konzentration von 5 mg/l vorliegt. Die freie sTfR-Konzentration im Blut und ihre Variationsbreite liegen im Bereich typischer Hormonkonzentrationen wie Insulin (36 bis 600 pM) und Aldosteron (180 bis 790 pM) [196].

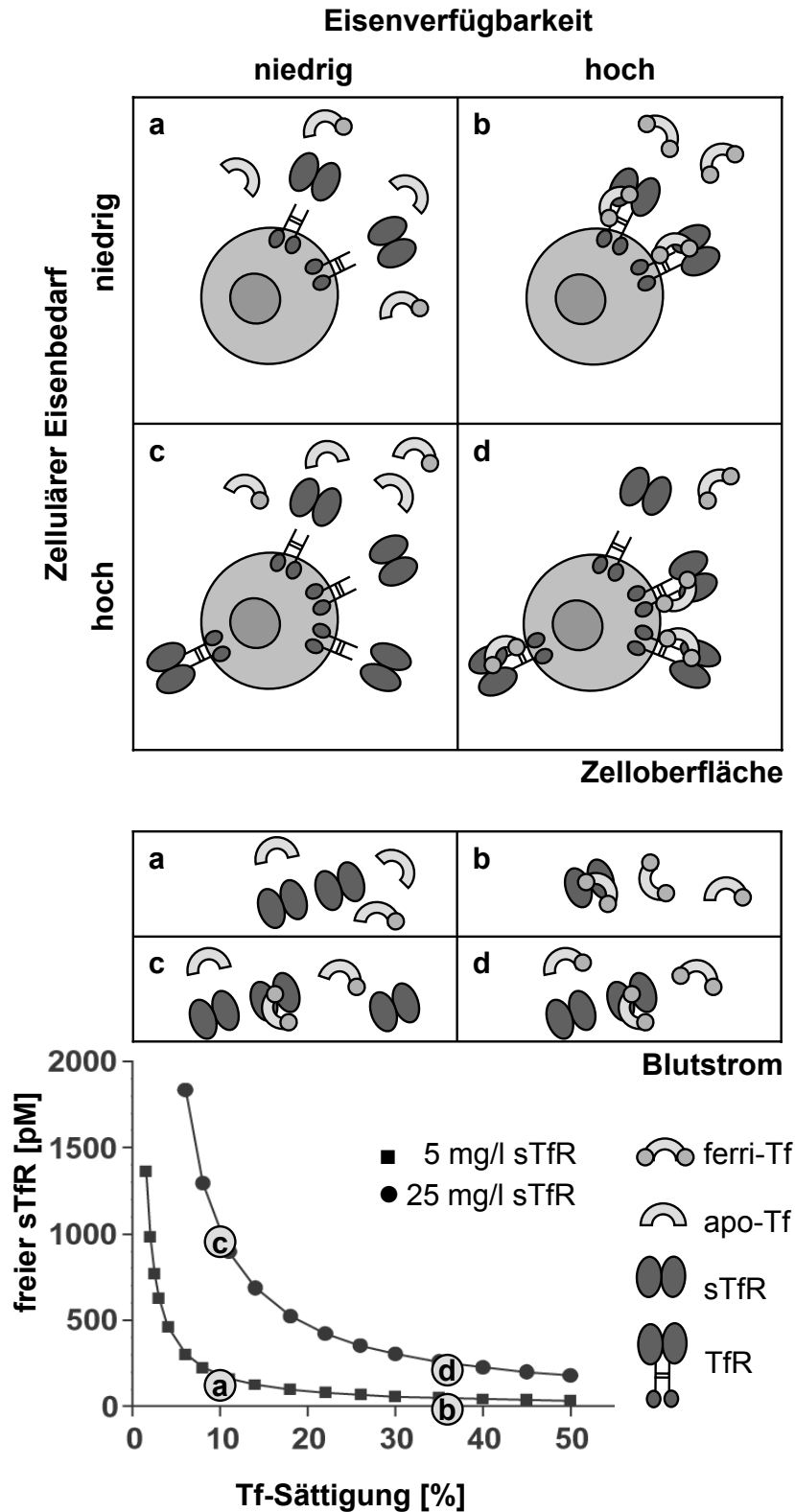


Abbildung 4-1: Modell der systemischen Regulation von freiem sTfR. (A) sTfR-Freisetzung in Abhängigkeit des zellulären Eisenbedarfs und der Eisenverfügbarkeit. (B) sTfR-Puffer im Blutstrom. (C) Konzentrationsabhängigkeit des freien sTfR von Transferrinsättigung und sTfR-Konzentration bei einer K_D von 7 nM für den ferri-Tf:TfR-Komplex. Die kleinen Buchstaben zeigen den gleichen Eisenstatus in den jeweiligen Abschnitten an.

Die Daten dieser Arbeit unterstützen die Hypothese von Townsend und Drakesmith. Die Autoren entwickelten ein Modell zu dem ungeklärten Wirkmechanismus des HFE, das Protein, welches bei der vererbaren Hämochromatose der Typs I mutiert vorliegt. Sie postulierten und zeigten später, dass HFE den Eisenexport aus Makrophagen zu inhibieren vermag. Weiterhin entwickelten sie neben anderen Autoren das Modell, dass freier sTfR als erythroider Regulator den Eisenexport aus reticuloendothelialen Zellen oder duodenalen Enterocyten aktivieren kann, indem er an HFE bindet und damit dessen inhibitorische Wirkung aufhebt [38,201]. Tatsächlich konnte in ersten Versuchen an der Makrophagenzelllinie THP-1 gezeigt werden, dass der sTfR in der Lage ist, den Eisenexport aus diesen Zellen zu stimulieren (persönliche Kommunikation mit Dr. Hall Drakesmith, Weatherall Institute of Molecular Medicine, Oxford University, GB). Bereits 1990 stellten Cook *et al.* fest, dass die sTfR-Konzentration mit der Eisenaufnahme korreliert und dass die Korrelation aufgehoben wird, wenn Probanden mit Eisenmangel ausgeschlossen werden [46]. Der sTfR scheint somit eine besondere Rolle bei der Eisenaufnahme zu spielen, wenn die Eisenspeicher geleert sind oder die Funktion des Eisenspeicherregulators eingeschränkt ist. Raja *et al.* beobachteten, dass fehlende Transferrinexpression in Mensch und Maus zur unkontrollierten Eisenaufnahme aus dem Darm führt. Wiederholte Injektionen von Transferrin bewirkten eine Verringerung der Eisenaufnahme in hypotransferrinämischen Mäusen [162]. Dies ist vermutlich auf eine starke Reduktion der freien sTfR-Konzentration durch Komplexierung mit Transferrin und eine Inhibition des Sheddingprozesses zurückzuführen. In Thalassämien liegt ebenfalls eine erhöhte Eisenresorption vor, obwohl die Eisenspeicher gefüllt sind. Bei dieser Krankheit ist die Zahl der Reticulocyten erhöht [55]. Die sTfR-Konzentration liegt bis zu 20fach über dem Normalwert [24]. Alle Ergebnisse zeigen, dass der sTfR die Eigenschaften des postulierten erythroiden Regulators der Eisenhomöostase erfüllt.

Neben seiner diskutierten Wirkweise an den Enterocyten wird dem sTfR auch ein Zusammenspiel mit dem Speicherregulator Heparin zugeschrieben. Heparin wird verstärkt von der Leber sezerniert, wenn Eisenüberschuss vorliegt. Es hat die Fähigkeit, die Wirkweise des Eisenexporters Ferroportin zu inhibieren und verhindert damit die weitere Eisenaufnahme aus der Nahrung. Ungeklärt ist jedoch, durch welche molekularen Mechanismen die Heparinexpression in Abhängigkeit vom Eisenstatus reguliert wird. Es wird vermutet, dass der TfR2 und HFE die Transkription über Signalwege beeinflussen [75]. Frazer *et al.* postulieren, dass der sTfR die aktivierende Wirkung des HFE inhibiert. Damit wäre durch den sTfR ein Informationsaustausch zwischen der Eisenspeichersituation in der Leber, den zellulären Eisenbedürfnissen und der Eisenverfügbarkeit möglich. Es muss jedoch noch gezeigt werden, dass HFE in Heparin produzierenden Zellen des Menschen exprimiert wird oder wie HFE von den Kupffer-Makrophagen aus ein Signal an die Leberzellen weiterleitet.

Übereinstimmend mit Finch, der die Eigenschaften des erythroiden und speicherabhängigen Regulators beschrieben hat, scheint es wahrscheinlicher, dass der sTfR direkt auf die Enterocyten im Darm einwirkt. Nach seinen Überlegungen muss der erythroide Regulator unabhängig vom Speicherregulator wirken, da beide in unterschiedlichen Situationen wirken [69]. Dies ist für den erythroiden Regulator vor allem dann der Fall, wenn der zelluläre

Eisenbedarf des Organismus so groß ist, dass er nicht durch Freisetzung von Eisen aus den Speichern kompensiert werden kann. Solche Situationen entstehen nach starkem Blutverlust, in Thalassemien, nach Gabe von Erythropoetin oder bei nahrungsbedingtem Eisenmangel. Die mangelnde Eisenverfügbarkeit spiegelt sich in einer geringen Transferrinsättigung mit Eisen wider. Einerseits wird, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, die Freisetzung des sTfR aktiviert und andererseits führt die geringe ferri-Tf-Konzentration im Blut zu einem Anstieg der freien nicht an ferri-Tf gebundenen sTfR-Moleküle, die nach dem beschriebenen Modell die Eisenresorption aus dem Darm aktivieren. Das Modell (Abbildung 1-1), welches im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf der Basis der durchgeführten Experimente erstellt wurde, ergänzt somit die von Townsend *et al.* und Finch *et al.* aufgestellten Modelle über die Eisenhomöostase zu einem schlüssigem Gesamtbild.