

5 ZUSAMMENFASSUNG

Der Transferrinrezeptor (TfR) ist ein Zelloberflächenprotein, das die zelluläre Eisenaufnahme durch Transferrin vermittelt. Im Blut findet sich eine lösliche Form des Rezeptors (sTfR), die durch proteolytische Spaltung des membrangebundenen Proteins C-terminal von R100 im *stalk*-Bereich zwischen Ectodomäne und Transmembranbereich freigesetzt wird. Der als Shedding bezeichnete Freisetzungsprozess wird in HL60-Zellen durch eine Metalloprotease vermittelt, die sensitiv gegenüber dem Tumornekrosefaktor α -Proteaseinhibitor TAPI2 reagiert und sehr wahrscheinlich zur Proteasefamilie der ADAMs zu zählen ist. Der sTfR dient als Marker für Eisenstatus und erythropoetische Aktivität. Es wird diskutiert, dass er als erythroider Regulator des systemischen Eisenstoffwechsels fungiert. In dieser Arbeit wurde untersucht, wie die Freisetzung auf molekularer Ebene vor allem bezüglich des Eisenstatus gesteuert und reguliert wird. Dadurch konnten neue Kenntnisse zur Funktion des sTfR erlangt werden.

Zur Untersuchung des Sheddingprozesses wurden verschiedene Zelllinien auf ihre sTfR-Freisetzungaktivität hin überprüft. Dabei konnte erstmals gezeigt werden, dass nicht nur Blutzellen in der Lage sind, ihren TfR freizusetzen, sondern auch Zellen aus solidem Gewebeverbund. Dies legt nahe, dass das TfR-Shedding ein ubiquitärer Prozess aller TfR tragenden Zellen ist. Des Weiteren konnte auf mechanistischer Ebene nachgewiesen werden, dass zunächst innerhalb des TfR-Dimers die Ectodomäne einer TfR-Kette und anschließend die der anderen proteolytisch abgespalten wird. Durch die Herstellung von TfR-Sheddingreporterenzymen wurde gezeigt, dass für die Freisetzung des sTfR eine korrekt glycosylierte, membranständige Form von essentieller Bedeutung ist, denn nur vollständig glycosylierte Rezeptoren gelangen an die Zelloberfläche und werden gesheddet. Der Anteil an freigesetztem TfR und seine Größe unterscheiden sich je nach Zelltyp, was auf eine Regulation des Sheddingprozesses hindeutet. Neben einem Hauptfragment mit einer Größe von etwa 80 kD wird von vielen Zellen durch alternative Spaltung eine kleinere Nebenform mit einer Größe von 76 kD freigesetzt.

Zur Analyse dieser unterschiedlichen TfR-Spaltstellen wurden Mutationen in den TfR-*stalk* eingefügt. Die vorgenommenen Aminosäureaustausche um die Hauptspaltstelle des TfR (R100G, R100E, L101G, L101D) führen zu einer Inhibition der Proteolyse und weisen damit auf die Spezifität des Proteolyseprozesses hin. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die

Inhibition an der Hauptsplattstelle durch alternatives Shedding kompensiert wird. Inhibitionsanalysen der *stalk*-Mutanten zeigen, dass an der Freisetzung des sTfR zwei membranständige Proteasen beteiligt sind, die sich durch allgemeine Metalloproteaseinhibitoren inhibieren lassen, jedoch unterschiedliche Sensitivität gegenüber spezifischeren Inhibitoren für die verschiedenen Metalloproteaseklassen aufweisen. Das Inhibitorprofil deutet daraufhin, dass sowohl die Freisetzung der Hauptform des sTfR als auch die der alternativen Form durch ADAM-Proteasen vermittelt wird. Der gesamte Austausch des TfR-*stalk* gegen den von Interleukin6-Rezeptor und den des proTumornekrosefaktor α bewirken keine Inhibition des Sheddings. Alle Ergebnisse zusammen zeigen, dass die Aminosäuren um die Splattstelle die sTfR-Freisetzung stark beeinflussen, aber auch die dreidimensionale Struktur des *stalk* von entscheidender Bedeutung für das Shedding ist.

Die Struktur des TfR-*stalk* stellt eine für die Proteaseerkennung wichtige, statische Eigenschaft dar. In dieser Arbeit konnte zusätzlich gezeigt werden, dass ein Transportmolekül des Eisenstoffwechsels, das ferri-Transferrin (ferri-Tf), diesen Prozess beeinflusst. In HL60- und TRVb-Zellen wird durch steigende Konzentrationen an ferri-Tf die sTfR-Freisetzung inhibiert, unabhängig von der zellulären TfR-Expression. Die Analyse von Zellen, die TfR-Moleküle mit unterschiedlicher Affinität zu ferri-Tf exprimieren, erbrachte einen direkten Zusammenhang des Inhibitionseffekts mit der Bindung von ferri-Tf an den TfR. Der gleiche Effekt konnte auch in gereinigten Membranen nachgewiesen werden. Der Inhibitionsmechanismus muss demnach auf einer signalwegunabhängigen, kompetitiven Wirkung des ferri-Tf beruhen. Aufgrund der bekannten Kristallstruktur des ferri-Tf:TfR-Komplexes ist zu vermuten, dass durch die Bindung von ferri-Tf die Wechselwirkung der Protease mit dem *stalk*-Bereich unterbunden wird.

Aus den gewonnenen Erkenntnissen wurde ein Modell entwickelt, nach dem die Freisetzung des sTfR sowohl vom zellulären Eisenbedarf als auch von der systemischen Eisenverfügbarkeit gesteuert wird. Der freigesetzte sTfR wird nach diesem Modell im Blut durch ferri-Tf gepuffert, so dass lokale Effekte den Stoffwechsel nur dann beeinflussen, wenn sie das systemische Gleichgewicht verändern. Die Untersuchungen dieser Arbeit geben deshalb neue Erkenntnisse zur Funktion des sTfR und zeigen erstmals wie seine Freisetzung reguliert wird.

SUMMARY

The transferrin receptor (TfR) is a cell surface protein that mediates cellular iron uptake by ferri-transferrin (ferri-Tf). A soluble form of the receptor is found in the bloodstream. It is generated by proteolytic cleavage of cellular TfR C-terminal of R100 within the juxtamembrane region of the ectodomain. In HL60 cells this shedding process is mediated by a metalloprotease of the ADAM-family sensitive to the tumour necrosis factor α protease inhibitor TAPI2. The sTfR is used as diagnostic marker for iron demand and erythropoietic activity and furthermore is postulated as erythroid regulator of systemic iron metabolism. In this study the regulation mechanism of sTfR release is examined and new knowledge attained for the function of the sTfR.

To examine the shedding process different cell lines were analysed for TfR-release activity. For the first time it is shown that not only blood cells but also tissue cells are able to shed sTfR from the cell surface, indicating that TfR-shedding is a general process of all TfR expressing cells. The release occurs by sequential proteolytic cleavage of the two TfR-ectodomains in each TfR-dimer. A prerequisite for shedding is a proper glycosylation of the TfR as shown by TfR-shedding reporter enzymes. Besides cleavage at the major cleavage site many cell lines generate a 4 kD smaller, alternative shedding product of the TfR.

The different cleavage sites were analysed by mutation studies within the TfR stalk region. Point mutations around the major cleavage site results in an inhibition of shedding indicating the specificity of the proteolytic process. The inhibition of the cleavage at the major site is compensated by enhanced alternative shedding. Inhibitor studies reveal that two different metalloproteases of the ADAM family are involved in TfR release. Replacing the TfR-stalk with the corresponding sequences from pro tumour necrosis factor α and interleukin 6 does not inhibit sTfR release. In conclusion all results show that (I) the amino acids around the cleavage site have an influence on TfR-shedding and (II) the three dimensional structure of the stalk is relevant for the cleavage.

The structure of the TfR-stalk is an important, determinate attribute for protease recognition. In this study it is shown additionally that a transport molecule of iron metabolism, ferri-transferrin (ferri-Tf), has the ability to influence TfR-shedding. In HL60- and TRVb-cells increasing ferri-Tf concentrations leads to decreased TfR release, independent of cellular TfR-

expression. Experimental analysis of cells expressing TfR-mutants with different affinities for ferri-Tf shows, that the inhibition effect of ferri-Tf is dependent on its binding to the TfR. The same effect is also observed in membranes indicating that the inhibition mechanism is independent of signal transduction or endocytosis effects. The inhibitory effect is thus rather a result of a competitive interaction between ferri-Tf and the protease for the TfR. The known crystal structure of the ferri-Tf:TfR complex suggests that binding of ferri-Tf to the TfR prevents an interaction of the protease with the stalk-region of the TfR.

The conclusions of this study are summarised in a model. The release of sTfR is controlled by cellular iron demand as well as by iron availability. Released sTfR can be buffered in the blood stream by ferri-Tf, thereby local effects only influence the iron metabolism, if the systemic balance is changed. The here presented study gives new insight into the function of the sTfR and shows for first time how its release is regulated.