

OVER DE OPNAME VAN IJZER
DOOR
ERYTROÏDE CELLEN

THE UPTAKE OF IRON
BY
ERYTHROID CELLS

OVER DE OPNAME VAN IJZER DOOR ERYTROIDE CELLEN

THE UPTAKE OF IRON BY ERYTHROID CELLS

PROEFSCHRIFT

**TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR IN DE
GENEESKUNDE**

AAN DE ERASMUS UNIVERSITEIT ROTTERDAM

OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS

PROF. DR. M.W. VAN HOF

EN VOLGENS BESLUIT VAN HET COLLEGE VAN DEKANEN.

DE OPENBARE VERDEDIGING ZAL PLAATSVINDEN OP

WOENSDAG 12 DECEMBER 1984 TE 14.00 UUR

DOOR

ALBERTUS VELDMAN

geboren te Blankenham (O.)

BEGELEIDINGSCOMMISSIE

PROMOTOR : PROF. DR. H.G. VAN EIJK

OVERIGE LEDEN: PROF. J.H.P. WILSON
PROF. DR. J. VAN GOOL
PROF. DR. J.F. KOSTER

Dit proefschrift kwam tot stand met steun van de Stichting "BION". De auteur was voor een periode van 3 jaar aangesteld bij Z.W.O. via de Werkgemeenschap "Stofwisselingsfysiologie bij Dieren" in BION-verband (subsidienr. 14-96-016).

Het proefschrift werd bewerkt op het Instituut Chemische Pathologie, Erasmus Universiteit Rotterdam.

PUBLIKATIES

Het beschreven onderzoek is neergelegd in een aantal publikaties.

1. A. Veldman, C. van der Heul and H.G. van Eijk.
Two mechanisms are involved in the process of iron uptake by reticulocytes. In: Structure and Function of Iron Storage and Transport Proteins, I. Uitg.: Elsevier Science Publishers B.V. (Ed. Urushizaki et al.) pp. 335-337 (1983).
2. A. Veldman, M.J. Kroos, C. van der Heul and H.G. van Eijk.
Are lysosomes directly involved in the iron uptake by reticulocytes? Int. J. Biochem. 16¹, 39-47 (1984).
3. C. van der Heul, A. Veldman, M.J. Kroos and H.G. van Eijk.
Two mechanisms are involved in the process of iron-uptake by rat reticulocytes.
Int. J. Biochem. 16⁴, 383-389 (1984).
4. A. Veldman, C. van der Heul, M.J. Kroos and H.G. van Eijk.
Fluorescence probe measurement of the pH of the transferrin micro-environment during iron uptake by erythroid rat bone marrow cells. Submitted to the British Journal of Haematology. 1984.

INHOUD

	pag.
HOOFDSTUK 1.	
INLEIDING, LITERATUUROVERZICHT EN PROBLEEMSTELLING	1
HOOFDSTUK 2.	
MATERIALEN EN METHODEN	15
1. Chemicaliën	15
2. Media	15
3. Isotopen	15
4. Transferrine, isolatie en radioactief gemerkt met ^{125}I en ^{59}Fe	16
5. Cellen	17
5.1. Reticulocyten van de rat	17
5.2. Rattenbeenmergcellen	18
6. Algemene incubatieprocedures van erythroïde cellen met transferrine	19
7. Isoelectrische focussering	19
7.1. Bereiding polyacrylamide gel	19
7.2. Focussering	20
7.3. Het kleuren van de gel	20
8. Radioactiviteitsmetingen	20
HOOFDSTUK 3.	
ZIJN LYSOSOMEN DIREKT BETROKKEN BIJ DE IJZEROPNAME DOOR RETICULOCYTEN	22
HOOFDSTUK 4.	
OVER MECHANISMEN WELKE BETROKKEN ZIJN BIJ HET PROCES VAN IJZEROPNAME DOOR RATTENRETICULOCYTEN	42

HOOFDSTUK 5	
FLUORIMETRISCHE BEPALING VAN DE pH VAN DE TRANS- FERRINE MICRO-OMGEVING TIJDENS DE IJZEROPNAME DOOR ERYTROIDE RATTENBEENMERGCELLEN	61
ALGEMENE DISCUSSIE	77
SAMENVATTING	81
SUMMARY	83
NASCHRIFT	85
CURRICULUM VITAE	86

HOOFDSTUK 1

INLEIDING, LITERATUUROVERZICHT EN PROBLEEMSTELLING

Sinds de ontdekking van het biochemisch belang van ijzer in de 18e eeuw is duidelijk geworden dat ijzer essentieel is voor een groot aantal biologische processen. Met name toen er in de dertiger jaren een ijzerisotoop voor onderzoek beschikbaar kwam, is het onderzoek omtrent de ijzerstofwisseling in een stroomversnelling geraakt. Het ijzermetabolisme van de mens is zeer economisch getuige het feit dat een gemiddelde volwassen man van 75 kg ongeveer 1 mg ijzer per dag uit het voedsel opneemt en evenveel weer uitscheidt. (De verdeling van ijzer in het lichaam over een aantal compartimenten en componenten en de onderlinge uitwisseling tussen deze compartimenten is weergegeven in figuur 1.)

De hoeveelheid ijzer, welke tussen de verschillende lichaamscompartimenten wordt uitgewisseld bedraagt per dag ongeveer 30 mg. De ijzeropname uit het voedsel is kritisch, omdat deze afhangt van de molaire toestand van ijzer in het dieet.

Het meeste ijzer in het menselijk lichaam komt voor in de erythrocyt (fig. 1) waar het is ingebouwd in de heemgroep van het hemoglobinemolecuul. Hierdoor is de erythrocyt in staat zijn zuurstoftransporterende functie te vervullen doordat ieder ijzeratoom dat in de heemgroep in tweewaardige vorm aanwezig is zuurstof in moleculaire vorm kan binden.

Een gestoorde ijzerstofwisseling is dan ook de oorzaak van anemie (te kort aan circulerend Hb) bij ongeveer 15% van de wereldbevolking.

Heemijzer is daarnaast essentieel in cytochromen voor het elektronentransport in de mitochondriën en hydroperoxidases (catalase, peroxidase) welke H_2O_2 afbreken. Naast deze heembevattende enzymen verricht ijzer een rol in niet-heem-bevattende enzymen als flavoproteïnen, dehydrogenases, oxidases en oxygenases, wat resp. oxiderende enzymen en zuurstof-inbouw

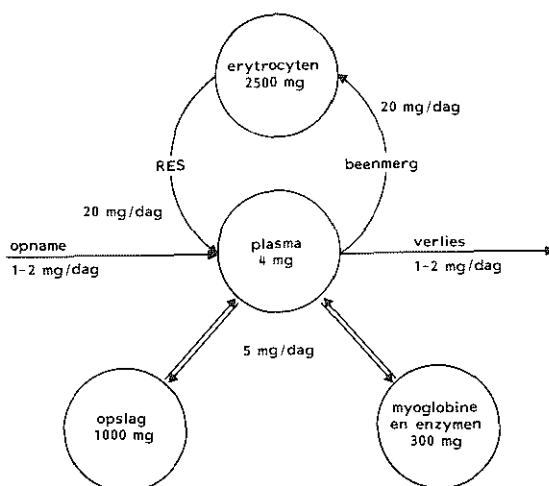


Fig. 1. De verdeling van ijzer in het lichaam over een aantal compartimenten en de onderlinge uitwisseling tussen deze compartimenten.

catalyserende enzymen zijn. In een aantal enzymen zoals aconitase, ribonucleotide-reductase en β -glycerofosfaat-dehydrogenase functioneert ijzer als cofactor.

De ijzerconcentratie in het plasma bedraagt ongeveer $20 \mu\text{mol/l}$ Fe(III) . Het oplosbaarheidsprodukt van Fe(OH)_3 onder fysiologische omstandigheden is $4 \cdot 10^{-38}$ wat betekent dat 10^{-17} mol/l vrije Fe(III) ionen in het plasma kunnen voorkomen. De noodzaak van een transporteiwit zal daarmee duidelijk zijn, gezien het feit dat 30 mg ($5 \cdot 10^{-4} \text{ mol}$) Fe per dag uitgewisseld wordt tussen de diverse in figuur 1 afgebeelde compartimenten. Deze transportfunctie wordt in het plasma vervuld door het β -globuline molecuul, transferrine. Het eiwit bestaat uit één enkele polypeptide keten met 678 aminozuur residuen en molecuulmassa 79.550 (1). Het molecuul is opgevouwen in twee bolvormige substructuren of domains die ieder 1 ijzeratoom kunnen bevatten en de N-terminale (N_t), resp. C-terminale (C_t)

delen worden genoemd. De ijzerbindingsplaatsen voor Fe(III), de zogenaamde A- en B-bindingsplaatsen, liggen respectievelijk in het C_t- en N_t-domain.

De ijzerbindingsliganden zijn waarschijnlijk dezelfde in ieder domain. Deze bestaan uit de zijketens van 3 tyrosine residuen en twee histidine residuen en een bicarbonaat ion wat elektrostatisch gebonden is aan een arginine zijketen (2). De sterke binding van ijzer aan transferrine met een associatieconstante van 10^{23} is onmogelijk zonder de aanwezigheid van een geschikt anion.

Tussen het C- en N-terminale domain van transferrine bestaan fysisch-chemische verschillen die zich o.a. uiten in een preferentiële binding van ijzer binnen één van de domains onder wisselende omstandigheden.

Transferrine kan in 4 vormen voorkomen, n.l. apotransferrine (geen ijzeratoom gebonden), monoferri transferrine (één ijzeratoom gebonden op de A- of B-plaats) en differri transferrine (twee ijzeratomen gebonden). Transferrine in serum is voor ongeveer 30% verzadigd met ijzer.

Transferrine is niet alleen een transporteiwit, het vervult daarnaast een essentiële rol in de ijzeropname door erytroïde cellen. Erytroïde cellen kunnen nagenoeg geen ijzer opnemen indien dit ijzer anders dan aan transferrine gebonden, wordt aangeboden. Erytroïde voorlopercellen nemen, vanaf het proerytroblastenstadium tot en met het reticulocytenstadium, ijzer op; de ijzeropname per cel is het grootst in de proerytroblast en neemt af naarmate de cel verder uitrijpt. De erytrocyt is niet meer in staat om Tf te binden en ijzer op te nemen, maar de voorloper ervan, de reticulocyt, kan nog altijd 10^6 ijzeratomen per minuut opnemen. De ijzeropname door erytroïde cellen is van vele factoren afhankelijk, waaronder de incubatietijd, de incubatietemperatuur, de pH van het incubatiemedium, van aërobe en anaërobe incubatiemilieus en van remmers van het intracellulaire metabolisme. De rol van de ijzerverzadigingsgraad van het transferrinemolecuul bij de ijzeropname is onduidelijk. Er bestaat echter geen verschil in

ijzeropname tussen monoferrri Tf(A) en monoferrri Tf(B) door erytroïde cellen in vivo en in vitro (3), zoals in het verleden door Fletcher en Huehns (4) is gepostuleerd.

Voor de ijzeropname door de erytroïde cellen treedt er een specifieke reactie op van transferrine met de cel, waardoor de cel in staat is ijzer van transferrine te verwijderen en op te nemen ten behoeve van de hemoglobinesynthese.

Er zijn volgens de huidige inzichten 4 tot 5 hoofdstappen in dit proces te onderscheiden. De transferrine interactie met de cel begint met de binding van transferrine aan specifieke membraanreceptoren. Drie fasen kunnen in dit proces onderscheiden worden: een snelle temperatuur en energie-onafhankelijke adsorptiefase met daaropvolgend een tijds-, temperatuur- en energie-afhankelijke bindingsfase van transferrine (5), waarbij de transferrinemoleculen onbereikbaar worden voor proteolytische enzymen en enzym-gekatalyzeerde jodering (6, 7, 8). Tenslotte treedt er een evenwichtsfase op, waarbij evenveel transferrine de cel verlaat als er opnieuw gebonden wordt en de transferrineconcentratie van de cel dus constant blijft.

De transferrinereceptor bestaat uit een homoloog disulfide gebonden transmembraan dimeer met een molecuulmassa van 180.000 Dalton (9). Elk monomeer bindt onafhankelijk van de ander een transferrinemolecuul en bevat daarnaast twee N-asparagine gekoppelde mannose-rijke koolhydraatketens en een complexe keten terwijl antigene determinanten voorkomen op de polypeptide keten. Elk monomeer doorsteekt de celmembraan wat onder meer is aangetoond met proteolytische enzymen. Het in de cel gelegen gedeelte is meer lipofiel van aard en bevat covalent gebonden vetzuurketens en fosforyl-serine residuen. De associatieconstante van transferrinen voor 30% met Fe verzadigd met de receptor bedraagt voor rattenreticulocyten en beenmergcellen ongeveer $0,25 \cdot 10^7$ $\mu\text{l/mol}$.

Transferrine van een bepaalde diersoort heeft een lagere affiniteit voor de reticulocyten van een heterologe diersoort in vergelijking met de affiniteit voor homologe cellen. De associatieconstante van transferrine met de receptor is voorts

afhankelijk van de pH en de ijzerverzadigingsgraad van transferrine. De binding van apotransferrine aan receptoren is hoog bij lage pH waarden, pH 6,5, maar neemt snel af bij hogere pH-waarden (10). Diferritransferrine daarentegen bindt beter bij pH-waarden tussen 7 en 8 dan bij pH-waarden lager dan 6,5. Dit zou van betekenis kunnen zijn bij de volgende stap in het ijzeropname-proces, n.l. de plaats waar ijzer van transferrine in de cel wordt afgesplitst. Jandl et al. (11) formuleerden in 1959 een aantal mogelijke mechanismen, waarbij cellen ijzer van transferrine af zouden kunnen splitsen:

1. Reduktie van Fe(III) gebonden aan transferrine tot Fe(II) waarna ijzer-bindende eiwitten het ijzer gemakkelijk van transferrine over kunnen nemen.
2. Enzymatische afsplitsing van het bicarbonaat anion waardoor de FeTf-binding gedestabiliseerd wordt.
3. Vorming van een zure micro-omgeving van Fe-Tf waardoor ijzer van transferrine afsplitst.

In de klassieke hypothese van Jandl en Katz uit 1963 (12) wordt gesteld dat ijzerafplitsing van transferrine plaatsvindt aan de plasmamembraan terwijl het eiwit gebonden blijft aan de membraanreceptor. In het vervolg wordt dit proces aangeduid als mechanisme 1. Meer dan een decenium geleden formuleerden Morgan en Appleton (13) op grond van gegevens uit autoradiografie studies een nieuwe hypothese met als uitgangspunt de endocytose van het ijzertransferrine na binding aan de receptor; in dit proefschrift gedefinieerd als mechanisme 2. De ijzerafplitsing heeft daarna plaats in zure vacuolen of lysosomen. Overtuigende argumenten op basis waarvan één van de beide hypothesen slechts geldig zou zijn voor het ijzermetabolisme zijn nog niet gevonden. De argumenten die beide hypothesen ondersteunen, zullen in het kort beschreven worden.

Aanwijzingen voor ijzerafplitsing aan de celmembraan worden bevestigd door het feit dat de $^{59}\text{Fe}/^{125}\text{I}$ -verhouding in ghost-suspensies verkregen van met $^{59}\text{Fe}/^{125}\text{I}$ transferrine geïncubeerde reticulocyten groter is dan de $^{59}\text{Fe}/^{125}\text{I}$ -verhouding van

de oorspronkelijke transferrine-oplossing (14, 15, 16, 17, 18). Dit kan betekenen dat ijzer in de ghost behalve aan Tf voor een deel aan membraaneiwwitten is gebonden. Speyer & Fielding (1974) (17) en Van der Heul et al. (1980) (19) waren in staat om een membraancomponent te identificeren welke uitsluitend ^{59}Fe bevatte.

Drie onafhankelijk van elkaar verrichte studies komen tot de conclusie dat erythroïde cellen ijzer kunnen opnemen zonder dat transferrine de celmembraan binnendringt (20, 21, 22). In deze experimenten werd FeTf gekoppeld aan sepharose deeltjes welke niet door de cel geëndocyteerd kunnen worden. Aangezien de met FeTf-gekoppelde sepharose deeltjes geïncubeerde erythroïde voorlopercellen in staat bleken ijzer op te nemen, moet Fe-afplitsing van Tf aan de celmembraan hebben plaatsgevonden. Andere experimentele gegevens, n.l. dat reticulocyten cytosol in staat is ijzer uit reticulocytenmembranen te mobiliseren voor de hemoglobinesynthese (23) en dat Fe-afplitsing van transferrine aan de celmembranen kan plaatsvinden na reductie (24), vormen aanwijzingen voor ijzerafgifte aan de celmembraan in situ.

Voor de hypothese van Morgan en Appleton, dat bij de ijzeropname door erythroïde cellen endocytose van FeTf plaatsvindt waarna Fe intracellulair van transferrine wordt afgesplitst, worden de laatste jaren steeds meer argumenten gevonden. De endocytose van transferrine wordt ondersteund door vier elektronen-microscopische studies, waarbij gebruik wordt gemaakt van met Tf-gelabelde colloïdale gouddeeltjes (25, 26), ferritine geconjugeerd aan transferrine (27) of transferrine gekoppeld aan latex minibeads (28).

Fluorescentie-microscopisch onderzoek van met rhodamine B of fluoresceïne isothiocyanaat gekoppeld Tf leverde in een aantal studies eveneens het bewijs dat Tf intracellulair opgenomen wordt en wel in zure vacuolen of lysosomen (29, 30, 31, 32). Het feit dat lysosomotrofe agentia de ijzeropname remmen en niet de transferrine-opname is een aanwijzing dat zure

vesicles of lysosomen een rol vervullen bij de ijzerafsplitsing van transferrine (8, 33, 34, 35, 36).

Naast al deze morfologische studies zijn er op biochemische gronden aanwijzingen dat FeTf geëndocyteerd wordt tijdens de Fe-opname. Door middel van behandeling van cellen met proteolytische enzymen is het mogelijk onderscheid te maken tussen intracellulair Tf en celmembraan-gebonden Tf (37). De percentages geëndocyteerd Tf, welke met deze methode gevonden worden, zijn overigens sterk variërend.

Kinetiek studies van transferrine endocytose en ijzeropname met proteolytische enzymen leiden tot de conclusie dat ijzer de cel binnenkomt, terwijl het nog gebonden is aan transferrine (38). In verschillende studies wordt in de cytosol van met ^{59}Fe , ^{125}I -Tf geïncubeerde reticulocyten sterk wisselende hoeveelheden transferrine aangetroffen waarbij in een enkel geval aangetoond is dat dit Tf niet een contaminatie is welke tijdens de bereiding van ghost en cytosol van de ghost afsplitst (21).

Met kwantitatieve elektronen-microscopische autoradiografie werd een nadere verdeling van ^{125}I -Tf in de reticulocyt vastgesteld, n.l. 12% in de cytosol, 61% in vesicles en 25% aan de celmembraan na incubatie met ^{125}I -Tf bij 37°C (39). Het endocytoseproces van transferrine vertoont mogelijk een aantal afwijkingen van de algemeen aanvaarde wijze waarop receptor mediated endocytose plaatsvindt, waarbij het gehele ligand-receptorcomplex wordt geëndocyteerd, waarna dit complex zijn eindbestemming vindt in lysosomen.

Zo bestaat er onduidelijkheid over de vraag of tijdens de endocytose van transferrine eveneens de receptor geëndocyteerd wordt. In gelfiltratie-experimenten met reticulocyten cytosol kan n.l. alleen transferrine aangetoond worden en geen receptor-gebonden Tf (40). In biochemische en morfologische studies vindt men echter aanwijzingen dat de Tf-receptor wel intracellulair wordt opgenomen tijdens het ijzeropnameproces (26, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 55).

De intracellulaire route van transferrine is eveneens nog niet

opgehelderd. Zoals reeds werd vermeld, werd op grond van indirecte gegevens verkregen met lysosomotrofe stoffen, geconcludeerd dat de ijzerafsplitsing van transferrine in erytroïde cellen in lysosomen plaatsvindt. Op basis van overeenkomstige gegevens gevonden voor teratocarcinoma cellen kwamen Karin en Mintz (1981) (37) tot dezelfde conclusie. In recente elektronen-microscopische studies met erytroïde cellen afkomstig van foetale rattenlever, lokaliseerden Iacopetta et al. (1983) (29) transferrine-ferritine conjugaten in intracellulaire vesicles en multivesiculaire lichamen die morfologisch als lysosomaal van aard werden omschreven. Verschillende studies hebben echter aangetoond dat na incubatie van diverse celtypen met transferrine intact apotransferrine na enige minuten in het incubatiemedium verschijnt. Deze bevindingen maken het minder waarschijnlijk dat transferrine na endocytose wordt opgenomen in lysosomen, omdat het eiwitgedeelte van transferrine in vitro hydrolyseerbaar is door een lysosomale enzymfractie uit de lever (49).

Bovendien is in recente studies met erytroleukemia cellen transferrine aangetoond in zure vesicles welke geen lysosomen kunnen zijn, omdat lysosomale marker enzymen ontbreken (30). Soortgelijke bevindingen zijn gepubliceerd voor HeLa cellen (44) en humane KB-cellen (50). Na incubatie van ratten reticulocyten met colloïdaal goud gelabeld Tf werd daarnaast elektronen-microscopisch AuTf aangetoond in zure fosfatase negatieve ruimten (26). Aanwijzingen dat de intracellulaire route van Tf zich gaat onderscheiden van die van andere via receptor mediated endocytosis opgenomen liganden zijn gevonden door Dickson et al. (1983) (32). Het lot van transferrine en de transferrine receptor na de endocytose is dan ook vooralsnog onduidelijk.

De derde belangrijke stap in het ijzeropname proces is het transport van ijzer naar de mitochondriën nadat het ijzer van transferrine is afgesplitst. Dit transport moet plaatsvinden met behulp van een carrier, omdat het voorkomen van ongebonden Fe(III) in de cel fysisch chemisch hoogst onwaarschijnlijk is.

De eenvoudigste oplossing zou zijn dat Tf ijzer rechtstreeks naar de mitochondriën transporteert zoals gesuggereerd door Morgan (1969) (51) en Ponka et al. (1977) (52). In slechts één cytochemische studie wordt transferrine gelocaliseerd in mitochondria van humane erythroïde cellen (53). De aard van de ijzer carrier X is nog niet opgehelderd. Verschillende ijzerhoudende componenten zijn uit reticulocyten cytosol geïsoleerd, waarbij hun rol in het intracellulaire ijzermetabolisme is nagegaan. Een samenvatting hiervan wordt door Van der Heul in zijn dissertatie gegeven (54).

Er kan gesteld worden dat bij het intracellulair ijzermetabolisme van erythroïde cellen minstens 4 componenten betrokken zijn, n.l. ferritine, hemoglobine, een eiwit met een relatieve molecuulmassa van ca. 60.000 en een laagmoleculaire fractie die onder meer uit eiwit bestaat. Of één van deze componenten in de erythroïde voorlopercel als ijzertransportcomponent fungeert, is vooralsnog onduidelijk. In erythroïde cellen wordt het grootste gedeelte van het opgenomen ijzer gebruikt voor de heemsynthese. Deze synthese vindt plaats in mitochondriën waar na ijzeropname onder invloed van het enzym ferrochelatase inbouw in protoporfyrine plaats heeft. Hemoglobine ontstaat tenslotte als hoofdprodukt doordat op de polyribosomen geproduceerd globine in het cytoplasma reageert met uit mitochondriën afkomstig heem.

Het mechanisme waarmee mitochondriën ijzer opnemen is direct gerelateerd aan de aard van de ijzer carrier X. Dit proces vormt echter nog een van de vele onduidelijkheden rondom het ijzermetabolisme van erythroïde cellen welke een uitdaging kunnen betekenen voor onderzoekers.

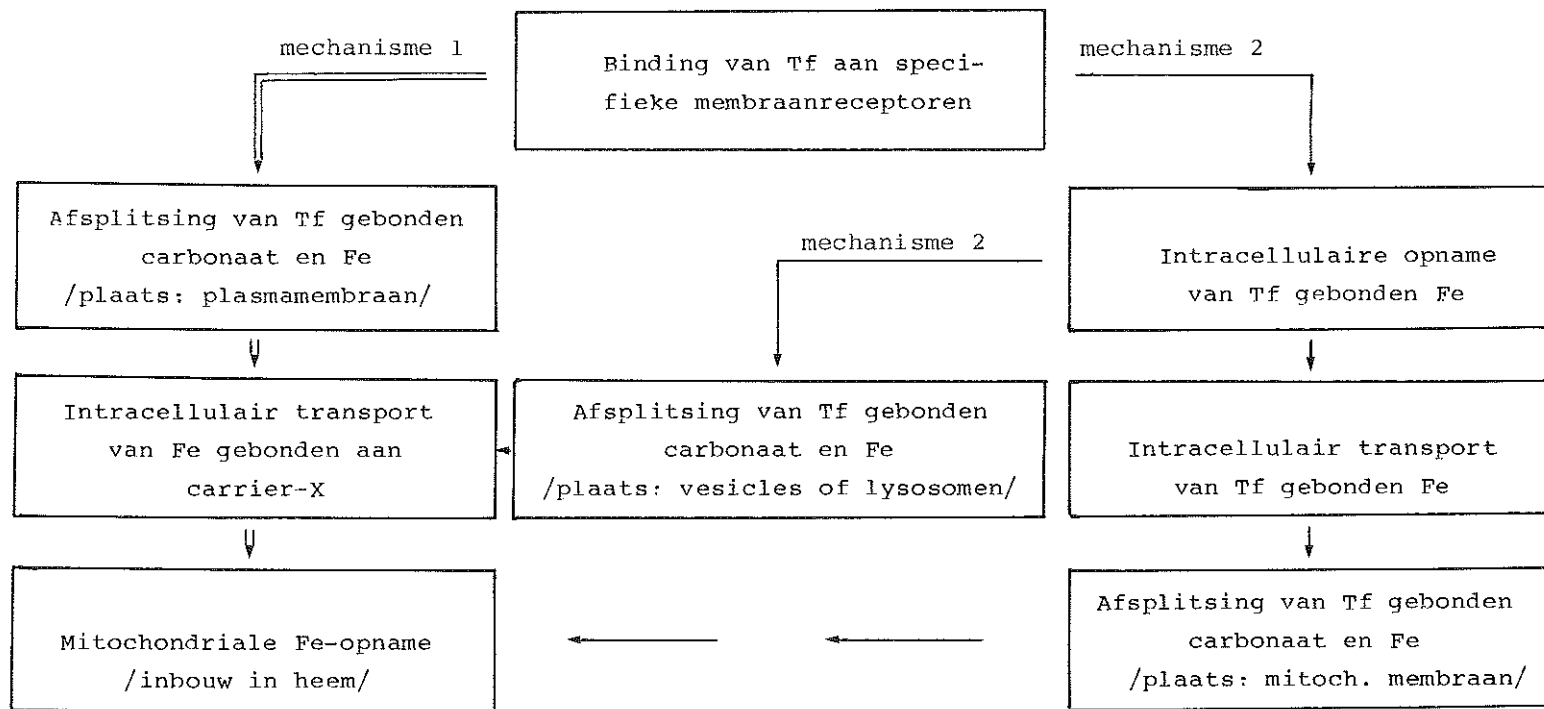
SAMENVATTING EN PROBLEEMSTELLING

De belangrijke stappen in het ijzeropnameproces door erythroïde cellen zijn samengevat in navolgend schema. (Figuur 2.).

Het in dit proefschrift beschreven onderzoek dient een inzicht te verschaffen in de processen die een rol spelen bij de ijzeropname door erythroïde voorlopercellen na de aanvankelijke binding van transferrine aan de receptor. Konkreet betekent dit dat de rol van lysosomen bij het ijzeropname proces in hoofdstuk 3 aan de orde komt. In hoofdstuk 4 wordt de ijzeropname in aanwezigheid van monensine, een proton ionofoor wat in staat is pH-gradiënten op te heffen, bestudeerd met als opzet de plaats te achterhalen waar ijzer van transferrine afsplitst. Een bevestiging van de mogelijke rol van de pH in het ijzerafsplitsingsproces van transferrine is getracht te verkrijgen met het experimentele onderzoek wat in hoofdstuk 5 wordt beschreven.

FIGUUR 2: MOGELIJKE ROUTES VAN IJZER VAN TRANSFERRINE NAAR HEEM

 : Route zonder endocytose, mechanisme 1
 : Route waarbij endocytose betrokken is, mechanisme 2



LITERATUUR

1. WILLIAMS, J. (1982). The evolution of transferrin. *Trends Biochem. Sci.* 7, 394-397.
2. AISEN, Ph., LISTOWSKY, I. (1980). Iron transport and storage proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 49, 357-393.
3. VAN DER HEUL, C., KROOS, M.J., VAN NOORT, W.L. and VAN EIJK, H.G. (1984). In vitro and in vivo studies of iron delivery by human monoferric transferrins. *Brit. J. Haemat.* 56, 571-580.
4. FLETCHER, J. and HUEHNS, E.R. (1968). Function of transferrin. *Nature (London)* 218, 1211-1214.
5. AISEN, Ph. and BROWN, E.B. (1979). The iron binding function of transferrin in iron metabolism. *Semin. Hematol.* 14, 31-53.
6. MARTINEZ-MEDELIN, J., SCHULMAN, H.M., DE MIGUEL, E. and BENAVIDES, L. (1977). New evidence for the internalization of functional transferrin in rabbit reticulocytes. In: *Proteins of Iron Metabolism*, pg. 305-310, (Eds.: BROWN, E.B., AISEN, Ph., FIELDING, J. and CRICHTON, R.R.) New York, Grune and Stratton.
7. PONKA, P., BOROVA, J. and NEUWIRT, J. (1980). Iron transferrin distribution in reticulocytes incubated with heme synthesis inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta* 639, 527-535.
8. MORGAN, E.H. (1981). Inhibition of reticulocyte iron uptake by NH_4Cl and CH_3NH_2 . *Biochim. Biophys. Acta* 642, 119-134.
9. NEWMAN, R., SCHNEIDER, C., SUTTERLAND R., VODINELICH, L. and GREAVES, M. (1982). The transferrin receptor. *Trends Biochem. Sci.* 7, 397-400.
10. MORGAN, E.H. (1983). Effect of pH and iron content of transferrin on its binding to reticulocyte receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 762, 498-502.
11. JANDL, J.H., INMAN, J.K., SIMMONS, R.L. and ALLEN, D.W. (1959). Transfer of iron from serum iron binding protein to human reticulocytes. *J. Clin. Invest.* 38, 161-185.
12. JANDL, J.H. and KATZ, J.H. (1963). The plasma-to-cell cycle of transferrin. *J. Clin. Invest.* 42, 314-326.
13. MORGAN, E.H. and APPLETON, I.C. (1969). Autoradiographic localization of ^{125}I -labelled transferrin in rabbit reticulocytes. *Nature* 223, 1371-1372.
14. VERHOEF, N.J. and NOORDELOOS, P.J. (1977). Binding of transferrin and uptake to iron by rat erythroid cells in vitro. *Clin. Sci. Mol. Med.* 52, 87-96.
15. GARRET, N.E., BURRIS GARRET, G.J. and ARCHEACON, J.W. (1973). Solubilization and chromatography of iron-binding compounds from reticulocyte stroma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 52, 466-474.
16. SPEYER, B.E. and FIELDING, J. (1974). Chromatographic fractionation of human reticulocytes after uptake of doubly labelled $^{59}\text{Fe}^{125}\text{I}$ -transferrin. *Biochim. Biophys. Acta.* 332, 192-200.

17. FIELDING, J. and SPEYER, B.E. (1974). Iron transport intermediates in human reticulocytes and the membrane binding site of iron transferrin. *Biochim. Biophys. Acta* 336, 387-396.
18. GLASS, J., NUNEZ, M.T. and ROBINSON, S.H. (1980). Transferrin binding and iron binding proteins of rabbit reticulocyte plasma membranes. Three distinct moieties. *Biochim. Biophys. Acta* 598, 293-304.
19. VAN DER HEUL, C., KROOS, M.J., DE JEU-JASPARS, C.M.H. and VAN EIJK, H.G. (1980). The uptake of iron by rat reticulocytes. The influence of purification of the ghosts on iron-containing components in the ghost suspension. *Biochim. Biophys. Acta* 601, 572-583.
20. GLASS, J., NUNEZ, M.T. and ROBINSON, S.H. (1977). Iron transport from sepharose bound transferrin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 75, 226-232.
21. ZAMAN, Z., HEIJNEN, N.-J. and VERWILGHEN, R.L. (1980). Studies on the mechanism of transferrin iron uptake by rat reticulocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 632, 553-561.
22. LOH, T.T., YOUNG, Y.G. and YOUNG, D. (1977). Transferrin and iron uptake by rabbit reticulocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 471, 118-124.
23. WORKMAN, E.F. and BATES, G.W. (1974). Mobilization of iron from reticulocyte ghosts by cytoplasmic agents. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 58, 787-794.
24. NUNEZ, M.T., COLE, E.S. and GLASS, J. (1983). The reticulocyte plasma membrane pathway of iron uptake as determined by the mechanism of α , α' -dipyridyl inhibition. *J. Biol. Chem.* 258, 1146-1151.
25. LIGHT, A., MORGAN, E.H. (1982). Transferrin endocytosis in reticulocytes: An electron microscope study using colloidal gold. *Scand. J. Haematol.* 28, 205-214.
26. HARDING, C., HAUSER, J. and STAHL, P. (1983). Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in reticulocytes. *J. Cell Biol.* 97, 329-339.
27. SULLIVAN, A.L., GRASSO, J.A. and WEINTRAUB, L.R. (1976). Micropinocytosis of transferrin by developing red cells: an electron-microscopic study utilizing ferritin-conjugated transferrin and ferritin-conjugated antibodies to transferrin. *Blood* 47, 133-143.
28. TAKAHASHI, K. and TAVASSOLI, M. (1983). Internalization of iron-transferrin complex by murine L1210 leukemia cells and rat reticulocytes demonstrated by a minibead probe. *J. Ultrastruct. Res.* 82, 314-321.
29. IACOPETTA, B.J., MORGAN, E.H., YEOH, G.C.T. (1983). Receptor-mediated endocytosis of transferrin by developing erythroid cells from the foetal rat liver. *J. Histochem. Cytochem.* 31, 336-344.
30. VAN RENSWOUDE, J., BRIDGES, K.R., HARFORD, J.B. and KLAUSNER, R.D. (1982). Receptor-mediated endocytosis of transferrin and the uptake of Fe in K562 cells: Identification of a non-lysosomal acidic compartment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 6186-6190.

31. MAXFIELD, F.R., FLUSS, S.R., TYCKO, B. and YAMASHIRO, D. (1983). Transferrin passes through a mildly acidic part of the golgi complex in CHO cells. *J. Cell Biol.* 97, 958.
32. DICKSON, R.B., HANOVER, J.A., WILLINGHAM, M.C. and PASTAN, I. (1983). Prelysosomal divergence of transferrin and epidermal growth factor during receptor-mediated endocytosis. *Biochem.* 22, 5667-5674.
33. ARMSTRONG, N.J., MORGAN, E.H. (1983). The effect of lysosomotropic bases and inhibitors of transglutaminase on iron uptake by immature erythroid cells. *Biochim. Biophys. Acta* 762, 175-186.
34. HARDING, C. and STAHL, P. (1983). Transferrin recycling in reticulocytes: pH and iron are important determinants of ligand binding and processing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 113, 650-658.
35. RAO, K., VAN RENSWOUDE, J., KEMPF, C. and KLAUSNER, R.D. (1983). Separation of Fe^{3+} from transferrin in endocytosis. *FEBS Letters* 160, 213-216.
36. LOH, T.T. (1983). Studies on the iron release from transferrin: effects of elevated intralysosomal pH by spermidine and spermine. In: *Structure and Function of Iron Storage and Transport Proteins*. (Eds.: URUSHIZAKI, I., AISEN, Ph., LISTOWSKY, I. and DRYSDALE, J.W.) pp. 327-330, Elsevier, North-Holland Inc.
37. KARIN, M. and MINTZ, B. (1981). Receptor-mediated endocytosis of transferrin in developmentally totipotent mouse teratocarcinoma stem cells. *J. Biol. Chem.* 256, 3245-3252.
38. IACOPETTA, B.J. and MORGAN, E.H. (1983). The kinetics of transferrin endocytosis and iron uptake from transferrin in rabbit reticulocytes. *J. Biol. Chem.* 258, 9108-9115.
39. IACOPETTA, B.J. and MORGAN, E.H. (1983). An electron-microscope autoradiographic study of transferrin endocytosis by immature erythroid cells. *Eur. J. Cell Biol.* 32, 17-23.
40. VAN DER HEUL, C., DE JEU-JASPARS, C.M.H., KROOS, M.J. and VAN EIJK, H.G. (1982). Intracellular iron transport in rat reticulocytes. In: *The Biochemistry and Physiology of Iron*. (Eds.: SALTMAN, P. and HEGENAUER, J.). Elsevier, North-Holland Inc., pp. 189-191.
41. PEARSE, B.F.M. (1981). Coated vesicles from human placenta carry ferritin, transferrin and immunoglobulin G. *Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash.)* 79, 451-455.
42. BLEIL, J.D. and BRETCHER, M.S. (1982). Transferrin receptors and its recycling in the HeLa cells. *EMBO J.* 1, 351-355.
43. EKBLOM, P., THESLEFF, I., LEKTO, V.P. and VIRLANEN, I. (1983). Distribution of the transferrin receptor in normal human fibroblasts and fibrosarcoma cells. *Int. J. Cancer* 31, 111-117.

44. LAMB, J.E., RAY, F., WARD, J.H., KUSHNER, J.P. and KAPLAN, J. (1983). Internalization and subcellular localization of transferrin and transferrin receptors in HeLa cells. *J. Biol. Chem* 258, 8751-8758.
45. LEVINE, J.S., MAGREE, L., CHITAMBER, C. and SELIGMAN, P. (1983). The ultrastructural immunocytochemical localization of transferrin receptor in human erythroleukemia cells. *Clin. Res.* 31, 317A.
46. PAN, B.T. and JOHNSTONE, R.M. (1983). Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: Selective externalization of the receptor. *Cell* 33, 967-977.
47. HOPKINS, C.R. and TROWBRIDGE, I.S. (1983). Internalization and processing of transferrin and the transferrin receptor in human carcinoma A431 cells. *J. Cell Biol.* 97, 508-521.
48. HOPKINS, C.R. (1983). Intracellular routing of transferrin and transferrin receptors in epidermoid carcinoma A431 cells. *Cell* 35, 321-330.
49. CHARLWOOD, P.A., REGOECZI, E. and HATTON, W.C. (1979). Hepatic uptake and degradation of trace doses of asialo fetuin and asialo oroscomucoid in the intact rat. *Biochim. Biophys. Acta* 585, 61-70.
50. WILLINGHAM, M.C., HANOVER, J.A. DICKSON, R.B. and PASTAN, I. (1984). Morphologic characterization of the pathway of transferrin endocytosis and recycling in human K.B.-cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 175-179.
51. MORGAN, E.H. and BAKER, E. (1969). The effect of metabolic inhibitors on transferrin and iron uptake and transferrin release from reticulocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 184, 422-454.
52. PONKA, P., NEUWIRT, J. BOROVA, J. and FUCHS, O. (1977). Control of iron delivery to hemoglobin in erythroid cells. In: *Iron Metabolism. Ciba Foundation Symposium No. 51*, (Eds.: POSTER, P. and FITZSIMONS, D.W.). Amsterdam: Elsevier, North-Holland Inc., pp. 167-200.
53. ISOBE, K., ISOBE, Y. and SAKURAMI, T. (1981). Cytochemical demonstration of transferrin in the mitochondria of immature human erythroid cells. *Acta Haemat.* 65, 2-9.
54. VAN DER HEUL, C. (1981). Enkele aspecten van de ijzeropname door erythroïde cellen. *Dissertatie Erasmus Universiteit Rotterdam*.
55. SCHULMAN, H.M., WILCRYNKA, A. and PONKA, P. (1983). In: *Structure and Function of Iron Storage and Transport Proteins* (Eds.: URUSHIZAKI, I, AISEN, Ph., LISTOWSKI, I and DRYSDALE, J.W.). Elsevier, North-Holland, Inc., pp. 305-310.

HOOFDSTUK 2

MATERIALEN EN METHODEN

In dit hoofdstuk worden de methoden beschreven welke regelmatig gebruikt zijn voor de in dit proefschrift beschreven experimenten. De meer specifieke methoden worden in de desbetreffende hoofdstukken vermeld.

1. CHEMICALIEN

De gebruikte chemicaliën waren in alle gevallen van pro-analyse kwaliteit.

2. MEDIA

"Phosphate-buffered saline" volgens Dulbecco (1) afgekort PBS (Oxford Lt., United Kingdom) werd gebruikt als medium om cellen te wassen.

Hanks' balanced salt solution (2) en Minimal Essential Medium (MEM) (Flow Laboratories, Irvine, Scotland, U.K.) werden gebruikt als incubatiemedium voor resp. beenmergcellen en reticulocyten.

3. ISOTOPEN

^{59}Fe werd verkregen als Fe(III) citraat met een specifieke activiteit van 5-20 Ci/g ijzer. ^{125}I verkregen in de chemische vorm als natrium-jodide, dragervrij en vrij van reducerende stoffen (IMS 30) en in de chemische vorm als Bolton en Hunter reagens (N-succinimidyl 3-(4 hydroxy 5(^{125}I) iodofenylpropionaat), specifieke activiteit 2000 Ci/mmol.

$7\text{-}^{14}\text{C}$ Tyramine hydrochloride, specifieke activiteit 56 mCi/mmol. Alle isotopen zijn afkomstig van Radiochemical Centre, Amersham, Bucks, United Kingdom.

4. TRANSFERRINE, ISOLATIE EN RADIOAKTIEF GEMERKT MET ^{125}I EN ^{59}Fe

Humaan transferrine werd verkregen van Kabi, Zweden.

Rattentransferrine werd uit serum geïsoleerd met CNBr-Sepharose-4B antitransferrine-affiniteitschromatografie (3).

Elutiebuffers voor de Sepharose kolom:

startbuffer: 0,1 M fosfaat-citraat, pH 7,2 met 0,25 mol NaCl/liter; elutiebuffers: 0,1 M fosfaat-citraat, pH 2,8 met 0,25 mol NaCl/liter. Rattensera werd 1:1 verdund met 0,2 M fosfaat-citraat, pH 7, bevattende 0,5 mol NaCl per liter.

Na elutie werd de pH van de oplossing welke transferrine bevat op pH 7,8 gebracht en een overmaat ijzercitraat in 0,02 mol $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ per liter toegevoegd om het transferrine in de oplossing te stabiliseren. Diferri transferrine is stabiel dan elke andere vorm van transferrine. De verkregen transferrine-oplossing werd geconcentreerd en vervolgens tweemaal gedialyseerd tegen gedestilleerd water, waarna dialyse tegen 0,05 molair NaCl volgde. De eiwitoplossingen werden hierna lyophil gedroogd en opgeslagen bij -20°C .

IJzervrije transferrine-oplossingen werden bereid door een transferrine-oplossing tweemaal te dialyseren tegen 0,02 M dinatrium EDTA in een 0,05 molair azijnzuur-natriumacetaatbuffer pH 5,0. De EDTA werd door dialyse tegen aqua bidest verwijderd. Daarna werd de transferrine-oplossing tweemaal tegen een 0,1 molaire fosfaatbuffer pH 7,4 gedialyseerd.

Voor het merken van transferrine met ^{125}I werd gebruik gemaakt van de methode van Katz (4) en de methode van Bolton en Hunter (5). De joderingsoplossing volgens de methode van Katz bevatte I_2 en NaI in een molaire verhouding van 1:2 of een verhouding van 1:4 waaraan Na^{125}I was toegevoegd.

Een 10%-ige transferrine-oplossing werd gedialyseerd tegen een 0,1 M Tris-HCl buffer pH 8,5. De joderingsoplossing werd druppelsgewijs bij de op 0°C gekoelde transferrine-oplossing gevoegd tot een molaire verhouding eiwit/ ^{125}I van 1

op 1 bereikt was. Het verkregen mengsel werd gedurende 5 uur onder voortdurend roeren bij 4°C bewaard waarna de overmaat ^{125}I werd verwijderd door de oplossing over een anionenwisselaar (Amberlite IR Cl^-) te scheiden. De eiwitfracties met de hoogste ^{125}I -activiteit werden samengevoegd en gedialyseerd tegen een 0,1 M fosfaatbuffer pH 7,4.

Voor de jodering van transferrine volgens Bolton en Hunter werd 500 μl transferrine (conc. 100 mg/ml) in 0,1 M boraatbuffer, pH 8,5, toegevoegd aan 0,5 mCi door N_2 drooggeblazen reagens. Het reactiemengsel werd daarna 30 min bij 4°C geroerd. Het aldus gemerkte transferrine werd gescheiden van andere gemerkte producten van de conjugatiereactie, glycine conjugaat en 3(4-hydroxyfenyl)propionzuur, door gelfiltratie over een G25 kolom. De eiwitfracties met de hoogste ^{125}I -activiteit werden samengevoegd en gedialyseerd tegen een 0,1 molaire fosfaat-buffer, pH 7,4.

Het merken van ^{125}I -transferrine met ^{59}Fe gebeurde door aan 1 ml van een gezuiverde ijzervrije transferrine-oplossing (40 nmol/ml PBS) $^{59}\text{Fe(III)}$ citraat toe te voegen tot een verzadigingspercentage was bereikt van ongeveer 30%. Hogere verzadigingspercentages, indien vermeld, worden bereikt door meer ijzer(III)citraat toe te voegen. De $^{59}\text{Fe(III)}$ -citraatoplossing bevatte 0,5-0,9 μg ijzer met een specifieke activiteit van circa 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ ijzer. Een 5%-ige natrium-bicarbonaatoplossing werd als donor voor het anion HCO_3^- toegevoegd, omdat dit anion bij de binding van Fe(III) aan transferrine een belangrijke rol speelt.

De verhouding $\text{Fe}:\text{NaHCO}_3$ bedroeg 1:20, de oplossing werd vóór gebruik één nacht bij 4°C bewaard.

5. CELLEN

5.1. Reticulocyten van de rat

Een reticulocytose in normale mannelijke Wistar ratten (300 g) werd opgewekt door gedurende iedere dag 5-7 ml

bloed af te nemen door middel van orbitapuncties. Tussen de derde en vierde orbitapunctie lag een interval van twee dagen. Het op deze wijze bereikte reticulocytenpercentage varieerde tussen de 25-40%. Het bloed van de verbloede ratten werd opgevangen in 40 ml buizen met 500 E heparine als antistollingsmiddel. Het reticulocytenpercentage in het bloed werd vastgesteld door kleuring met een Brilliant Cresyl Blue oplossing gedurende 20 minuten bij 37°C (verhouding bloed : kleuroplossing bedraagt 1:1).

De cellen worden na verwijdering van het plasma drie keer gewassen met ijskoude 300 milliosmolaire PBS, pH 7,4, waarbij tevens de "buffy coat" werd verwijderd.

Voor sommige experimenten was een hoger reticulocytenpercentage vereist. Een percentage van 80-90% reticulocyten kon worden bereikt door mannelijke Wistar ratten subcutaan in te spuiten met 0,5 ml 1,5% w/v geneutraliseerde fenyldiazine (Merck-Schuchardt)oplossing in PBS gedurende drie dagen. Eén tot twee dagen na de laatste injectie werden de ratten verbloed.

5.2. Rattenbeenmergcellen

De beenmergcellen werden verkregen uit femora en tibiae van de ratten (6). Deze botten werden doorspoeld met een koude Hanks' balanced salt solution waaraan new-born calfserum (Flow Laboratories) was toegevoegd (5% v/v).

Celaggregaten werden uit de celsuspensie verwijderd door filtratie over nylongaas. De cellen werden éénmaal gewassen en gecentrifugeerd bij 200 g gedurende 7 minuten bij 4°C. Het aantal kernhoudende cellen in de suspensie werd bepaald door middel van een Toa microcell counter. De celsuspensie werd na een May-Grunwald Giemsa kleuring beoordeeld en bevatte 36% kernhoudende erythroïde cellen en minder dan 5% macrofagen.

6. ALGEMENE INCUBATIEPROCEDURES VAN ERYTROIDE CELLEN MET TRANSFERRINE

6.1. De ijzeropname en transferrinebinding door reticulocyten werd bepaald door $0,5-1 \cdot 10^8$ reticulocyten per ml in MEM bij 37°C te incuberen met $1 \text{ nmol } ^{59}\text{Fe } ^{125}\text{I}$ gemerkt transferrine per ml. De ijzeropname en transferrinebinding door rattenbeenmergcellen werd bepaald door $1-2 \cdot 10^7$ kernhoudende beenmergcellen gesuspenderd in Hanks' pH 7,4 met 5% v/v new-born calfserum bij 37°C te incuberen met $1 \text{ nmol } ^{59}\text{Fe } ^{125}\text{I}$ gemerkt transferrine per ml.

De ijzeropname en transferrinebinding werd op verschillende tijdstippen gestopt door 1 ml celsuspensie in 4 ml ijskoude 300 milliosmolaire PBS te pipetteren waarna deze suspensie direct gecentrifugeerd werd. De cellen werden daarna driemaal nagewassen.

6.2. Ter verkrijging van gelabelde subcellulaire reticulocyten fracties werden $5 \cdot 10^8$ reticulocyten per ml in MEM bij 37°C gedurende 10 minuten geïncubeerd. De concentratie rattentransferrine bedroeg $1 \text{ nmol } ^{59}\text{Fe}-^{125}\text{I}$ gemerkt transferrine per 10^6 cellen. De incubatie werd beëindigd door twee volumedelen ijskoude 300 milliosmolaire PBS aan de celsuspensie toe te voegen waarna de cellen driemaal nagewassen werden met hetzelfde medium.

7. ISOELECTRISCHE FOCUSSEERINGS

7.1. Bereiding polyacrylamide gel

In grote lijnen werd het voorschrift van LKB, Zweden gevolgd (Application Notes 75 en 306) met onderstaande wijzigingen.

In plaats van acrylamide en bisacrylamide werd Cyanogum-41 (Fischer Sci. Co.) in een concentratie van 60 g/l gebruikt. De gel bevatte daarnaast 120 g sucrose per

liter en 20 g ampholine, pH 5-7 (LKB 1809-121), met de voorgeschreven hoeveelheid riboflavine.

De polymerisatie werd bevorderd door de gel gedurende één nacht op een afstand van 10 cm onder twee TL-buizen, 20 E/50 Luxe (Phillips, Nederland) te plaatsen.

7.2. Focussering

Voorafgaande aan de focussering werd de gel 60-90 minuten geëlektroforeerd. De focussering vond plaats volgens voorschrift van LKB met de Multiphor (LKB 2117, Zweden). Hiertoe werd op 1 cm van de kathode 5 µl monster op de gel gebracht. Het voltage werd ingesteld op een maximum van 1200 V. (DC power supply 2103, LKB). De stroom en het vermogen waren ingesteld op resp. 50 mA en 30 Watt. De optimale tijd voor focussering bedroeg 3 uur.

7.3. Het kleuren van de gel

Na de focussering werd de gel direct gekleurd met een volgens Blakesley (7) bereide Coomassie Brilliant Blue G250 (Serva, Heidelberg, Duitsland).

8. RADIOAKTIVITEITSMETINGEN

^{59}Fe en ^{125}I -aktiviteit werd gemeten in een Packard 5120 autogamma scintillatie spectrometer.

^{14}C aktiviteit werd bepaald in een Seal Isocap 300 vloeibare scintillatie teller.

LITERATUUR

1. DULBECCO, R. and VOGT, M. (1954). Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J. Exp. Med.* 99, 167-182.
2. HANKS, J.H. and WALLARE, R.E. (1949), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 71, 196-200.
3. VAN NOORT, W.L. and VAN EIJK, H.G. (1977). Affiniteitschromatografie met behulp van CNBr-geactiveerde Sepharose. Mogelijkheden en moeilijkheden. *Tijdschrift v. Med. Anal.* 32, 184-196.
4. KATZ, J.H. (1961). Iron and protein kinetics studies by means of doubly labeled human crystallin transferrin. *J. Clin. Invest.* 40, 2143-2152.
5. BOLTON, A.E. and HUNTER, W.M. (1973). The labelling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to a ^{125}I -containing acylating agent. *Biochem. J.* 133, 529-539.
6. VERHOEF, N.J., KREMERS, J.H.W. and LEIJNSE, B. (1973). The effect of heterologous transferrin on the uptake of iron and haem synthesis by bone marrow cells. *Biochim. Biophys. Acta* 304, 114-122.
7. BLAKESLEY, R.W. and BOERI, J.A. (1977). A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using Coomassie Brilliant Blue G250. *Anal. Biochem.* 82, 580-582.

HOOFDSTUK 3

ZIJN LYSOSOMEN DIREKT BETROKKEN BIJ DE IJZEROPNAME DOOR RETICULOCYTEN?

Inleiding

De plaats en het mechanisme van ijzerafgifte door het plasma-eiwit transferrine aan erythroïde cellen voor de biosynthese van heem in mitochondriën is nog niet opgehelderd. Er wordt algemeen geaccepteerd dat ijzertransferrine in eerste instantie aan membraanreceptoren op de celwand gebonden wordt. Het meest voor de hand liggend is daarna dat transferrine ijzer aan de membraan afgeeft en vervolgens naar het externe medium terugkeert (1). Een andere mogelijkheid is dat na binding van ijzertransferrine aan de receptor dit gehele complex geëndocyteerd wordt waarna ijzer intracellulair van transferrine wordt afgesplitst (2). Apotransferrine en receptor zouden daarna naar de celwand kunnen terugkeren waarna apotransferrine door de cel wordt afgegeven. Het verschijnsel van receptorrecycling is bij verschillende studies waargenomen (3). Studies naar het lot van antilichamen gericht tegen de plasmamembraan van gekweekte rattenfibroblasten onthulden dat plasmamembraan-fragmenten na endocytose in lysosomen terecht komen waarna zij naar de celwand terugkeerden (4). Octave et al. (5) suggereren dat dit model eveneens toepasbaar is op het ijzertransferrine-receptorcomplex in rattenfibroblasten. De afsplitsing van ijzer van transferrine zou dan in lysosomen plaatsvinden als gevolg van de geringe affiniteit van ijzer voor transferrine bij de lage pH welke in lysosomen heerst (6).

Lysosomotrofe agentia zoals chloroquine en methylamine welke de intralysosomale pH aanzienlijk kunnen verhogen (7), reduceren de ijzeropname door reticulocyten en fibroblasten aanzienlijk, terwijl de transferrine-opname nagenoeg ongewijzigd blijft (8, 9, 10).

In dit hoofdstuk worden de resultaten beschreven van het onderzoek naar de mogelijke functie van lysosomen in het proces van ijzeropname door reticulocyten.

Materiaal en Methoden

Voor de bereiding van rattenreticulocyten met behulp van fenyldhydrazine, erythrocyten, rattenbeenmergcellen, humaan- en rattentransferrine gemerkt met ^{59}Fe en ^{125}I volgens Katz, alsmede voor de incubatieprocedure tussen reticulocyten en transferrine wordt verwezen naar de in hoofdstuk II beschreven methode.

Isoelektrische focussering van het incubatiemedium

Om na te kunnen gaan of alleen apotransferrine door de reticulocyten wordt afgegeven, werden isoelektrische focusseringsstudies verricht met het incubatiemedium op analytische gels nadat de incubatie was gestopt.

Een incubatiemengsel met humaan diferri transferrine bevatte $3,6 \cdot 10^9$ reticulocyten per ml in een medium wat bestond uit 0,01 M Hepes, 0,13 M NaCl, 5 mM KCl, 0,74 mM MgCl_2 aangevuld met 1,26 mM CaCl_2 , pH 7,4. De incubatiebuffer werd met dithionon ijzervrij gemaakt zoals beschreven is door van Baarle et al. (11) voordat CaCl_2 en MgCl_2 toegevoegd werden. De humane transferrineconcentratie in het incubatiemedium bedroeg 3,5 mmol Tf per 10^9 reticulocyten. Het gebruikte glaswerk werd ijzervrij gemaakt via een wasprocedure met bichromaat-zwavelzuur en aquadest.

Incubaties werden uitgevoerd gedurende twee uur bij 37°C in een schudwaterbad. Elk half uur werden monsters van 200 μl genomen en 10 minuten gecentrifugeerd bij 5400 g, temperatuur 4°C .

De supernatanten werden isoelektrisch gefocusseerd op analytische gels, zoals in hoofdstuk 2 beschreven is.

Subcellulaire fractionering

Ghostsuspensies van reticulocyten werden bereid volgens een voor erythrocyten beschreven methode van Dodge (12). De reticulocyten suspensie werd gesuspendeerd in een PBS-oplossing van pH 7,4 (1:1) waarvan de osmolariteit 300 mosmol bedroeg.

Hemolyse werd bewerkstelligd door 2 ml van een verkregen reticulocyten suspensie te pipetteren in 40 ml polypropyleen centrifugebuizen, die 28 ml 20 milliosmolair PBS, pH 7,4, bevatten, waaraan 2 mM CaCl_2 was toegevoegd om vesicle-vorming te voorkomen (13). Vervolgens werd 40 minuten gecentrifugeerd bij 20.000 g in een Beckman centrifuge. De supernatant werd voorzichtig verwijderd van de pellet (ghostsuspensie), waarna deze nog driemaal werd nagewassen met hemolyse-buffer. De aldus verkregen ghostsuspensie werd gezuiverd met behulp van een door Lodish en Small (14) beschreven sucrosegradiënt centrifugatie. Hiertoe werd een discontinue sucrosegradiënt bereid door 6 ml van een 60%-ige sucrose-oplossing (w/v) te brengen in centrifugeerbuisen behorende bij een Beckman SW 27 rotor. Op de 60%-ige sucrose-oplossing werden achtereenvolgens de volgende sucrose-oplossingen gebracht: 6 ml 50%-ige, 6 ml 45%-ige, 6 ml 40%-ige en 6 ml 30%-ige. Alle oplossingen werden bereid in 5 millimolaire PBS van pH 8,0. Vervolgens werd 0,3-0,4 ml van een geïsoleerde ghostsuspensie toegevoegd aan 7 ml van een 15%-ige sucrose-oplossing en goed gemengd. De verkregen suspensie werd op de vers bereide discontinue gradiënt gebracht. De gradiënten werden vervolgens gedurende 18 uur bij 4°C, 120.000 g gecentrifugeerd in een Beckman SW 27 rotor. De diverse sucroselagen, waarin zich zichtbare banden bevonden, werden geïsoleerd en tienmaal verdund met 5 millimolair PBS, pH 8,0. De aanwezige banden werden geprecipiteerd door de suspensies gedurende 1 uur te centrifugeren in een Beckman rotor 34 bij 100.000 g en werden vervolgens bewaard bij -70°C om geanalyseerd te kunnen worden op de aanwezigheid van marker enzymen. De volgende marker enzymen werden gebruikt: acetylcholinesterase (E.C. 3.1.1.7.) - plasmamembraan-gebonden enzym; succinaat dehydrogenase (E.C. 1.3.9.9.1.) - mitochondriaal

enzym; β -glucosidase (E.C. 3.2.1.2.1.) en hexosaminidase (E.C. 3.2.1.5.2.) - lysosomale enzymen.

Isolatie en zuivering van lysosomen

Drie methoden werden gebruikt om een zuivere lysosomen suspensie te bereiden. In de eerste methode werden reticulocyten gelyseerd met vijf volumedelen ijskoud gedestilleerd water, gebufferd met 1 mM Tris-HCl, pH 7,4 gedurende 1 minuut. Het mengsel werd daarna gehomogeniseerd door drie halen in een elektrisch aangedreven Potter-Elvehjem homogenisator met een teflon pestel. De isotoniciteit van de oplossing werd hersteld door toevoeging van 2,5 M sucrose. De cellysatie werd gecontroleerd met behulp van fasecontrast-microscopie. Celresten en plasmamembranen werden verwijderd door centrifugatie bij 1500 g gedurende 10 minuten. De procedure werd met de verkregen pellet nogmaals herhaald.

Uit het lysaat werd een subcellulaire suspensie verkregen door centrifugatie gedurende 20 minuten bij 20.000 g en resuspensie van de pellet in 0,25 M sucrose. Deze suspensie werd gezuiverd met een discontinue sucrosegradiënt, welke hiervoor is beschreven, en een lineaire sucrosegradiënt. De lineaire sucrosegradiënt bestond uit respectievelijk de volgende sucrose-oplossingen:

1,8 ml 65%-ige, 3,6 ml 60%-ige, 7,2 ml 55%-ige, 1,8 ml 50%-ige, 7,2 ml 45%-ige, 3,6 ml 40%-ige, 1,8 ml 35%-ige en 1,8 ml 30%-ige sucrose-oplossingen. De gradiënt werd na samenvoegen van de verschillende sucrose-oplossingen drie uur bij kamertemperatuur gehouden alvorens de suspensie opgebracht werd.

De tweede procedure behelsde Percoll dichtheidsgradiënt centrifugatie met 30% w/v Percoll in 0,25 M sucrose, 0,1 M Tris-HCl, pH 7,4 gedurende 15 minuten bij 30.000 g. Deze optimale omstandigheden zijn vastgesteld volgens voorschrift van Pharmacia (15). Tenslotte werd een lysosomen-mitochondriën suspensie geïsoleerd uit een met ^{59}Fe ^{125}I transferrine geïncubeerde reticulocyten suspensie volgens een methode beschreven door Ibrahim (16). Hierbij werden de cellen gelyseerd met

twee volumedelen ijskoud gedestilleerd water met 1 mM Tris-HCl, pH 7,4, gedurende 30 seconden. Daarna werd de celsuspensie op de eerder beschreven wijze gepotterd en isotoon gemaakt met 9% w/v NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,4. Deze suspensie werd 5 minuten bij 1000 g gecentrifugeerd. Tien ml van de aldus verkregen supernatant werd op een 10 ml 0,5 M sucrose 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, laag gebracht en 20 minuten bij 27.000 g gecentrifugeerd. De ontstane pellet werd geresuspendeerd in 2 ml 0,25 M sucrose en opnieuw op 10 ml 0,5 M sucrose gebracht en 15 minuten bij 22.000 g gecentrifugeerd. Deze procedure werd nogmaals herhaald om zoveel mogelijk hemoglobine te verwijderen. Tenslotte werd de pellet geresuspendeerd in 0,25 M sucrose, 1 mM Tris-HCl, pH 7,4.

Enzym test

De enzymaktiviteiten werden gemeten volgens bestaande procedures.

Acetylcholinesterase werd bepaald volgens de methode van Ellman et al. (17), succinaat dehydrogenase naar Meyer et al. (18). De lysosomale enzymen β -glucosidase en hexosaminidase werden bepaald met 4-methylumbelliferyl glycoside als substraat, zoals is beschreven door Barret en Heath (19). Monoamino-oxidase (E.C. 1.4.3.4.) werd gemeten volgens Wurtman en Axelrod (20) met de volgende aanwijzingen: (7-¹⁴C) Tyramine-HCl als substraat in een concentratie van 10^{-5} M/l. Incubaties werden uitgevoerd bij 37°C gedurende 45 minuten met ongeveer 1 mg enzym/eiwit suspensie.

Zure fosfatase (E.C. 3.1.3.2.) werd bepaald volgens Walter en Schutt (21). De hoeveelheid eiwit werd bepaald met behulp van een door Markwell et al. (22) gewijzigde procedure van Lowry.

Digitonine incubaties

Incubaties met digitonine (E. Merck, Darmstadt, Germany) werden verricht met de volgens de methode van Ibrahim verkregen mitochondriën-lysosomen suspensie en de geïsoleerde ghosts gedurende 20 minuten bij 0°-4°C. De concentratie digi-

tonine per mg eiwit varieerde van 0,05-0,8 mg in een incubatievolume van 750 l.

Detectie van lysosomen in erythroïde cellen met fluorescentie- en elektronen-microscopie

Vitaal kleuring met acridine orange in vitro en fluorescentie-microscopie vond geheel plaats overeenkomstig de methode van Allison en Young (1969) (23). Voor elektronen-microscopisch onderzoek werden de verschillende celsuspensies gewassen op de reeds aangegeven wijze waarna fixatie plaatsvond in een mengsel van 2% formaldehyde en 2% glutaraaldehyde in 0,1 M cacodylaatbuffer, pH 7,3 gedurende 1 uur bij 4°C. De cellen werden gewassen met resp. 1% tanninezuur, pH 7,0 (5 min, kamertemperatuur) en 0,1 M cacodylaatbuffer, pH 7,3. Na fixatie vond plaats in 1% OsO₄ in 0,1 M cacodylaatbuffer, pH 7,3 (60 minuten, 4°C), waarna dehydratie plaatsvond in oplopende concentraties alcohol (50-100%). Elektronen-microscopisch onderzoek volgde na inbedding in Epon.

Resultaten

De geïsoleerde subcellulaire reticulocyten suspensie (20.000 g fractie) werd gezuiverd op een lineaire en discontinue sucrose gradiënt. Lineaire gradiënt centrifugatie en discontinue gradiënt centrifugatie leverden respectievelijk vijf en drie banden op met een rode bovenlaag veroorzaakt door hemoglobine.

De specifieke activiteiten van de marker enzymen succinaat dehydrogenase en -glucosidase van de verkregen banden van zowel de lineaire als discontinue gradiënt waren identiek. De resultaten van de fractionering van de subcellulaire reticulocyten suspensie met de Percoll gradiënt centrifugatie zijn weergegeven in tabel 1.

Deze resultaten duiden aan dat het niet mogelijk is een zuivere lysosomensuspensie te isoleren uit reticulocyten met een lineaire of discontinue sucrose gradiënt alsmede met een Percoll gradiënt.

TABEL 1. De specifieke activiteit van succinaat dehydrogenase en hexosaminidase in de fracties na 30% w/v Percoll gradiënt centrifugatie. De specifieke activiteit is uitgedrukt in mU/mg eiwit.

Fractie no.	Succinaat dehydrogenase	Hexosaminidase
1	0,48	0,14
2	1.21	0.22
3	1.19	0.23
4	1.25	0.29
5	0.94	0.40
Uitgangsmateriaal	1.23	0.60

Digitonine incubaties

Desintegratie van mitochondriën en lysosomen kan bewerkstelligd worden door behandeling met digitonine (24). De mate van desintegratie kan gemeten worden met het mitochondriale marker enzym monoamino-oxidase (24) en het lysosomale marker enzym zure fosfatase (25), welke vrijkomen in de supernatant. Indien lysosomen een rol spelen in het directe ijzertransport van de celmembraan naar de mitochondria, zullen de ^{59}Fe bevattende lysosomen dit ^{59}Fe afgeven aan de supernatant tezamen met zure fosfatase na desintegratie van de lysosomen.

De resultaten van de digitonine incubaties zijn weergegeven in figuur 1. De weergegeven punten zijn het gemiddelde van tien experimenten. De recovery van de marker enzymen zure fosfatase en monoamino-oxidase bedroeg meer dan 80%.

Het patroon van enzymverdeling tussen pellet en supernatant in figuur 1 betekent voor het concentratiegebied van digitonine in deze experimenten, dat niet alleen lysosomen, maar ook mitochondriën gedesintegreerd worden. De desintegratie van lysosomen in reticulocyten door digitonine is, in tegenstelling tot de resultaten van de parenchymcellen, verbonden met een gelijktijdige desintegratie van mitochondriën. Dertig procent

van de monoamino-oxidase en zure fosfatase activiteit kan niet vrijgemaakt worden door behandeling met hoge digitonineconcentraties (0,8 mg/mg eiwit).

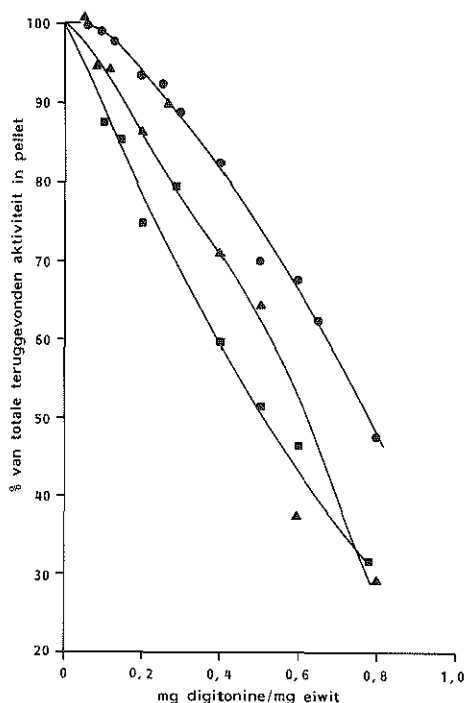


Fig. 1. Het effect van verschillende digitonine concentraties op een lysosomen-mitochondriën suspensie. Het totale percentage teruggevonden ^{59}Fe en enzymactiviteiten gesedimenteerd door centrifugatie bij 20.000 g gedurende 20 minuten zijn uitgezet tegen de digitonine concentratie.
 ^{59}Fe ;
 monoamino-oxidase;
 zure fosfatase.
 (●—● ^{59}Fe , ▲—▲ monoamino-oxidase, ■—■ zure fosfatase.)

Tijdens de desintegratie verschijnt er ijzer in de supernatant, maar dit ijzer kan zowel van lysosomen en mitochondriën alsmede van de plasmamembranen van reticulocyten afkomstig

zijn. De plasmamembranen vormen een contaminatie van de lysosomen-mitochondriën suspensie hetgeen blijkt uit de specifieke activiteit van de plasmamembraan marker acetylcholine esterase (Tabel 2).

TABEL 2. De specifieke activiteit van marker enzymen in geïsoleerde celmembranen en een mitochondriën-lysosomen (M-L) suspensie, uitgedrukt in mU/mg eiwit.

	Succinaat dehydrogenase	β -glucosidase	Acetylcholine esterase
Celmembranen	0,21	0,06	30
M-L suspensie	0,59	2,47	34

De aanwezigheid van lysosomen in reticulocyten

Het feit dat reticulocytenlysosomen niet te scheiden zijn van mitochondriën met behulp van centrifugatietechnieken en het feit dat de desintegratie van lysosomen en mitochondriën niet bij verschillende concentraties digitonine plaatsvindt, doet de vraag opwerpen of er nog wel normale lysosomen in reticulocyten voorkomen. Met behulp van enzymactiviteitsbepaling, fluorescentie-microscopie en elektronen-microscopie trachten wij deze vraag te beantwoorden.

De resultaten van deze onderzoeken zijn weergegeven in tabel 3, waaruit blijkt dat tijdens het rijpingsproces van erythroïde cellen de lysosomale en mitochondriale enzymactiviteit afneemt. Fluorescentie-microscopisch onderzoek onthulde dat slechts een gering aantal reticulocyten enige oranje lichtpuntjes bevat (fig. 2). Deze oranje gekleurde puntjes zijn lysosomen of lysosomale equivalenten (23).

Erythrocyten vertonen niet zulke lichtpuntjes na fluorescentie kleuring. Elektronen-microscopisch onderzoek van de reticulocyt bracht geen duidelijke lysosomale structuren aan het licht. Lysosomen hebben tenminste één gemeenschappelijk kenmerk, zij zijn begrensd door een enkelvoudige membraan (De

Tabel 3 De aktiviteit van β -glucosidase en mono-amino oxidase in erytroïde cellen. Enzym-aktiviteiten zijn uitgedrukt in pmol substraat omgezet per 10^6 cellen gedurende 45 minuten.

Celltype	β -glucosidase	Monoamino oxidase
Erythrocyten	0	0,60
Reticulocyten	7,1	1,80
Beenmergcell-suspensie	460	3,60

Duve, 1969) (26). Deze membranen die te vergelijken zijn met de celmembranen, zijn niet zichtbaar in figuur 3.

De zwarte plekken in de reticulocyt zijn vacuolaire structuren, welke eiwitmateriaal bevatten, de pH van deze vacuolaire structuren, welke betrokken kunnen zijn bij de afbraak van organellen ligt beneden 5,0. Deze structuren worden in de literatuur aangeduid als: autophage vacuolen, cytolysosomen, vesicles, endosomen of receptosomen.

Gedefinieerde lysosomen zijn echter niet aan te tonen met behulp van E.M. onderzoek in reticulocyten.

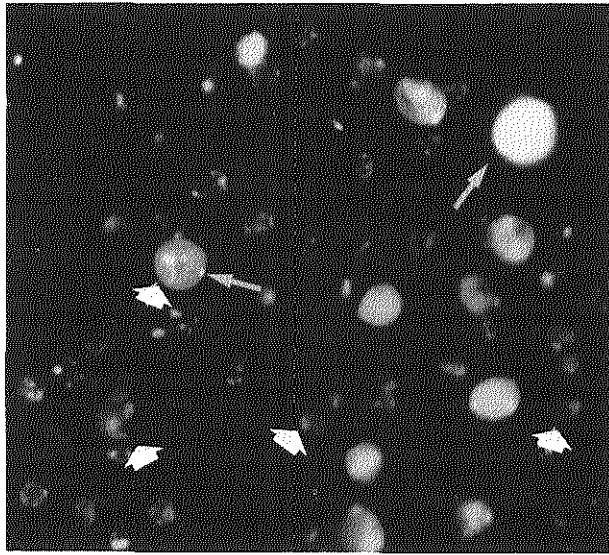
Isoelektrische focussering van het incubatiemedium

Na incubatie van reticulocyten met diferri transferrine werd de supernatant onderzocht op de aanwezigheid van apo-, monoferri en diferri transferrinen met behulp van de analytische isoelektrische focusseringstechniek.

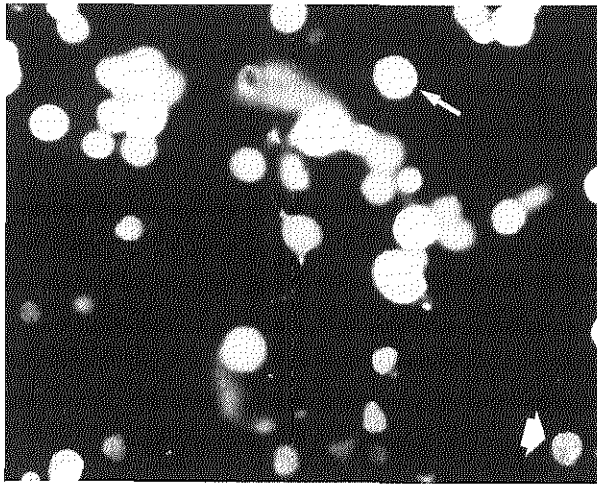
De hoeveelheid apotransferrine, TfFe(A) en TfFe(B) neemt toe met de incubatietijd zoals uit figuur 4 blijkt.

Discussie

De wijze waarop ijzer in de reticulocyt van de celmembraan naar de mitochondriën wordt getransporteerd ten behoeve van de heemsynthese is nog steeds onduidelijk. Er zijn verschillende indirecte aanwijzingen dat lysosomen hierbij een rol vervullen

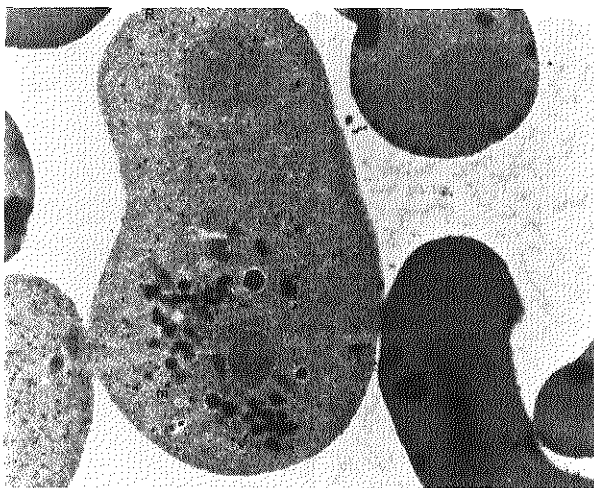


(A)

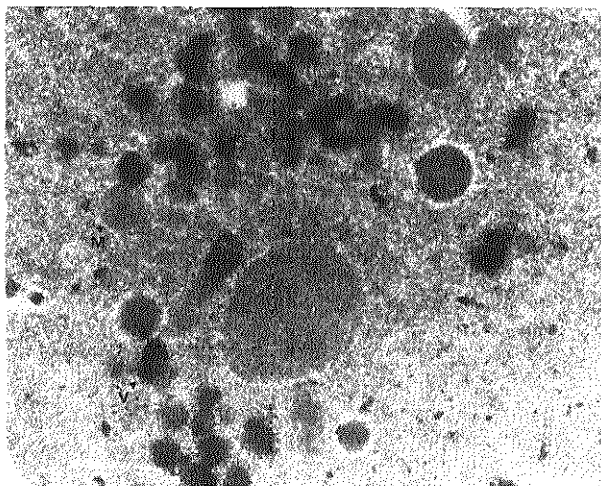


(B)

Fig. 2. Fluorescentie microscopische opname van een reticulocyten celsuspensie (A) en een beenmergcelsuspensie (B) gekleurd met acridine oranje. Cellen welke lysosomen bevatten worden aangegeven met een dunne pijl (fluoresceren oorspronkelijk helder oranje). Cellen welke mitochondriën bevatten, worden aangegeven met een dikke pijl (fluoresceren oorspronkelijk groen).



(A)



(B)

Fig. 3. Elektronenmicroscopische opname van de reticulocyt. Reticulocyt (R) van een Wistar rat x 24.000 (A). Detail van het cytoplasma van de reticulocyt x 37.500 (B). Er zijn geen gedefiniëerd lysosomen waar te nemen, echter wel vacuolen (V) en mitochondriën (M).

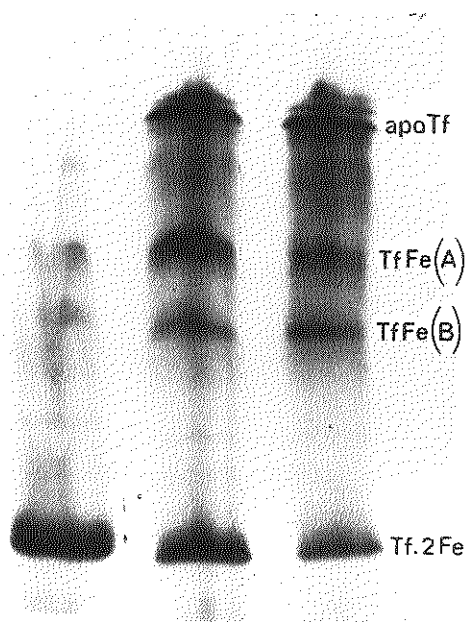


Fig. 4. Isoelektrisch focuseringspatroon van het incubatiemedium na incubatie van reticulocyten met diferri transferrine. Het uitgangsin incubatiemedium (links), het incubatiemedium na 2½ uur incubatie (rechts) en het incubatiemedium na 2 uur incubatie worden getoond.

(4, 5, 8, 9, 10). Echter, vele van deze experimenten zijn uitgevoerd met fibroblasten welke niet zoveel ijzer nodig hebben als hemoglobine synthetiserende cellen. Studies met erythroblasten (10) en reticulocyten (8) toonden niet aan dat lysosomen direct betrokken zijn bij het ijzeropnameproces door erythroïde cellen. Om bovengenoemde aanwijzingen nader te onderzoeken, werd in de huidige studie getracht de lysosomen op verschillende tijdstippen na incubatie met ^{59}Fe ^{125}I Tf, uit reticulocyten te isoleren. Met diverse scheidingstechnieken bleek het echter niet mogelijk om een zuivere lysosomensuspensie

sie uit de reticulocyten te isoleren; de suspensies met lysosomale enzymaktiviteit bleken in hoge mate verontreinigd met mitochondriale en plasmamembraan-enzymaktiviteit. Wel blijkt het mogelijk om een betrekkelijk zuivere mitochondriënsuspensie uit de reticulocyten te isoleren (27).

Om de rol van lysosomen in het ijzeropnameproces toch nader te evalueren werd vervolgens getracht de verkregen mitochondriënylysosomensuspensie indirect te zuiveren. Hierbij werd gebruik gemaakt van digitonine in een door Loewenstein (24) beschreven methode. Behandeling met deze methode van een mitochondriënylysosomensuspensie, afkomstig van levercellen met lage concentraties digitonine, desintegreerden de lysosomen terwijl de mitochondriën intact bleven en pas bij hogere concentraties digitonine desintegreerden. Door deze methode op een uit reticulocyten verkregen suspensie toe te passen zou het bij lage concentraties digitonine vrijkomende ijzer een indicatie geven over de rol van lysosomen in het ijzeropnameproces. Het bleek echter dat in een uit reticulocyten verkregen suspensie mitochondriën en lysosomen geen discriminatie vertoonden met betrekking tot hun gevoeligheid voor desintegratie door digitonine. Zowel de resultaten van de scheidingsexperimenten als die van de digitonine-experimenten doen vermoeden dat in de reticulocyt nauwelijks vrije intacte lysosomen voorkomen; hiervoor bestaan in de literatuur verschillende aanwijzingen. Zoals bekend bevatten erythrocyten geen mitochondriën, lysosomen en ribosomen meer. In de reticulocyt vindt de afbraak van deze celorganellen plaats. Rapoport (28) vond aanwijzingen dat de reticulocyt slechts restanten van lysosomen bevatte, die hij cytoplasmatische vacuolen noemde. Hij vond lysosomale enzymen vrij in de cytosol en gebonden aan plasmacelmembranen voorkomen. Krause (29) vond in konijnenreticulocyten met behulp van cytochemische technieken eveneens vacuolaire structuren die mitochondriale kenmerken vertoonden, maar daarnaast ook het lysosomale enzym zure fosfatase bevatten. Simpson en Kling (30) vonden dat tijdens het rijpingsproces van reticulocyt tot erythrocyt o.a. lysosomen en mitochondriën

door vesicles omgeven worden, die later met deze celorganellen en elkaar fuseren. De ontstane vacuolen fuseren ook met de plasmamembraan. De waarnemingen kunnen een goede verklaring vormen voor de resultaten van de huidige experimenten waarbij reticulocytenlysosomen niet goed gezuiverd konden worden van plasmacelmembranen en mitochondriale verontreinigingen. Ook de aanwezigheid van lysosomale en een deel van de mitochondriale enzymactiviteit bij sucrose dichtheidsgradiënt centrifugatie-experimenten in lagen met een andere dichtheid dan gebruikelijk, vormen een aanwijzing dat deze enzymactiviteiten zich bevinden in structuren die anders zijn dan de oorspronkelijke mitochondriën en lysosomen.

Nader fluorescentie-microscopisch en elektronen-microscopisch onderzoek van de door ons gebruikte reticulocyten toonde aan dat, in tegenstelling tot intacte mitochondriën en ribosomen, deze cellen vrijwel geen gedefinieerde lysosomen (26) bevatten, wel worden vacuolaire structuren met eiwitmateriaal aangetroffen. Uit het feit dat uit onze waarnemingen blijkt dat reticulocyten nauwelijks nog intacte lysosomen bevatten, kan geconcludeerd worden dat het onwaarschijnlijk is dat in het ijzeropnameproces van de reticulocyt lysosomen een belangrijke rol spelen.

Aangezien reticulocyten nog veel ijzer opnemen, moeten andere celstructuren betrokken zijn bij de afsplitsing van ijzer van transferrine.

Van Renswoude et al. (31) toonden aan dat in humane erytroleukemia cellen (K562) zure vacuolen van niet-lysosomale oorsprong, in plaats van lysosomen, betrokken zijn bij de ijzer-afplitsing van transferrine wat in de cel getransporteerd wordt via receptor-mediated endocytose. De lage pH in de zure vacuolen zou verantwoordelijk zijn voor de ijzerafplitsing van transferrine, waarna apotransferrine geëxocytoteerd wordt door de cel.

Subcellulaire fractioneringsstudies met HeLa cellen en sucrose dichtheidsgradiënten duiden erop dat geëndocytoteerd transferrine aanwezig is in vesicles die zich onderscheiden van lyso-

somen, omdat het uniforme lysosomale marker enzym hexosaminidase ontbreekt (32).

Dickson et al. (33) vergeleken de route waarlangs epidermale groeifactor (EGF) en transferrine opgenomen werden door humane carcinoma cellen van het HeLa-type. In dubbele labelingsstudies met ^{125}I en ^{131}I maakten zij daarbij gebruik van sucrose dichtheidsgradiënt centrifugatie met celhomogenaten en fluorescentie-microscopie met intacte cellen. Het bleek dat beide liganden opgenomen werden in een vesicle en daarna getransporteerd werden naar een celstructuur met hogere dichtheid. Vervolgens werd EGF naar een celstructuur getransporteerd welke lysosomale enzymen bevatte, terwijl transferrine intact door de cel werd geëxocytoterd.

Fluorescentie-microscopisch onderzoek met beide fluorescerend gemaakte liganden bevestigde dit beeld.

Uit een onderzoek op elektronen-microscopisch niveau met een horse radisch peroxidase conjugaat van transferrine en EGF (34) bleek dat in humane KB-cellen transferrine via endosomen in tubulaire elementen terechtkomt welke een gelijkenis vertonen met microtubuli en die mogelijk betrokken zijn bij de exocytose van transferrine. EGF daarentegen werd niet in deze structuren aangetroffen.

In onuitgerijpte erythroïde cellen uit de foetale rattenlever en in konijnenreticulocyten toonden Iacopetta et al. (35, 36) met behulp van elektronenmicroscopie transferrine aan in vesicles, welke werden omschreven als lysosoom-achtig van aard. Dit resultaat werd bevestigd voor konijnenreticulocyten door Harding et al. (37) die transferrine, gemerkt met goud, elektronen-microscopisch detecteerde in zure fosfatase negatieve ruimten.

Op basis van deze waarnemingen en onze resultaten, welke aantonen dat reticulocyten nauwelijks intacte lysosomen bevatten, is het zeer waarschijnlijk dat in reticulocyten zure vacuolen in plaats van lysosomen betrokken zijn bij de afsplitsing van ijzer van transferrine.

Hoewel een gedeelte van het ijzer van geëndocytoterd transfer-

rine afgesplitst zou kunnen worden door de lage pH in zure celstructuren tonen onze incubatiestudies met diferri transferrine aan dat een ander gedeelte van het ijzer van transferrine verwijderd wordt op een andere wijze. Na incubatie met diferri transferrine bevat het incubatiemedium naast diferri transferrine eveneens monoferri TfFe(A) en monoferri TfFe(B). Young (38) vond eveneens dat incubatie met diferri transferrine met ratten-reticulocyten resulteerde in de verschijning in het incubatiemedium van apotransferrine samen met hoeveelheden van de twee monoferri transferrinen in een lineaire wijze.

Loh (39) en Van Baarle et al. (11) vonden soortgelijke resultaten voor konijnenreticulocyten.

Onze experimenten en die van Young laten zien dat het onwaarschijnlijk is dat de monoferri transferrinen gevormd zijn uit apotransferrine door ijzer op te nemen van de reticulocyten of het incubatiemedium.

Het is onmogelijk dat beide monoferri vormen van transferrine afkomstig zijn van diferri transferrine bij een pH welke in zure vacuolen verondersteld wordt. Het op de B-plaats gebonden ijzer van transferrine is instabiel beneden pH 7 en het op de A-plaats gebonden ijzer beneden pH 5,5.

De aanwezigheid van beide monoferri transferrinen na incubatie betekent dat naast de ijzerafsplitsing bij lage pH, reticulocyten een ander mechanisme bezitten voor de afsplitsing van ijzer van celgebonden transferrine.

Het feit dat in het verleden ijzerhoudende membraancomponenten zijn geïsoleerd (40, 41), maakt het waarschijnlijk dat een gedeelte van het ijzer van celgebonden transferrine afgegeven wordt aan plasmamembraaneiwiitten aan de transferrine receptor-plaats zoals is gepostuleerd door Jandl & Katz.

LITERATUUR

1. JANDL, J.H. and KATZ, J.H. (1963). The plasma-to-cell cycle of transferrin. *J. Clin. Invest.* 42, 314-326.
2. BAKER, E. and MORGAN, E.H. (1969). The kinetics of the interaction between rabbit transferrin and reticulocytes. *Biochem. J.* 113, 1133-1141.
3. BASU, S.K., GOLDSTEIN, J.L., ANDERSON, R.G.W. and BROWN, M.S. (1981). Monensin interrupts the recycling of low density lipoprotein receptors in human fibroblasts. *Cell*. 24 493-502.
4. SCHNEIDER, Y.J., TULKENS, P., DE DUVE, C. and TROUET, A. (1979). Fate of plasma membrane during endocytosis II. Evidence for recycling (shuttle) of plasma membrane constituents. *J. Cell. Biol.* 82, 466-474.
5. OCTAVE, J.N., SCHNEIDER, Y.J., HOFFMANN, P., TROUET, A. and CRICHTON, R.R. (1979). Transferrin protein and iron uptake by cultured rat fibroblasts. *FEBS Letters* 108, 127-130.
6. OHKUMA, S. and POOLE, B. (1978). Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 75, 3327-3331.
7. DE DUVE, C., BARSY, Th., POOLE, B., TROUET, A., TULKENS, P. and VAN HOOF, F. (1974). Lysosomotropic agents. *Biochem. Pharmac.* 23, 2495-2531.
8. MORGAN, E.H. (1981). Inhibition of reticulocyte iron uptake by NH_4Cl and CH_3NH_2 . *Biochim. Biophys. Acta* 642, 119-134.
9. OCTAVE, J.N., SCHNEIDER, Y.J., CRICHTON, R.R. and TROUET, A. (1982). Transferrin protein and iron uptake by culture rat fibroblasts. *FEBS Letters* 108, 127-130.
10. OCTAVE, J.N. SCHNEIDER, Y.J., HOFFMANN, P. TROUET, A. and CRICHTON, R.R. (1982). Transferrin uptake by cultured rat embryo-fibroblasts. *Eur. J. Biochem.* 123, 235-240.
11. VAN BAARLE, J., BROUWER, J.T., LEIBMAN, A. and AISEN, Ph. (1980). Evidence for the functional heterogeneity of the two sites of transferrin in vitro. *Brit. J. Haemat.* 46, 417-426.
12. DODGE, J.T., MITCHEL, C. and HANAHAN, D.J. (1963). The preparation and chemical characteristics of hemoglobin free ghosts of human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 100, 119-130.
13. JARRET, H.W. and PENNISTON, J.T. (1976). A new assay for endocytosis in erythrocyte ghosts based on loss of acetylcholinesterase activity. *Biochim. Biophys. Acta* 448, 314-324.
14. LODISH, H.F. and SMALL, B. (1975). Membrane proteins synthesized by rabbit reticulocytes. *J. Cell Biol.* 65, 51-64.
15. Pharmacia Fine Chemicals (1979). Separation News 1.

16. IBRAHIM, N.G., GRUENSPECHT, N.R. and FREEDMAN, M.L. (1978). Hemin feedback inhibition at reticulocyt α -amino-levulinic acid synthetase and α -amino-levulinic acid dehydratase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 80, 722-728.
17. ELLMAN, G.L., COURTNY, K.D., ANDRES, V.Jr. and FEATHERSTONE, R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmac.* 7, 88-95.
18. MEYER, A.E.F.H., BENSON, D. and SCHOLTE, H.R. (1977). The influence of freezing and freeze-drying of tissue specimens on enzyme activity. *Histochemie* 51, 297-303.
19. BARRET, A.J. and HEATH, M.F. (1977). Lysosomal enzymes. In: *Lysosomes, A Laboratory Handbook* (Ed.: DINGLE, J.T.), p. 119.
20. WURTMAN, R.J. and AXELROD, J. (1963). A sensitive and specific assay for the estimation of monoamine oxidase. *Biochem. Pharmac.* 12, 1437-1439.
21. WALTER, K. and SCHUTT, Ch. (1974). Acid and alkaline phosphatase in serum. In: *Methods of Enzymatic Analysis* (Ed.: JAMIESON, G.A. and ROBINSON, D.M.), Vol. 2, pp. 165-184.
22. MARKWELL, M.A.K., HAAS, S.M., BIEBER, L.L. and TOLBERT, N.E. (1978). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analyt. Biochem.* 87, 206-210.
23. ALLISON, A.C. and YOUNG, M.R. (1969). Vital staining and fluorescence microscopy of lysosomes. In: *Lysosomes in Biology and Pathology* (Ed.: DINGLE, J.T. and FELLS, H.B.), Vol. 2, pp. 600-628.
24. LOEWENSTEIN, J., SCHOLTE, H.R. and WIT PEETERS, E.M. (1970). A rapid and simple procedure to deplete rat-liver mitochondria of lysosomal activity. *Biochim. Biophys. Acta* 223, 432-436.
25. SCHNAITMAN, C., ERWIN, V.G. and GREENAWALT, J.W. (1967). The submitochondrial localization of monoamine oxidase. *J. Cell Biol.* 32, 719-735.
26. DE DUVE, C. (1969). The lysosome in retrospect. In: *Lysosomes in Biology and Pathology* (Ed.: DINGLE, J.T. and FELLS, H.B.), Vol. 1, pp. 3.
27. BOROVA, J., PONKA, P. and NEUWIRT, J. (1973). Study of intracellular iron distribution in rabbit reticulocytes with normal and inhibited heme synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 320, 143-156.
28. RAPOPORT, S.M., ROZENTHAL, S., SCHEWE, T., SCHUTZE, M. and MILLER, M. (1974). The metabolism of the reticulocyt. In: *Cellular and Molecular Biology of Erythrocytes* (Ed.: YOSHIKAWA, H. and RAPOPORT, S.M.), pp. 93-141.
29. KRAUSE, W. (1975). Utrahistochemische Lokalisierung der sauren Phosphatase und gefrierhämolytierten Kaninchenreticulocyten. *Acta Histochem. Suppl.* Bd. 15, 149-152.
30. SIMPSON, C.F. and KLING, J.M. (1968). The mechanism of mitochondrial extrusion from phenylhydrazin-induced reticulocytes in the circulating blood. *J. Cell Biol.* 36, 103-109.

31. VAN RENSWOUDE, J., BUDGES, K.R., HARFORD, J.B. and KLAUSNER, R.D. (1982). Receptor mediated endocytosis of transferrin and the uptake of Fe in K562-cells: Identification of a non-lysosomal acidic compartment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 6186-6190.
32. LAMB, J.E., RAY, F., WARD, J.H., KUSHNER, J.P. and KAPLAN, J. (1983). Internalization and subcellular localization of transferrin and transferrin receptors in Hela Cells. *J. Biol. Chem.* 258, 8751-8758.
33. DICKSON, R.B., HANOVER, J.A., WILLINGHAM, M.C. and PASTAN, I. (1983). Prelysosomal divergence of transferrin and epidermal growth factor during receptor-mediated endocytosis. *Biochem.* 22, 5667-5674.
34. WILLINGHAM, M.C., HANOVER, J.A., DICKSON, R.B. and PASTAN, I. (1984). Morphologic characterization of the pathway of transferrin endocytosis and recycling in human KB-cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 175-179.
35. IACOPETTA, B.J., MORGAN, E.H. and YEOH, G.C.T. (1983). Receptor-mediated endocytosis of transferrin by developing erythroid cells from the fetal rat liver. *J. Histochem. Cytochem.* 31, 336-344.
36. IACOPETTA, B.J., MORGAN, E.H. (1983). An electronmicroscope autoradiographic study of transferrin endocytosis by immature erythroid cells. *Eur. J. Cell. Biol.* 32, 17-23.
37. HARDING, C. HEUSER, J. and STAHL P. (1983). Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J. Cell Biol.* 97, 329-339.
38. YOUNG, S.P. (1982). Evidence for the functional equivalence of the iron-binding sites of rat transferrin. *Biochim. Biophys. Acta* 718, 35-41.
39. LOH, T.T. (1983). Studies on the forms of iron-transferrin released from rabbit reticulocytes. *Life Sciences* 3, 915-920.
40. VAN DER HEUL, C., KROOS, M.J., DE JEU-JASPARS, C.M.H. and VAN ELJK, H.G. (1980). The uptake of iron by reticulocytes. The influence of purification of the ghosts on iron containing components in the ghost suspension. *Biochim. Biophys. Acta* 601, 572-583.
41. SPEYER, B.E. and FIELDING, J. (1974). Chromatographic fractionation of human reticulocytes after uptake of doubly labelled ⁵⁹Fe, ¹²⁵I-transferrin. *Biochim. Biophys. Acta* 332, 192-200.

HOOFDSTUK 4

OVER MECHANISMEN WELKE BETROKKEN ZIJN BIJ HET PROCES VAN IJZEROPNAME DOOR RATTENRETICULOCYTEN

INLEIDING

In het vorige hoofdstuk werd verondersteld dat de ijzeropname door reticulocyten gelijktijdig plaats zou kunnen vinden via twee verschillende mechanismen.

Deze twee mechanismen komen mogelijk overeen met de hypothese van Jandl en Katz (1) en die van Morgan (2). Volgens Jandl en Katz zou transferrine, na binding van ijzertransferrine aan de membraanreceptor, zijn ijzer af kunnen geven aan plasmamembraan-eiwitten (mechanisme 1). De plasmamembraan-eiwitten transporteren daarna het ijzer naar het intracellulaire milieu. De andere mogelijkheid, geformuleerd door Morgan, is dat transferrine door de cel opgenomen wordt via een proces van receptor gemedieerde endocytose. Na endocytose van ijzertransferrine in zure vacuolen wordt ijzer afgesplitst van transferrine als gevolg van de lage pH (mechanisme 2). Het ontstane apotransferrine keert vervolgens terug naar de celmembraan waar het intact door de cel wordt afgegeven.

Het onderzoek naar het proces van ijzeropname door de reticulocyt zal nader bestudeerd worden met behulp van het carboxylzure ionofoor monensine. Het is bekend dat monensine intracellulaire pH gradiënten neutraliseert (3), de vloeibare fase endocytose remt (4) en de receptorrecycling remt na receptor gemedieerde endocytose (5).

Op basis van deze gegevens zou monensine meer informatie kunnen verschaffen over de veronderstelling dat naast de ijzerafplitsing van geëndocyteerd transferrine door een lage pH een tweede mechanisme betrokken is bij het ijzeropnameproces door erytroïde cellen.

MATERIAAL EN METHODEN

Rattenreticulocyten, rattentransferrine gemerkt met ^{125}I en ^{59}Fe werden verkregen via de in hoofdstuk 2 beschreven methoden.

Algemene incubatieprocedure

De ijzeropname en transferrinebinding bij 37°C (celgebonden transferrine) werd bepaald op de in hoofdstuk 2 beschreven wijze. De incubatie-experimenten waarbij slechts een binding van ijzertransferrine aan de transferrinereceptor aan de plasmamembraan wordt gewenst zonder verdere ijzeropname in intracellulaire compartimenten werden uitgevoerd bij 4°C . De experimenten zijn in triplo uitgevoerd.

Afgifte van ijzer en transferrine van voorgeïncubeerde reticulocyten

Om de afgifte van ijzer en transferrine door reticulocyten te kunnen meten, werden de cellen eerst geïncubeerd met ^{59}Fe en ^{125}I gemerkt transferrine. Nadat deze incubatie gestopt werd en de reticulocyten viermaal met ijskoude MEM waren nagewassen, werden de cellen geresuspendeerd tot de oorspronkelijke celconcentratie in MEM van 37°C of in MEM van 4°C , welke 1 nmol ongemerkt transferrine per ml bevatte, en werden gereïncubeerd gedurende verschillende reïncubatietijden. De hoeveelheid van reticulocyten afgesplitst ijzertransferrine werd bepaald door de oorspronkelijke ^{59}Fe en ^{125}I radioactiviteit van de reticulocyten te vergelijken met de overblijvende ^{59}Fe en ^{125}I radioactiviteit na reïncubatie.

Incubatie-experimenten met het carboxylzure ionofoor monensine

Het effect van monensine op de ijzer- en transferrine-opname werd onderzocht door monensine tot een eindconcentratie variërend van 0,05-0,9 μM (Calbiochem-Behring Corp.) aan de celsuspensie toe te voegen. Na preïncubatie gedurende 20 minu-

ten bij 37°C werden de reticulocyten geïncubeerd met ^{59}Fe , ^{125}I gemerkt transferrine gedurende verschillende tijden bij 37°C zoals reeds eerder werd beschreven. Monensine werd opgelost in ethanol voordat verdunning met het incubatiemedium plaatsvond. De ethanolconcentratie bedroeg nooit meer dan 0,1% (v/v) en had geen invloed op de ijzer- en transferrine-opname, hetgeen vastgesteld is met controle-experimenten.

De omkeerbaarheid van het effect van monensine

Reticulocyten werden voorgeïncubeerd met 0,35 μM monensine bij 37°C gedurende 20 minuten gevolgd door incubatie met ^{59}Fe , ^{125}I -transferrine gedurende 20 minuten bij 37°C. Monensine werd uit het incubatiemedium verwijderd door de celsuspensie te reïncuberen in verse MEM gedurende 10 minuten bij 37°C. Na wassen werden de cellen geresuspendeerd in MEM en geïncubeerd met dubbel gemerkt transferrine.

Invloed van voorincubatie met monensine

Reticulocyten werden met 0,35 μM monensine voorgeïncubeerd bij 37°C variërend van 1 tot 20 minuten waarna ze geïncubeerd werden met ijzertransferrine en de ijzer- en transferrine-opname werd gemeten.

Effect van intracellulair en extracellulair monensine op de ijzeropname

Reticulocyten werden voorgeïncubeerd gedurende 20 minuten bij 37°C met 0,35 μM monensine. Aan het eind van de voorincubatie werd de reticulocyten-suspensie verdeeld in twee porties.

Een portie reticulocyten bleef in het oorspronkelijke incubatiemedium en zal worden aangeduid als portie a_1 . De andere portie reticulocyten, b_1 , werd overgebracht in verse MEM van 37°C. De ijzeropname door de twee celsuspensie werd tezamen met een controle reticulocyten-suspensie (portie c_1) bepaald zoals eerder is beschreven. Na 15 minuten incubatie met ^{59}Fe , ^{125}I -transferrine werd aan een gedeelte van alle drie suspensies 0,35 μM monensine toegevoegd. De ijzeropname werd vervol-

gens gemeten na voortgezette incubatie van de celsuspensie (a_2 , b_2 , c_2).

Bepaling van het aantal receptoren en de bindingsconstante

Cellen werden bij 4°C gedurende 30 minuten geïncubeerd met ^{59}Fe , ^{125}I -transferrine, waarna een cytosol bereid werd. De cytosol werd bereid door de nagewassen reticulocyten suspensie 1 op 1 te verdunnen met een 5 millimolaire Tris-HCl buffer van pH 7,5, welke 1 millimolair trisatriumcitraat bevatte. De suspensie werd 10 minuten bij kamertemperatuur gehouden, waarna 30 minuten gecentrifugeerd werd bij 20.000 g.

De reticulocyten cytosol werd gefractioneerd door gelfiltratie over een Sephadex G-100 kolom (1,1 x 90 cm) die geëquilibreerd was met een 0,1 molaire Tris-HCl buffer, pH 8,0, 0,5 M NaCl. Deze buffer fungeerde ook als elutiebuffer.

De relatieve molecuulmassa's werden bepaald door de kolom te calibreren met standaard-eiwitten afkomstig van Pharmacia.

RESULTATEN

a. Invloed van de monensineconcentratie op de transferrinebinding en ijzeropname

Het effect van monensine op de ijzeropname is afhankelijk van de monensineconcentratie in het incubatiemedium, zoals uit figuur 1 blijkt. Een toename van de monensineconcentratie resulteert in een afname van de ijzeropname. Echter vanaf een monensineconcentratie van 0,30 μM vindt er geen toename meer plaats van het remmend effect op de ijzeropname. Om deze redenen wordt een monensineconcentratie van 0,35 μM in de meeste experimenten gebruikt. Figuur 1 toont ook aan dat monensine de transferrinebinding aan reticulocyten nauwelijks beïnvloedt. Het effect van monensine op de ijzeropname bleek geheel reversibel te zijn. Wilcox et al. (4) hebben daarnaast waargenomen dat monensine het celmetabolisme in fibroblasten niet beïnvloedt.

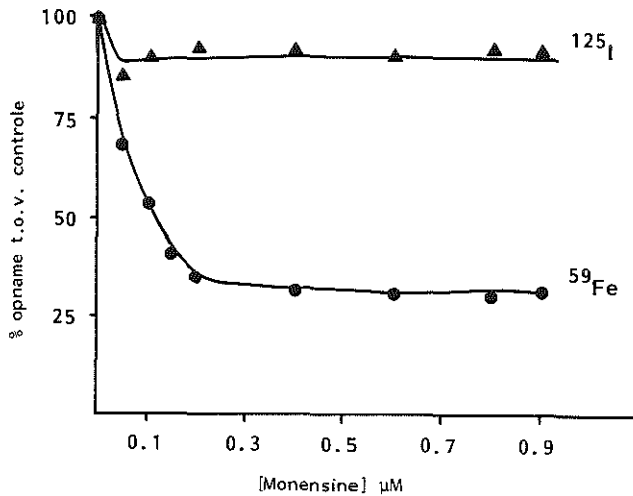


Fig. 1. De invloed van de monensine concentratie op de transferrinebinding en ijzeropname.

▲—▲ Transferrinebinding;
●—● IJzeropname.

b. Invloed van voorincubatie met monensine

Er werd geen significant verschil in ijzeropname of transferrinebinding waargenomen indien de reticulocyten kortere of langere tijd werden voorgeïncubeerd met monensine (fig. 2a-2d). Variatie van de voorincubatietijd met monensine beïnvloedde de binding van transferrine aan reticulocyten niet; er was zelfs geen verschil in binding met reticulocyten die niet met monensine waren voorgeïncubeerd. De remming van de ijzeropname neemt toe met de incubatietijd met ijzertransferrine en is volledig na ongeveer 15-20 minuten incubatie.

In het algemeen zijn alle transferrinereceptoren na deze incubatietijd verzadigd met transferrine.

De variabele voorincubatietijd met monensine veroorzaakte geen significante verschillen op het remmend effect van de ijzeropname zoals in fig. 2b en 2d wordt weergegeven.

Zelfs wanneer monensine gelijktijdig met transferrine aan

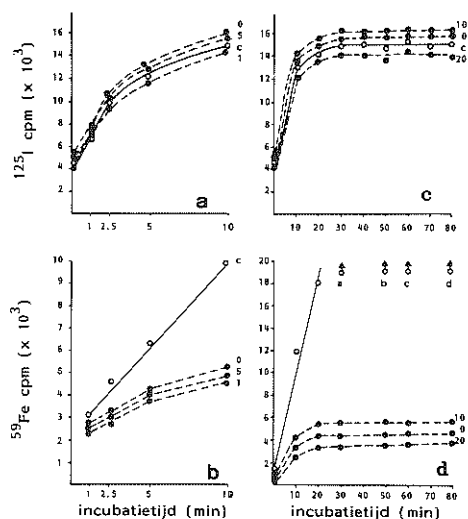


Fig. 2. De invloed van de voorincubatietijd met monensine op de ijzeropname (fig. 2b, 2d) en transferrinebinding (fig. 2a, 2c) bij 37°C . De voorincubatietijden met monensine (●---●) worden in de figuren in minuten aangegeven; controle incubatie (O—O).

de reticulocyten suspensie wordt toegevoegd, wordt dezelfde mate van de remming van de ijzeropname waargenomen (fig. 2b en 2d). Om de mogelijkheid uit te kunnen sluiten dat de algehele remming van de ijzeropname na 15-20 minuten incubatie veroorzaakt wordt door een volledige blokkering van de transferrinebinding aan de receptor op de plasmamembraan, werden reïncubatie-experimenten uitgevoerd. Reticulocyten werden hiertoe gedurende 20 minuten bij 37°C voorgeïncubeerd met monensine en vervolgens bij 37°C geïncubeerd met ongemerkt transferrine gedurende nog eens 30 minuten. Op dit moment hebben de reticulocyten het stadium van volledige remming van de ijzeropname bereikt (experiment, figuur 2). Op dit moment werd het ongemerkte transferrine vervangen door ^{59}Fe , ^{125}I -gemarkt transferrine en werd de incubatie gedurende 45 minuten voortgezet. Controle-experimenten

zonder monensine werden bij 37°C en 4°C uitgevoerd. Bij 4°C wordt er nauwelijks transferrine bijna alle transferrine receptoren bezet zijn geweest. De controle-experimenten bij 37°C tonen aan dat dit ongemerkte transferrine vervangen wordt door ^{59}Fe , ^{125}I transferrine gevolgd door ijzeropname op lineaire wijze (fig. 3).

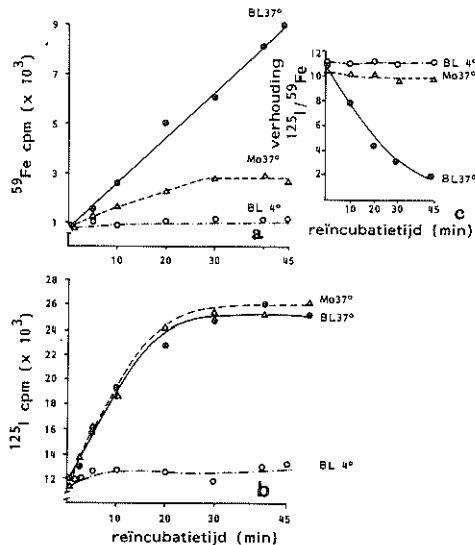


Fig. 3. De transferrine en ijzeropname tijdens reïncubatie van voorgeïncubeerde reticulocyten met ^{59}Fe , ^{125}I gemerkt transferrine bij 37°C (●-●-● en Δ-Δ-Δ) of bij 4°C (○-○-○). De reticulocyten werden voorgeïncubeerd bij 37°C gedurende 20 minuten met (Δ-Δ-Δ) of zonder (●-●-● en ○-○-○) monensine en vervolgens gedurende 30 minuten met ongemerkt transferrine. Fig. 3c geeft $^{125}\text{I}/^{59}\text{Fe}$ verhouding weer van de verschillende celsuspensies tijdens reïncubatie.

Fig. 3 toont eveneens aan dat de aanwezigheid van monensine de transferrinebinding aan reticulocyten niet beïnvloedt. Het ongemerkte transferrine wordt door ^{59}Fe , ^{125}I -transferrine vervangen met dezelfde snelheid als in de controle-experimenten. De ijzeropname is echter lager, maar komt volledig voor rekening van het ijzer wat gebonden is aan ^{59}Fe ,

^{125}I -gemerkt transferrine, wat het ongemerkte transferrine op de celmembraan vervangt.

Aangezien de $^{125}\text{I}/^{59}\text{Fe}$ verhouding van de reticulocyten suspensie dezelfde blijft als de $^{125}\text{I}/^{59}\text{Fe}$ verhouding van de transferrine-oplossing wordt er door de reticulocyten geen ijzer van transferrine afgesplitst, hoewel nieuwe transferinmoleculen gebonden worden aan de receptor op de plasmamembraan (fig. 3C).

c. Het effect van extracellulair en intracellulair monensine op de ijzeropname

De invloed van de plaats van monensine op de ijzeropname door reticulocyten werd onderzocht door de ijzeropname door reticulocyten te bepalen bij verschillende concentra-

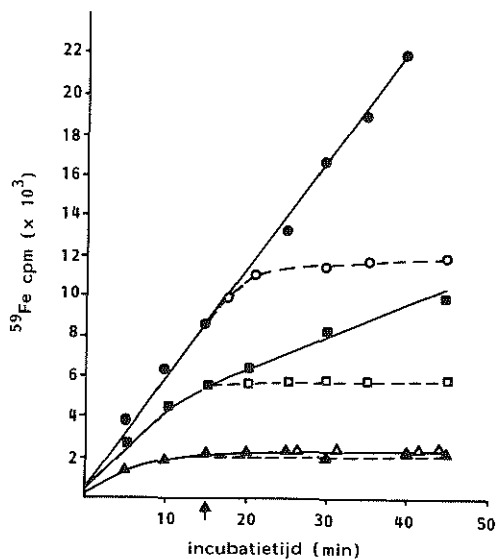


Fig. 4. Het effect van extra- en intracellulair monensine op de ijzeropname bij 37°C.

▲-▲-▲ Extra- en intracellulair monensine (a₁);
 ■-■-■ Intracellulair monensine (b₁);
 ●-●-● Controle reticulocyten (c₁).
 IJzeropname na toevoeging van nog eens 0,35 μM monensine aan suspensie a₁ △-△-△ (a₂), aan suspensie b₁ □-□-□ (b₂) en aan suspensie c₁ ○-○-○ (c₂). De tweede toevoeging van monensine wordt aangeduid door de pijl op de absis.

ties monensine in de intracellulaire en extracellulaire ruimten (zie Materiaal en Methoden). Figuur 4 toont aan dat het remmend effect van alleen intracellulair monensine op de ijzeropname door reticulocyten minder uitgesproken is dan het remmend effect van intra- en extracellulair monensine tezamen (fig. 4b en 4a). De toevoeging van eenzelfde hoeveelheid monensine heeft geen invloed op de ijzeropname door een reticulocyten suspensie waarin reeds intra- en extracellulair monensine aanwezig was (a_2). De toevoeging van monensine aan de reticulocyten suspensie b_1 heeft echter direct een extra remmend effect tot gevolg waarbij de ijzeropname volledig geremd wordt (b_2).

Toevoeging van monensine aan een controlesuspensie na 15 minuten incubatie met ^{59}Fe , ^{125}I -gemerkt transferrine resulteert eveneens in een directe remming van de ijzeropname. In tegenstelling met de reticulocyten die reeds intracellulair monensine bevatten (b_2), is de remming van de ijzeropname niet volledig totdat de incubatie 10-15 minuten is voortgezet (fig 4c, c_2).

d. De afgifte van ijzer en transferrine door reticulocyten tijdens reïncubatie met ongemerkt transferrine

De afgifte van ijzer en transferrine door reticulocyten die met ^{59}Fe , ^{125}I -transferrine voorgeïncubeerd zijn, werd gemeten na reïncubatie met ongemerkt transferrine bij 37°C en bij 4°C en 37°C in aanwezigheid van monensine. De voorincubatie werd uitgevoerd bij 37°C om zogeheten celgebonden transferrine te verkrijgen en bij 4°C wat volgens Karin en Mintz (1981) (7) membraangebonden transferrine oplevert.

d.1. Afgifte van celgebonden ijzer en transferrine

Reïncubatie bij 37°C heeft nauwelijks enige ijzerafgifte door de reticulocyten tot gevolg hoewel tijdens de reïncubatie de eerste 10 minuten meer dan 50% van het celgebonden transferrine de cel verlaat (fig. 5a en 5b). Dit resulteert in een afname van de $^{125}\text{I}/^{59}\text{Fe}$ verhouding van

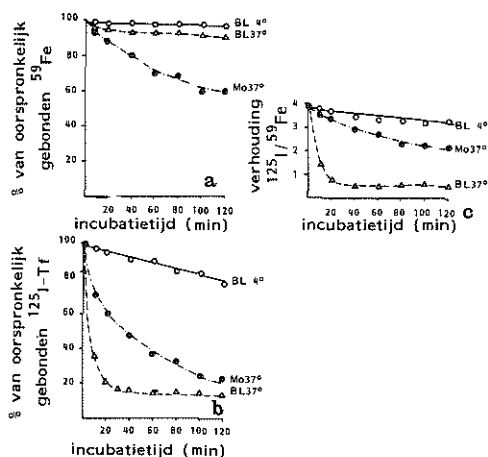


Fig. 5. De afgifte van celgebonden ^{59}Fe ^{125}I -gemerkt transferrine tijdens reïncubatie met ongemerkt transferrine bij 4°C (BL $\circ$ — $\circ$) en bij 37°C met (Mo $\bullet$ — $\bullet$) of zonder (BL Δ — Δ) monensine. Fig. 5c geeft de $^{125}\text{I}/^{59}\text{Fe}$ verhouding van de verschillende celsuspensies tijdens reïncubatie weer.

de reticulocytsuspensie (fig. 5c). Indien de reïncubatie bij 4°C wordt uitgevoerd, wordt er nauwelijks ijzer en een weinig ^{125}I -transferrine door de cel afgegeven. In aanwezigheid van monensine is de ijzerafgifte door de reticulocyten tijdens reïncubatie toegenomen, terwijl de ^{125}I -transferrine afgifte slechts weinig vermindert in vergelijking met de reïncubatie bij 37°C zonder monensine, hoewel de snelheid van transferrine-afgifte afgenomen is (fig. 5a en 5b). Al het afgegeven ijzer en ^{125}I tijdens de reïncubatie-experimenten was gebonden aan intact transferrine wat werd vastgesteld met behulp van gelfiltratie en immunoprecipitatie.

d.2. Afgifte van plasmamembraan-gebonden ijzer en transferrine

Reticulocyten die gemerkt zijn met ^{59}Fe , ^{125}I -transferri-

ne bij 4°C werden bij 37°C gedurende 45 minuten gereïncubeerd. Dit leidde tot een onmiddellijke afgifte van transferrine door de cellen. In tegenstelling tot transferrine werd slechts een gering gedeelte van het ijzer door de cellen afgegeven en de $^{125}\text{I}/^{59}\text{Fe}$ verhouding van de celsuspensie nam onmiddellijk af nadat de reïncubatie begonnen was (fig. 6). Reïncubatie bij 37°C in aanwezigheid van monensine geeft een gelijktijdige afgifte van ^{59}Fe en ^{125}I -transferrine door de cellen te zien. Tijdens de reïncubatie bleef de $^{125}\text{I}/^{59}\text{Fe}$ verhouding gelijk aan de waarde ten tijde van het begin van de reïncubatie. Bij 4°C was er nauwelijks sprake van enige afgifte van ^{125}I -transferrine of ^{59}Fe door de cellen. In dit geval veranderde de $^{125}\text{I}/^{59}\text{Fe}$ verhouding eveneens niet tijdens de reïncubatie.

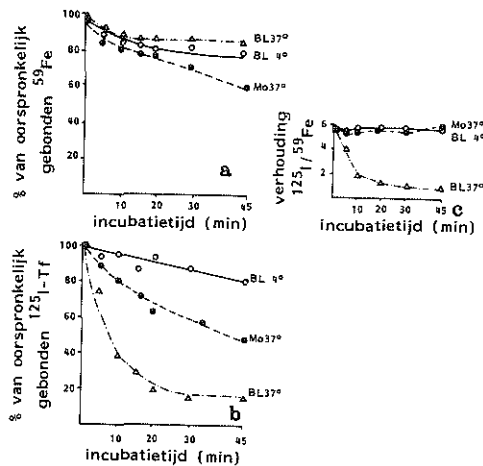


Fig. 6. De afgifte van membraangebonden ^{59}Fe ^{125}I -gemerkt transferrine tijdens reïncubatie met ongemerkt transferrine bij 4°C (BL $\circ$ — $\circ$) en bij 37°C met (Mo $\bullet$ — $\bullet$) of zonder (BL Δ — Δ) monensine. Fig. 6c geeft de $^{125}\text{I}/^{59}\text{Fe}$ verhouding weer van de verschillende celsuspensies tijdens reïncubatie.

TABEL 1. De invloed van monensine op het aantal plasmamembraan receptoren voor transferrine en op de ogenschijnlijke bindingsconstante.

Reticulocyten	n		$10^6 K$ (1/mol)
Normaal	242.000	88.000	5,7
	(146.000 - 325.000)		(2,3 - 8,8)
Monensine behandeld	273.000	118.000	5,2
	(129.000 - 398.000)		(2,4 - 9,7)

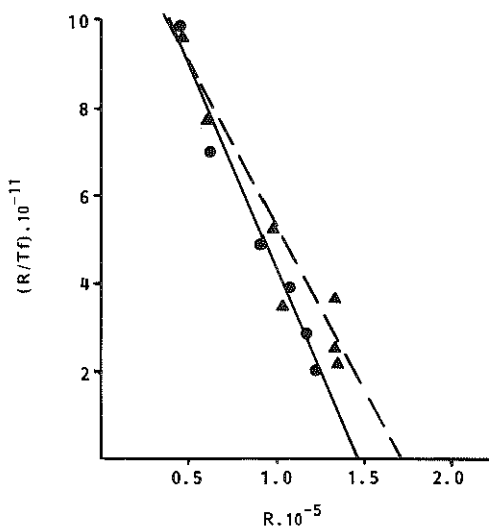


Fig. 7. Scatchard plot van de transferrine binding aan ratten reticulocyten bij 4°C.

R - aantal transferrine moleculen gebonden per reticulocyt;

Tf - molaire concentratie van ongebonden transferrine;

▲ --- ▲ reticulocyten voorgeïncubeerd met monensine;

● — ● controle reticulocyten.

e. Bepaling van het aantal transferrinereceptoren na incubatie van monensine

Uit figuur 7 en tabel 1 blijkt dat het aantal transferrinereceptoren op de celmembraan van reticulocyten, die voorgeïncubeerd zijn geweest met monensine, gelijk is aan het aantal transferrinereceptoren op de celmembraan van reticulocyten in een controlesuspensie. Monensine had eveneens geen invloed op de ogenschijnlijke bindingsconstante van transferrine met de receptor.

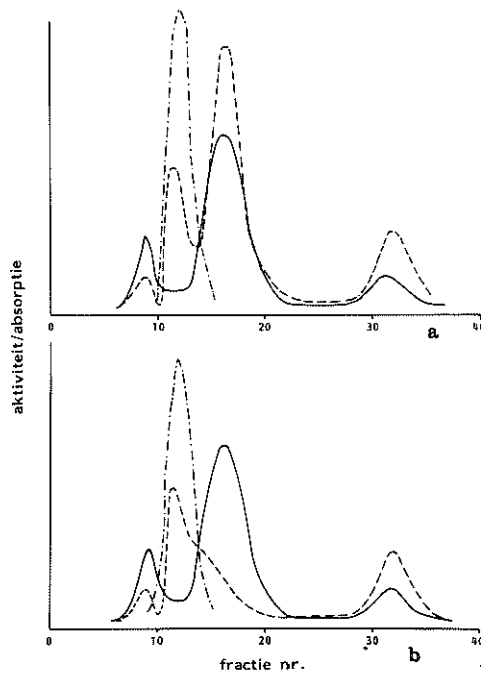


Fig. 8. Gelfiltratie op Sephadex G-100 van een cytosol na incubatie van reticulocyten met ^{59}Fe , ^{125}I -gemerkt transferrine bij 37°C zonder (a) of met (b) monensine.

----- ^{59}Fe ;
..... ^{125}I ;
———— Eiwit.

f. Chromatografie van cytosol

De chromatografie van een cytosol bereid uit met ^{59}Fe , ^{125}I -transferrine geïncubeerde reticulocyten bij 37°C over een Sephadex G-100 kolom resulteerde in een chromatogram met vier radioactief gemerkte fracties (fig. 8a). Deze vier fracties zijn eerder door Van der Heul (8) beschreven en bestaan respectievelijk uit de ^{59}Fe -bevattende void volume fractie, de transferrine-bevattende fractie, een hemoglobine-bevattende fractie en een ^{59}Fe -gemerkte laagmoleculaire fractie. Indien de cytosol bereid werd uit reticulocyten, welke voorgeïncubeerd zijn geweest met monensine voordat de incubatie met ^{59}Fe , ^{125}I -transferrine plaatsvond, werd het elutiepatroon, zoals dat weergegeven is in figuur 8b verkregen.

De hoeveelheid ^{125}I -transferrine in de cytosol was gelijk aan de hoeveelheid transferrine in de cytosol van reticulocyten uit controle-experimenten en varieerde tussen de 8 en 15% van de totale hoeveelheid ^{125}I -transferrine die aan de reticulocyten gebonden was. In aanwezigheid van monensine was echter de ^{59}Fe -aktiviteit in de hemoglobine-bevattende fractie veel lager als gevolg van de verminderde ijzeropname.

Discussie

De resultaten vermeld in het vorige hoofdstuk leidden tot de conclusie dat er een tweede mechanisme van ijzerafsplitsing van transferrine mogelijk is naast de ijzerafsplitsing in zure vacuolen.

Door gebruik te maken van het carboxylzure ionofoor monensine werd getracht deze theorie verder te ontwikkelen en het tweede proces te localiseren. Het blijkt dat monensine een concentratie-afhankelijke remming van de ijzeropname bewerkstelligt zonder daarbij noemenswaardig de transferrinebinding te beïnvloeden; hetzelfde effect werd waargenomen voor methylamine. Echter monensine veroorzaakt evenals chloroquine (9) vrijwel

direkt een volledige remming van de ijzerafsplitsing van transferrine terwijl methylamine geen volledige remming van de ijzerafsplitsing veroorzaakt.

Chloroquine heeft effect op de celmembraan en verhoogt de intracellulaire pH, ook van methylamine is bekend dat het de intracellulaire pH verhoogt.

Dit houdt in dat de remming van de ijzeropname waarschijnlijk niet alleen veroorzaakt kan worden door een pH-verhoging in Gelfiltratie-experimenten met cytosolen laten zien dat de hoeveelheid intracellulair transferrine niet beïnvloed wordt door monensine en dezelfde is als in controle-experimenten. Deze waarnemingen suggereren dat het direkte effect op de ijzeropname bewerkstelligd wordt door monensine wat buiten de cel aanwezig is. De experimenten met intra- en extracellulair monensine bevestigen dat naast intracellulair monensine, monensine wat aan de buitenzijde van de cellen gelocaliseerd is, inderdaad in staat is om een remmend effect op de ijzeropname te bewerkstelligen.

Het remmend effect op de ijzeropname is het meest duidelijk indien monensine aanwezig is aan beide zijden van de celmembraan. Het remmend effect van monensine, aanwezig buiten de cel, ondersteunt de veronderstelling dat naast intracellulaire ijzerafsplitsing van transferrine, reticulocyten een tweede mechanisme tot hun beschikking hebben om ijzer van transferrine af te splitsen wat aan de plasmamembraan gelocaliseerd is. De reïncubatie-experimenten met gemerkte reticulocyten en ongemerkt transferrine ondersteunen deze veronderstelling. Indien reticulocyten geïncubeerd worden met ^{59}Fe , ^{125}I -transferrine bij 37°C , een temperatuur waarbij naast receptorbinding ook endocytose van gebonden transferrine plaatsvindt, en de afgifte van dit celgebonden transferrine wordt gemeten tijdens de reïncubatie met ongemerkt transferrine, dan wordt er onmiddellijk ^{125}I -transferrine afgegeven, terwijl het meeste ^{59}Fe celgebonden blijft. Indien de afgifte van dit celgebonden ^{59}Fe , ^{125}I -transferrine gemeten wordt in de aanwezigheid van monensine blijkt de ^{125}I -transferrine af-

gifte niet significant te verschillen van de controle-celsuspensie, hoewel de snelheid van afgifte verminderd is. Dit wordt waarschijnlijk veroorzaakt door het feit dat monensine het recyclingsproces remt zoals gevonden is door Basu et al. (5) voor low density lipoproteïne. Echter in aanwezigheid van monensine is de hoeveelheid door reticulocyten afgegeven ^{59}Fe significant toegenomen ten opzichte van de hoeveelheid ^{59}Fe afgegeven door een controle-suspensie.

De afgifte van ^{59}Fe van membraanreceptor-gebonden transferrine zal worden geremd door monensine wat buiten de cel aanwezig is en dit ijzer verlaat de cel met ^{125}I -transferrine tijdens de reïncubatie.

Eveneens zal het proces van ijzerafsplitsing van ^{59}Fe , ^{125}I -transferrine wat geëndocyteerd is, geremd gaan worden nadat de intracellulaire pH onder invloed van monensine is gestegen.

Rao et al. (1983) (10) vinden eveneens dat er geen ijzerafsplitsing van transferrine plaatsvindt na 1 uur incubatie bij 37°C van ^{59}Fe , ^{125}I -transferrine met erytroleukemia (K562) cellen en monensine. Indien reticulocyten geïncubeerd worden met ^{59}Fe , ^{125}I -transferrine bij 4°C kan er alleen receptor-binding plaatsvinden. Wanneer deze cellen daarna overgebracht worden naar een incubatiemedium van 37°C en de afgifte wordt gemeten dan wordt er ogenblikkelijk ^{125}I -transferrine afgegeven. Dit resultaat is in tegenspraak met resultaten gevonden door Karin en Mintz (1981) (7) met muizen teratocarcinoma stamcellen. Zij vonden een 'lag'-fase van 6-7 minuten voordat afgifte van transferrine waargenomen werd. Hun interpretatie dat membraangebonden transferrine geëndocyteerd moet worden voordat ijzerafsplitsing van transferrine kan plaatsvinden, geldt niet voor alle celsystemen. Onze experimenten tonen aan dat reticulocyten geen 'lag'-fase hebben bij de afgifte van transferrine, maar reeds 15 seconden na reïncubatie transferrine afgeven. Hierdoor is het waarschijnlijk dat dissociatie van transferrine van de plasmamembraan-receptor kan plaatsvinden zonder voorafgaande endocytose. Ogenblikkelijk na reïncubatie neemt de afgifte van ^{59}Fe nauwelijks af (figuur

6). Dit proces van ijzerafgifte van plasmamembraan-gebonden transferrine kan volledig geremd worden door monensine aanwezig buiten de cellen.

In tegenstelling tot celgebonden transferrine is in de situatie met membraan-gebonden transferrine de remming volledig en blijft de $^{125}\text{I}/^{59}\text{Fe}$ verhouding gelijk aan de verhouding van de celsuspensie voor reïncubatie wat betekent dat ^{59}Fe gebonden aan ^{125}I -transferrine de cel verlaat.

De complete remming van de ijzeropname kan verklaard worden door het feit dat in tegenstelling tot een suspensie van celgebonden transferrine (voorgeïncubeerd bij 37°C) een celsuspensie van membraangebonden transferrine (voorgeïncubeerd bij 4°C) geen intracellulair ^{59}Fe , ^{125}I -transferrine bevat waarbij ijzer afgesplitst wordt in zure vesicles zolang monensine intracellulair nog niet volledig werkzaam is.

Op basis van deze waarnemingen veronderstellen wij dat bij het ijzeropnameproces door erytroïde cellen twee mechanismen betrokken zijn; één mechanisme is de afsplitsing van ijzer van geëndocyteerd transferrine in zure vesicles, het andere mechanisme is gelocaliseerd aan de plasmamembraan en zorgt voor ijzerafgifte van membraanreceptor-gebonden transferrine zonder dat daarbij endocytose plaatsvindt.

Dit model combineert de hypothese van Jandl en Katz en die van Morgan en vormt een verklaring voor het feit dat er experimentele gegevens zijn gevonden die één van beide hypothesen ondersteunen. Het tweede mechanisme komt mogelijk alleen tot uitdrukking in cellen die hemoglobine synthetiseren, omdat deze cellen veel meer ijzer nodig hebben in vergelijking tot cellen die geen heem synthetiseren.

Er wordt aangenomen dat bij het eerste mechanisme van de ijzeropname transferrine de cel binnenkomt via endocytose van het transferrine-receptorcomplex. Twee waarnemingen in de huidige studie ondersteunen dit idee niet. In de eerste plaats tonen gelfiltratie-experimenten aan dat alleen vrij transferrine en geen transferrine-gebonden aan het receptoreiwit aanwezig is in de cytosol. Bovendien valt er een afname van het

aantal beschikbare receptoren te verwachten indien de cellen voorgeïncubeerd worden met monensine. Monensine remt de receptorrecycling zoals is aangetoond door Basu et al. (5).

De huidige studie laat zien dat in reticulocyten het aantal beschikbare receptoren niet beïnvloed wordt door monensine wat erop duidde dat transferrine-receptoren niet intracellulair opgenomen worden tijdens de endocytose van transferrine. Beide waarnemingen tonen aan dat het transferrine-endocytoseproces nog nader onderzocht dient te worden.

LITERATUUR

1. JANDL, J.H. and KATZ, J.H. (1963). The plasma-to-cell cycle of transferrin. *J. Clin. Invest.* 42, 314-326.
2. MORGAN, E.H. and APPLETON, T.C. (1969). Autoradiographic localization of ^{125}I -labeled transferrin in rabbit reticulocytes. *Nature* 223, 1371-1372.
3. PRESMAN, B.C. (1976). Biological applications of ionophores. *Ann. Rev. Biochem.* 45, 501-530.
4. WILCOX, D.K., KITSON, R.P. and WIDNELL, C.C. (1982). Inhibition of pinocytosis in rat embryo fibroblasts treated with monensin. *J. Cell Biol.* 92, 859-864.
5. BASU, S.K., GOLDSTEIN, J.L., ANDERSON, R.G.W. and BROWN, M.S. (1981). Monensin interrupts the recycling of low density lipoprotein receptors in human fibroblasts. *Cell* 24, 493-502.
6. SCATCHARD, G. (1949). The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51, 660.
7. KARIN, M. and MINTZ, B. (1981). Receptor-mediated endocytosis of transferrin in developmentally totipotent mouse teratocarcinoma stem cells. *J. Biol. Chem.* 256, 3245-3252.
8. VAN DER HEUL, C., DE JEU-JASPARS, C.M.H., KROOS, M.J. and VAN EIJK, H.G. (1982). Intracellular iron transport in rat reticulocytes. In: *The Biochemistry and Physiology of Iron* (Ed.: SALTMAN, P and HEGENAUER, J.), pp. 189-191 Elsevier/North-Holland, Amsterdam.
9. COLE, E.S., NUNEZ, M.T. and GLASS, J. (1983). Detailed studies of the site of action on chloroquine inhibition of iron uptake into reticulocytes. In: *Structure and Function of Iron Storage and Transport Proteins* (Ed.: URUSHIZAKI, I., AISEN, Ph., LISTOWSKY, I. and DRYSDALE, J.W.), pp. 339-340, Elsevier/North-Holland, Amsterdam.
10. RAO, K., VAN RENSWOUDE, J., KEMPF, C. and KLAUSNER, R.D. (1983). Separation of Fe^{3+} from transferrin in endocytosis. *FEBS Lettes* 160, 213-216.

HOOFDSTUK 5

FLUORIMETRISCHE BEPALING VAN DE pH VAN DE TRANSFERRINE MICRO- OMGEVING TIJDENS DE IJZEROPNAME DOOR ERYTROIDE RATTENBEEN- MERGCELLEN

INLEIDING

Hoewel het mechanisme, waarmee ijzer door de voorlopers van de erythrocyt wordt opgenomen, nog niet volledig is opgehelderd, vindt de hypothese dat receptor gemedieerde endocytose van transferrine bij dit proces betrokken is, veel ondersteuning.

In cellen die geen hemoglobine synthetiseren, is aangetoond dat na endocytose van ferri-transferrine ijzer van het transporteiwit transferrine afgesplitst kan worden als gevolg van de lage pH in geëndocyteerde vesicles waarna apotransferrine door de cellen wordt afgegeven (mechanisme 2) (1).

De oorspronkelijke hypothese over de ijzeropname, geformuleerd door Jandl & Katz (2), volgens welke transferrine na binding aan de receptor op de plasmamembraan zijn ijzer afgeeft aan plasmamembraaneiwiitten (mechanisme 1), is nog niet volledig achterhaald. Het mechanisme van ijzerafsplitsing op deze plaats is onbekend en een pH verandering zou erbij betrokken kunnen zijn. Op grond van de experimenten beschreven in hoofdstuk 3 en 4 werd de konklusie getrokken dat een combinatie van beide hypothesen mogelijk is voor heem synthetiserende cellen, mede gezien het feit dat deze cellen veel ijzer nodig hebben in vergelijking met cellen die geen heem synthetiseren.

Een argument ter ondersteuning van een ander mechanisme van ijzerafsplitsing of ten minste een andere plaats van ijzerafsplitsing door erythroïde cellen naast receptor-gemedieerde endocytose van transferrine wordt gevormd door het resultaat van incubatie-experimenten van beenmergcellen met diferri

transferrine.

Uit analytische isoelektrische focusseringsstudies van het extracellulaire medium tijdens incubatie bleek namelijk dat niet alleen apotransferrine en diferri transferrine door de cel worden afgegeven zoals het geval is met niet-erytroïde cellen, maar eveneens de beide monovormen van transferrine met ijzer in het N_t - en C_t -gedeelte van transferrine.

Het is onwaarschijnlijk dat beide monovormen van transferrine ontstaan beneden een pH van zes gezien de instabiliteit van het ijzertransferrinecomplex bij lage pH waarden. Van Renswoude et al. (1) vonden een pH lager dan 5,5 in transferrine-bevattende vesicles in K562 cellen en mede op basis daarvan werd de konklusie getrokken dat er een tweede mechanisme voor de ijzeropname moet bestaan om het ontstaan van beide monovormen van transferrine te kunnen verklaren. Echter Maxfield et al. (3) vonden recent een pH van 6,5 voor de micro-omgeving van intracellulair transferrine in CHO-cellen. Bij deze pH kunnen alle vormen van transferrine die in het incubatiemedium verschijnen, afkomstig zijn uit geëndocyteerde vesicles en een tweede mechanisme of een andere plaats voor de ijzerafgifte anders dan de geëndocyteerde vesicle is niet noodzakelijk.

In dit hoofdstuk worden de resultaten beschreven van de pH bepalingen van de micro-omgeving van intracellulair transferrine in de voorlopers van de erytrocyt, die hemoglobine aanmaken en de invloed van het carboxylzure Na^+/H^+ ionofoor momentensine op deze pH van deze omgeving.

Daarnaast is nagegaan bij welke pH waarde de beide monovormen van transferrine in vitro instabiel zijn.

MATERIAAL EN METHODEN

Rattenbeenmergcellen en met ^{59}Fe en ^{125}I -gemerkt rattentransferrine en humaan transferrine werden verkregen op de in hoofdstuk 2 beschreven wijze.

De merking van transferrine met fluoresceïne isothiocyanaat (FITC)

Diferri transferrine werd opgelost in 0,6 ml 0,2 M natriumboraat buffer, pH 9,3. Twee mg FITC I (10% w/w op celite) (Calbiochem.) in 0,5 ml werd langzaam in 30 minuten toegevoegd aan de transferrine-oplossing onder continue roeren bij kamertemperatuur. Het reaktiemengsel werd onder voortdurend roeren bij 4°C 24 uur weggezet. De reactie werd gestopt door de FITC-celite deeltjes uit het reaktiemengsel te verwijderen door middel van centrifugatie gedurende 5 minuten bij maximale toeren in een Eppendorf centrifuge. Het transferrine FITC conjugaat werd daarna driemaal gedialyseerd tegen 1 liter 0,15 M NaCl-0,02 M Tris-HCl, pH 7,4, bij 4°C om al het ongebonden FITC te verwijderen.

De molaire verhouding van FITC/transferrine van het conjugaat werd vastgesteld met de methode beschreven door Jobbagy en Kiraly (1966) (4).

Onder de gebruikte omstandigheden bevat het conjugaat gemiddeld 4,5 mol FITC per mol transferrine.

Incubatie-experimenten

De ijzeropname van ^{59}Fe Tf en ^{59}Fe Tf-FITC werden met elkaar vergeleken door incubatie-experimenten uit te voeren met rattenbeenmergcellen op de in hoofdstuk 2 beschreven wijze.

Voor fluorescentiemetingen werden rattenbeenmergcellen geïncubeerd met 1 nmol FITC-Tf gedurende 45 minuten bij 37°C of 4°C. De cellen werden na wassen geresuspendeerd in een fosfaat gebufferde zoutoplossing (PBS) van verschillende pH's tot een celconcentratie van $8 \cdot 10^6$ cellen per ml, waarna direkt de fluorescentie excitatie ratio 495/450 werd gemeten.

De PBS bevatte 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH_2PO_4 , 8,0 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,9 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 0,5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. De PBS werd op de gewenste pH-waarde gebracht met behulp van KOH of HCl. Na de fluorescentiemeting werd de pH van de celsuspensie direkt gecontroleerd.

Controle-incubaties werden uitgevoerd met FITC-gemerkt albumine (Calbiochem.) bij 37°C gedurende 45 minuten.

Fluorescentiemeting

De celsuspensies werden overgebracht in een cuvet met een lichtweg van 1 cm en geplaatst in een Perkin-Elmer 3000 fluorescentie spectrometer. De fluorescentie emissie intensiteit bij 520 nm werd gemeten bij een excitatie golflengte van 495 nm en 450 nm met een emissie- en excitatie-spleetbreedte van 10 nm. Het emissiesignaal werd gedurende 4 seconden geïntegreerd met een signaalintegrator. De metingen werden verricht bij kamertemperatuur.

Na de meting werd het carboxylzure ionofoor monensine, opgelost in ethanol, aan de celsuspensie toegevoegd tot een eindconcentratie van 2 μ M en werden wederom de genoemde signalen gemeten totdat ze constant bleven.

IJkcurves van FITC-Tf in PBS van verschillende pH's in aan- en afwezigheid van rattenbeenmergcellen werden op dezelfde manier opgenomen.

Natriumbepaling in erytroïde cellen

Rattenerytrocyten werden driemaal gewassen in 0,25 M sucrose waarbij de "buffy coat" verwijderd werd.

Een gedeelte van de cellen werd daarna gelyseerd in aqua dest met 0,5% w/w Triton-X-100, de verhouding cellen : buffer was 1 op 1.

Een ander gedeelte van de cellen werd in dezelfde verhouding geresuspendeerd in 300 milliosmolair PBS.

De hematocrietwaarde van deze suspensie werd in een microhematocriet centrifuge bepaald door centrifugatie gedurende 5 minuten bij maximale toeren.

De natriumconcentratie in het verkregen lysaat werd gemeten met een vlamfotometer (Instrumentation Lab., Italië). Een blanco bepaling van 0,5% w/w Triton-X-100 in aqua dest werd meegenomen ter controle.

In vitro ijzerafgifte van diferri transferrine bij verschillende pH-waarden

De stabiliteit van het ijzertransferrine complex in vitro bij verschillende pH-waarden werd onderzocht onder dezelfde omstandigheden als in incubatiestudies met reticulocyten (hoofdstuk 3). Het incubatiemedium bestond uit 0,01 M Hepes, 0,13 M NaCl, 5 mM KCl, 0,74 mM MgCl₂ aangevuld met 1,26 mM CaCl₂. Het incubatiemedium werd voor de toevoeging van CaCl₂ en MgCl₂ behandeld met Chelex 100 om het ongebonden ijzer te verwijderen. De oplossingen werden op de gewenste pH gebracht met 0,01 M HCl of 0,01 M NaOH. De humane diferri transferrine concentratie in het incubatiemedium bedroeg 12,5 μ M. Het gebruikte glaswerk werd ijzervrij gemaakt via een wasprocedure met bichroomaat-zwavelzuur en aqua dest. Incubaties werden uitgevoerd gedurende twee uur bij 37°C in een schudwaterbad waarna 5 μ l monster van het incubatiemedium isoelektrisch gefocuseerd werd op een analytische gel zoals in hoofdstuk 2 beschreven is.

RESULTATEN

Fluorescentie karakteristiek van FITC-transferrine

De fluorescentie-intensiteit van fluoresceïne is uitermate gevoelig voor verandering van de pH. Fluoresceïne gemerkte macromoleculen kunnen daarom gebruikt worden om de pH van specifieke intracellulaire ruimten te meten (5).

In figuur 1 wordt het verband tussen de pH en de fluorescentie excitatie ratio 495/450 weergegeven. Wanneer rattenbeenmergcellen aan de FITC-transferrine-oplossing in de cuvet worden toegevoegd bij 4°C, een temperatuur waarbij transferrine alleen aan de plasmamembraanreceptor wordt gebonden, wordt de fluorescentie excitatie ratio verlaagd.

Het effect van FITC op de ijzeropname door rattenbeenmergcellen

Om na te kunnen gaan of de koppeling van FITC aan transferrine

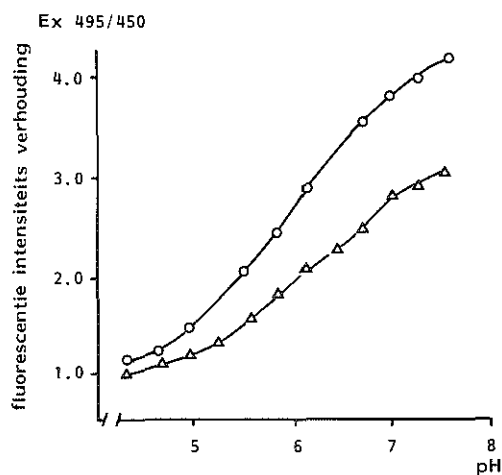


Fig. 1. Het verband tussen de pH en de fluorescentie excitatie ratio 495/450 van FITC-transferrine in afwezigheid (O-O) en aanwezigheid (Δ-Δ) van rattenbeenmergcellen zonder voorafgaande incubatie.

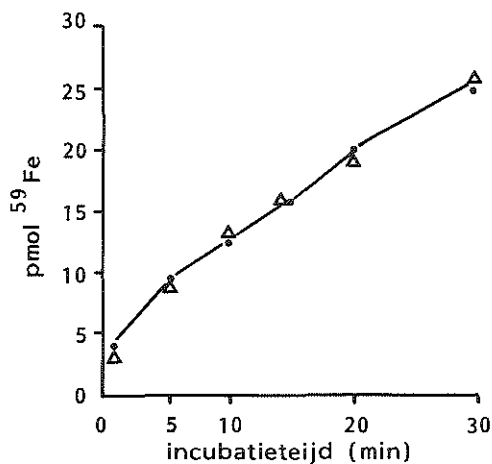


Fig. 2. De opname van ijzer door rattenbeenmergcellen geïncubeerd bij 37°C met een oplossing van FITC-Tf of Tf. (Δ-Δ) ⁵⁹Fe Tf, (●-●) ⁵⁹Fe FITC-Tf.

de ijzeropname door rattenbeenmergcellen beïnvloedt, werd de ijzeropname van ^{59}Fe transferrine-FITC vergeleken met ^{59}Fe transferrine.

Uit figuur 2 blijkt dat FITC geen invloed heeft op de ijzeropname.

De localisatie van transferrine na incubatie met rattenbeenmergcellen bij 37°C

Na incubatie bij 37°C wordt de te meten fluorescentie excitatie ratio bepaald door de ratio van plasmamembraan gebonden FITC-Tf en geëndocyteerd FITC-Tf (figuur 3a).

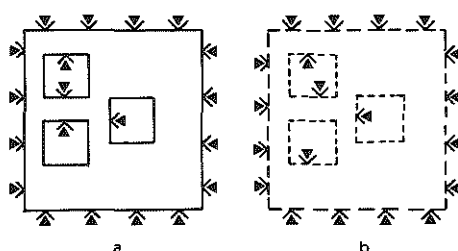


Fig. 3. Schematische weergave van het FITC-Tf receptorcomplex aan/in de cel na incubatie met FITC-Tf bij 37°C .

- a - geen monensine toegevoegd.
- b - monensine toegevoegd.
- ▲ FITC-Tf receptorcomplex.
- membraan.
- H^+ - en Na^+ -ionen doorlaatbare membraan.

De gemeten ratio na incubatie van cellen met FITC-Tf bij 37°C , te weten 1,6, was significant lager dan de ratio van uitsluitend plasmamembraan gebonden FITC-transferrine, namelijk 2,1. Dit duidt erop dat geëndocyteerd FITC-transferrine aanwezig is in een micro-omgeving met een lagere pH dan buiten de cel aanwezig is. Een lage pH veroorzaakt namelijk een lagere fluorescentie excitatie ratio, waardoor de resulterende fluorescentie excitatie ratio afgenomen is.

Dit effect werd nader onderzocht door FITC-Tf gemerkte cellen te incuberen met monensine, een Na^+/H^+ -uitwisselaar wat intra-

en extracellulaire pH verschillen kan veranderen (figuur 3b). Toevoeging van monensine aan een celsuspensie, gesuspendeerd in PBS van pH 7,3 heeft tot gevolg dat er gedurende de eerste drie minuten een toename van het fluorescentie signaal wordt waargenomen (figuur 4).

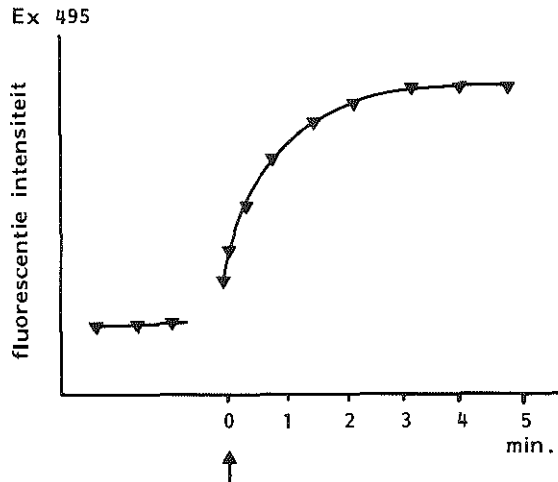


Fig. 4. Het effect van toevoeging van monensine (Mo) in de tijd aan een met FITC-Tf geïncubeerde celsuspensie bij 37°C op de absolute fluorescentie bij 495 nm.
 ↑ Mo toegevoegd.

Monensine heeft waarschijnlijk drie minuten nodig om een evenwicht te bewerkstelligen tussen de intra- en extracellulaire H^+ -ionenconcentratie. Na deze toename bleef het fluorescentie signaal stabiel, evenals de excitatie ratio.

Het toenemend effect op de totale fluorescentie excitatie ratio door monensine bevestigt het resultaat van het voorgaande experiment waaruit de konklusie getrokken werd dat na incubatie met erytroïde cellen bij 37°C een gedeelte van de transferrine aanwezig is in een micro-omgeving met een pH beneden 7,3.

pH-Bepaling van de micro-omgeving van intracellulair transferrine

Direkte pH-bepalingen van de micro-omgeving van intracellulair transferrine met behulp van de FITC-transferrine ijkcurve zijn niet mogelijk omdat de fluorescentie excitatie ratio's van plasmamembraan gebonden transferrine en intracellulair transferrine niet onafhankelijk van elkaar te meten zijn.

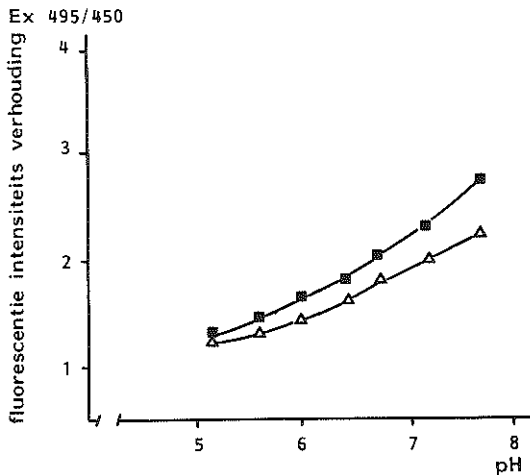


Fig. 5. Het effect van monensine op de fluorescentie excitatie ratio 495/450 van bij 37°C met FITC-Tf geïncubeerde cellen, geresuspendeerd in PBS van verschillende pH's.
(—Δ—Δ)— zonder monensine.
(—■—■)— met monensine.

Een indirecte methode voor de pH-bepaling werd ontworpen met behulp van monensine. Monensine werd toegevoegd aan de met FITC-Tf geïncubeerde beenmergcellen die na incubatie geresuspendeerd waren in PBS van verschillende pH's.

De toename van de resulterende fluorescentie excitatie ratio na toevoeging van monensine vermindert wanneer de pH van het

extracellulaire medium lager wordt en is verwaarloosbaar in het pH gebied rond vijf zoals uit figuur 5 blijkt.

Om nauwkeuriger de extracellulaire pH vast te stellen waarbij monensine geen effect meer heeft op de uiteindelijke fluorescentie excitatie ratio werd er speciale aandacht besteed aan het pH gebied tussen 5 en 6. Uit tabel I kan worden afgeleid dat bij een extracellulaire pH van 5 monensine geen invloed meer heeft op de uiteindelijke fluorescentie excitatie ratio.

TABEL I De toename van de fluorescentie excitatie ratio 495/450 bij verschillende extracellulaire pH-waarden na toevoeging van monensine, eindconcentratie 2 μ M

pH	ratio 495/450	pH	ratio 495/450
7,00	0,30	5,61	0,12
6,16	0,19	5,36	0,08
6,08	0,17	5,22	0,06
5,98	0,14	5,12	0,03
5,72	0,13	5,00	0,00

Controle-experimenten bij 37°C met FITC-albumine wat niet geëndocyteerd, maar wel gebonden wordt door erythroïde cellen (9), tonen aan dat monensine zelf geen invloed heeft op de fluorescentie excitatie ratio 495/450 (figuur 6).

Hetzelfde resultaat als is weergegeven in figuur 6 is gevonden in incubatie-experimenten van beenmergcellen met FITC gemerkt transferrine bij 4°C.

Het verschil in fysisch-chemische eigenschappen van de celmembraan bij 4°C en 37°C is dus niet van invloed op het waargenomen effect van monensine.

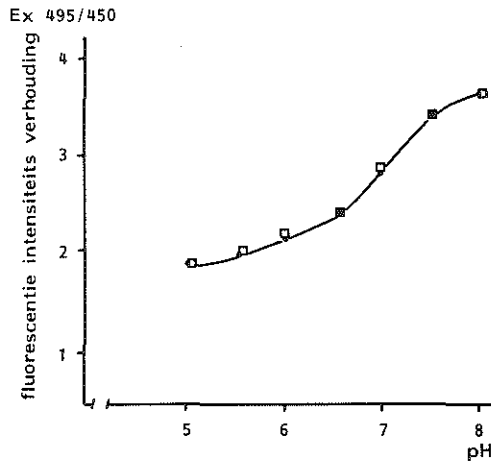


Fig. 6. Het effect van monensine op de fluorescentie excitatie ratio 495/450 van bij 37°C met FITC-albumine geïncubeerde cellen.
 (—●—●—) - zonder monensine.
 (—□—□—) - met monensine.

Natriumbepaling in erythroïde cellen

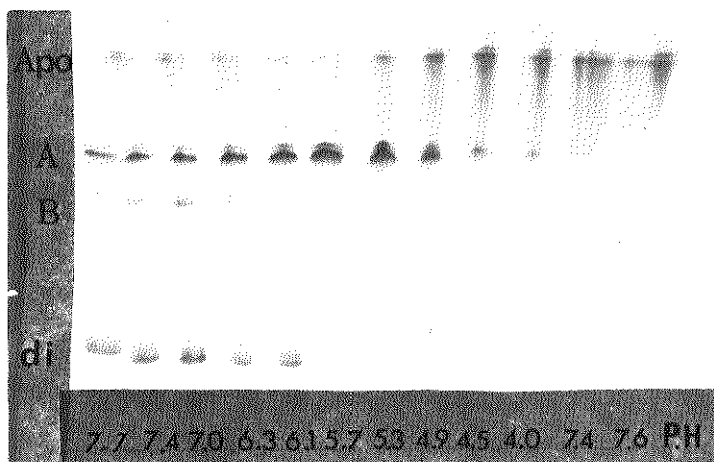
Het erythrocytenlysaat bevatte 6,1 mmol/l natrium. In de 0,5% w/w Triton-X-100 oplossing kon geen natrium gedetecteerd worden.

Het erythrocytenlysaat was afkomstig van een celsuspensie met een hematocrietwaarde van 21%. Dit betekent dat de concentratie natrium 29 millimolair is in het celvolume.

In vitro ijzerafgifte van diferri transferrine bij verschillende pH-waarden

Het bestaan van de vier vormen van transferrine, te weten Tf(Fe)₂, TfFe(A), TfFe(B) en apoTf, bij verschillende pH-waarden werd onderzocht met behulp van analytische isoelektrische focusering.

Figuur 7 toont het isoelektrische focuseringspatroon van de transferrinen bij verschillende pH-waarden.



Figuur 7: Analytische isoelektrische focusering van transferrinepreparaten na 2 uur incubatie bij 37°C in vitro in een medium met verschillende pH's. Het uitgangsmateriaal Tf.2Fe (geheel links) was niet geheel homogeen, doch enigszins verontreinigd met apo- en monoferri transferrine.

Uit de figuur blijkt dat beneden een pH van 6,0 de zuurlabiele monovorm van transferrine, TfFe(B), niet meer bestaat.

Er wordt door apotransferrine geen ijzer vanuit de omgeving opgenomen tijdens de incubatie bij pH 7,4-7,6 en de analyseprocedure.

DISCUSSIE

Na incubatie van onuitgerijpte rode bloedcellen, afkomstig van verschillende diersoorten met diferri transferrine wordt er niet alleen apotransferrine in het incubatiemedium teruggevonden, maar eveneens beide monovormen van transferrine (6, 7). Uit in vitro incubatiestudies van diferri transferrine zonder cellen blijkt dat in het pH gebied beneden 6,0 de zuurlabiele

monovorm van transferrine TfFe(B), niet meer kan bestaan. Indien endocytose van transferrine en ijzerafsplitsing in zure vacuolen door een lage pH de enige wijze van ijzeropname door erytroïde cellen is, dan betekent dit dat de pH van de micro-omgeving van intracellulair transferrine in deze cellen hoger dan 6,0 moet zijn.

In twee celtypen is de pH van de transferrine micro-omgeving gemeten wat resulteerde in verschillende pH-waarden.

Van Renswoude et al. vond een waarde lager dan 5,5 in zure niet-lysosomale vacuolen van cellen uit de cellijn K562, terwijl Maxfield et al. een pH-waarde van 6,5 vonden voor de micro-omgeving van transferrine in CHO-cellen.

In dit hoofdstuk worden de resultaten van de pH-bepaling van de micro-omgeving van transferrine beschreven met gebruikmaking van FITC-transferrine.

De fluorescentie excitatie ratio 495/450 is onafhankelijk van de FITC-Tf concentratie en de temperatuur, en verdient daarom de voorkeur voor pH-calibratie boven de absolute fluorescentie intensiteit bij 495 nm. De aanwezigheid van erytroïde cellen heeft een variabele verlaging van het signaal tot gevolg, waarschijnlijk veroorzaakt door autofluorescentie en lichtverstrooiing. Dit betekent dat in het geval van erytroïde cellen directe pH-bepalingen met FITC-transferrine als standaardcurve onmogelijk zijn.

Bovendien kon Van Renswoude et al. alleen een indicatie geven van de intracellulaire pH, omdat de uiteindelijke excitatie ratio bestaat uit de resultante van de excitatie ratio van intracellulair FITC-Tf en extracellulair plasmamembraan gebonden FITC-Tf. Er werd daarom een procedure ontwikkeld om de pH van de intracellulaire micro-omgeving nauwkeuriger te meten door gebruik te maken van het ionofoor monensine. Monensine is in staat om pH-gradiënten over membranen te veranderen door uitwisseling van waterstof-ionen tegen natrium ionen.

Door de extracellulaire H^+ -ionenconcentratie te variëren, is het mogelijk de pH-waarde vast te stellen, waarbij monensine de uiteindelijke excitatie ratio niet meer beïnvloedt, omdat

er evenwicht is tussen de extracellulaire H^+ -ionenconcentratie en de H^+ -ionenconcentratie van de micro-omgeving van intracellulair transferrine.

Deze pH-waarde is niet de pH van de micro-omgeving van transferrine, omdat de natrium-ionenconcentratie $[Na^+]$ in de intra- en extracellulaire omgeving van transferrine in rekening gebracht moet worden.

Monensine bewerkstelligt een evenwicht tussen de intra- en extracellulaire H^+ -ionenconcentratie volgens de vergelijking:

$$\frac{[H^+]_{intracell}}{[H^+]_{extracell}} = \frac{[Na^+]_{intracell}}{[Na^+]_{extracell}} \quad (\text{Moolenaar et al., 1984})$$

De natrium-ionenconcentratie $[Na^+]$ van het extracellulaire medium is 153 mM, maar de natrium-ionenconcentratie van de intracellulaire micro-omgeving van transferrine is niet bekend.

Een benadering van de natrium-ionenconcentratie in de transferrine micro-omgeving vormt de cellulaire concentratie van natrium. Deze bedroeg in rattenerijtrocyten 29 mmol/l. Indien deze waarde wordt toegepast, betekent dit dat volgens de formule, gegeven door Moolenaar een intracellulaire pH berekend kan worden van 5,7 voor de micro-omgeving van transferrine.

De in dit hoofdstuk beschreven resultaten ondersteunen de hypothese dat na receptorbinding van transferrine aan de plasmamembraan tenminste een gedeelte van de transferrine getransporteerd wordt naar zure vacuolen, waarschijnlijk endosomen, waar het ijzer afgegeven wordt (mechanisme 2).

Indien dit echter de enige weg is waarlangs ijzer door de erythroïde cellen wordt opgenomen zou er naast apo-Tf alleen mono-TfFe(A) in het incubatiemedium te verwachten zijn. De zuur labiele monovorm van Tf, TfFe(B) kan n.l. niet bestaan bij een pH van 5,7.

Er wordt echter ook mono-TfFe(B) in het incubatiemedium teruggevonden (6, 7). Deze resultaten vormen een indirecte onder-

steuning voor het bestaan van nog een ander mechanisme, aangeduid als mechanisme 1. De mate waarin beide mechanismen betrokken zijn bij het ijzeropnameproces door erytroïde cellen is evenwel op basis van deze experimenten niet vast te stellen en blijft vooralsnog een open vraag.

De fluorescentiemetingen werden uitgevoerd in het Hubrecht Laboratorium te Utrecht.

Dr. W.H. Moolenaar wordt hartelijk bedankt voor steun en medewerking.

LITERATUUR

1. VAN RENSWOUDE, J., BRIDGES, K.R., HARFORD, J.B. and KLAUSNER, R.D. (1982). Receptor-mediated endocytosis of transferrin and the uptake of Fe in K562-cells: Identification of a non-lysosomal acidic compartment.
2. JANDL, J.H. and KATZ, J.H. (1963). The plasma-to-cell cycle of transferrin. *J. Clin. Invest.* 42, 314-326.
3. MAXFIELD, F.R., FLUSS, S.R., TYCKO, B., and YAMSHIRO, D.J. (1983). Transferrin passes through a mildly acidic part of the golgi complex in CHO cells. *J. Cell Biol.* 97 (5), 958.
4. JOBBAGY, A. and KIRALY, K. (1966). Chemical characterization of fluorescein isothiocyanate-protein conjugates. *Biochim. Biophys. Acta* 124, 166-175.
5. OHKUMA, S. and POOLE, B. (1978). Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 3327-3331.
6. YOUNG, S.P. (1982). Evidence for the functional equivalence of the iron-binding sites of rat transferrin. *Biochim. Biophys. Acta* 718, 35-41.
7. LOH, T.T. (1982). Studies on the focus of iron transferrin released from rabbit reticulocytes. *Life Sciences* 32, 915-920.
8. MOOLENAAAR, W.H., TERTOOLEN, L.G.J. and DE LAAT, S.W. (1984). The regulation of cytoplasmic pH in human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 259, 7563-7569.
9. HEMMAPLARDH, D. and MORGAN, E.H. (1976). Transferrin uptake and release by reticulocytes treated with proteolytic enzymes and neuraminidase. *Biochim. Biophys. Acta* 426, 385-398.

ALGEMENE DISCUSSIE

IJzer speelt een belangrijke rol in vele levensprocessen, onder meer bij het transport van zuurstof door hemoglobine.

In het bloed wordt ijzer gebonden door een β -globuline, transferrine. Dit ijzerbindende molecuul is noodzakelijk om Fe(III)-ionen in complexe vorm oplosbaar te houden en beschikbaar te stellen voor resorptie, transport en opname door hemoglobine synthetiserende cellen onder omstandigheden zoals die in bloed en beenmerg heersen.

De erytroïde cellen nemen voor de hemoglobinesynthese uitsluitend aan transferrine gebonden ijzer op via op de celmembraan gelegen transferrine receptoren.

Over de plaats en het mechanisme van ijzerafgifte door het plasma-eiwit transferrine aan erytroïde cellen zijn twee hypothesen in omloop. Volgens Jandl en Katz (1) wordt ijzer van transferrine aan de celmembraan afgesplitst en afgegeven aan membraancomponenten. De andere mogelijkheid, geformuleerd door Morgan (2), is dat na binding van ijzertransferrine aan de receptor transferrine geëndocyteerd wordt door de cel waarna ijzerafsplitsing van transferrine plaatsvindt in lysosomen als gevolg van de lage pH. Het afgesplitste ijzer wordt daarna in beide gevallen via een drager naar de mitochondriën getransporteerd.

Uitgaande van de hypothese van Morgan is nagegaan of lysosomen daadwerkelijk een rol vervullen in het ijzeropnameproces door reticulocyten. Na afgifte van ijzer wordt apotransferrine, n.l. intact door de cel afgegeven, terwijl verwacht mag worden dat de ligand afgebroken wordt in de lysosomen.

Dit onderzoek had tot resultaat dat er in de reticulocyt nauwelijks klassieke lysosomen volgens de definitie van De Duve (3) aantoonbaar zijn. Erythrocyten bevatten geen celorganellen meer en kennelijk zijn de lysosomen in het reticulocyten stadium van het rijpingsproces van erytroïde cellen

reeds nagenoeg verdwenen.

Aangezien reticulocyten nog veel ijzer opnemen, zijn mogelijk andere celstructuren betrokken bij de ijzeropname.

Elektronen-microscopische opnamen van reticulocyten toonden vacuolen aan welke eiwit bevatten. Deze celstructuren zouden de rol, die aan lysosomen toebedeeld was, kunnen vervullen. Deze veronderstelling werd ondersteund door op dat moment in de literatuur verschenen werk van Van Renswoude et al. (3) die in humane erytroleukemia K562 cellen de betrokkenheid van zure vacuolen van niet-lysosomale oorsprong aantoonde bij de afsplitsing van ijzer van transferrine.

De pH van de intracellulaire micro-omgeving van transferrine in erytroïde cellen werd daarom gemeten. De fluorescentie intensiteit van met fluoresceïne gemerkt transferrine is uitermate gevoelig voor verandering van de pH.

Met deze methode is op indirecte wijze door gebruikmaking van het ionofoor monensine een pH waarde van 5,7 vastgesteld voor de micro-omgeving van intracellulair transferrine.

De gevonden pH-waarde representeert waarschijnlijk de pH in de vacuolen, ook wel vesicles of endosomen genoemd. Dit is echter niet definitief bewezen, omdat wij geen endosomen uit erytroïde cellen geïsoleerd hebben met daarin het fluoresceïne gemerkt transferrine.

Recent werk van Harding (4) en Dickson (5) bevestigen echter onze konklusie dat na endocytose van transferrine ijzerafsplitsing van transferrine plaatsvindt in zure vacuolen. Het ontstaan van het zure milieu in de vesicles kan met het algemene endocytosemodel verklaard worden. Vesicles ontstaan door insnoering van de plasmamembraan, waarbij het transferrinemoleculen in zich opneemt (6). Deze vesicles worden daarna spoedig zuur door de werking van een ATP afhankelijke protonenpomp die in de vesicle membraan is opgenomen vanuit de plasmamembraan tijdens de endocytose (7).

Dit model verklaart echter gedeeltelijk de ijzeropname door erytroïde cellen. Indien erytroïde cellen n.l. geïncubueerd worden met diferri transferrine ontstaan er in het incubatie-

medium naast apotransferrine ook de beide monovormen van transferrine, TfFe(A) en TfFe(B). Uit in vitro experimenten zonder cellen blijkt dat de zuurlabiele monovorm van transferrine TfFe(B) niet kan bestaan beneden een pH van 6,0. Deze resultaten vormen een indirecte aanwijzing voor het bestaan van een tweede mechanisme van ijzeropname door erytroïde cellen. Dit werd nader onderzocht met behulp van het proton ionofoor monensine. Uit de experimenten beschreven in hoofdstuk 4 zijn een aantal argumenten naar voren gekomen die het bestaan van een tweede mechanisme of tenminste een andere plaats van ijzerafsplitsing anders dan de zure vacuolen rechtvaardigen. Deze experimenten vormen tezamen met het feit, dat er in het verleden door Van der Heul et al. (8) een uitsluitend ^{59}Fe houdende plasmamembraancomponent is geïsoleerd, een aanwijzing dat dit proces aan de celmembraan is gelokaliseerd.

Het bestaan van twee mechanismen voor de ijzeropname combineert de hypothese van Jandl & Katz en van Morgan en verklaart eveneens waarom er vele experimentele gegevens gevonden zijn die één van beide hypothesen ondersteunen. Het tweede mechanisme komt mogelijk alleen tot uitdrukking in hemoglobine synthetiserende cellen, omdat deze veel ijzer nodig hebben in vergelijking tot cellen die geen heem synthetiseren. Welk mechanisme het belangrijkste is bij het ijzeropnameproces door erytroïde cellen blijft echter onduidelijk.

LITERATUUR

1. JANDL, J.H. and KATZ, J.H. (1963). The plasma-to-cell cycle of transferrin. *J. Clin. Invest.* 42, 314-426.
2. MORGAN, E.H. and APPLETON, T.C. (1969). Autoradiographic localization of ^{125}I labeled transferrin in rabbit reticulocytes. *Nature* 223, 1371-1372.
3. DE DUVE, C. (1969). The lysosome in retrospect. In: *Lysosomes in Biology and Pathology*. (Eds.: DINGLE, J.T. and FELLS, H.B.) Elsevier, Amsterdam, Vol. 1, p. 3.
4. HARDING, C., HAUSER, J. and STAHL, P. (1983). Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in reticulocytes. *J. Cell Biol.* 97, 329-339.
5. DICKSON, R.B., HANNOVER, J.A., WILLINGHAM, M.C. and PASTAN, I. (1983). Prelysosomal divergence of transferrin and epidermal growth factor during receptor-mediated endocytosis. *Biochem.* 22, 5667-5674.
6. GOLDENTHAL, K.L., PASTAN, I. and WILLINHAM, M.C. (1984). Initial steps in receptor-mediated endocytosis. *Exp. Cell Res.* 152, 558-564.
7. GALLOWAY, C.J., DEAN, G.E., MARSH, M., RUNDNICK, G. and MELLMAN, I. (1983). Acidification of macrophage and fibroblast endocytic vesicles in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 3334-3338.
8. VAN DER HEUL, C., KROOS, M.J., DE JEU-JASPARS, C.M.H. and VAN EIJK, H.G. (1980). The uptake of iron by reticulocytes. The influence of purification of the ghosts on iron containing components in the ghost suspension. *Biochim. Biophys. Acta* 601, 572-583.

SAMENVATTING

In dit proefschrift wordt een onderzoek beschreven dat tot doel heeft meer inzicht te krijgen in de processen die een rol spelen bij de ijzeropname door voorlopers van de erythrocyt.

Hoofdstuk 1 geeft een overzicht van de literatuur betreffende het proces van ijzeropname door erythroïde cellen. Hierbij is met name aandacht geschonken aan de plaats waar ijzer van transferrine wordt afgesplitst na binding van transferrine aan de membraan receptor.

Hoofdstuk 2 is gewijd aan de materialen en methoden die bij dit onderzoek doorlopend gebruikt zijn. Specifieke methodieken komen in de desbetreffende hoofdstukken aan de orde.

Hoofdstuk 3 behandelt de vraag of lysosomen direkt betrokken zijn in het ijzeropnameproces door reticulocyten.

Om een functionele rol van lysosomen in het ijzeropnameproces aan te tonen, is getracht lysosomen te isoleren na incubatie met ^{59}Fe . Echter met verschillende celfractioneringstechnieken die beschreven zijn voor levercellen konden geen zuivere lysosomen uit reticulocyten verkregen worden. Fluorescentie- en elektronen-microscopie, alsmede specifieke enzymactiviteitsmeting toonden aan dat reticulocyten nauwelijks nog klassieke lysosomen bevatten. Zure vacuolen in plaats van lysosomen zouden echter betrokken kunnen zijn bij de ijzeropname. De aanwezigheid van apoTf, monoferri TfFe(A) en monoferri TfFe(B) in het medium na incubatie van reticulocyten met diferri transferrine, in samenhang met het feit dat beide ijzerbindingsplaatsen van transferrine hun ijzer afsplitsen bij de pH aanwezig in zure vacuolen, doet vermoeden dat er een tweede mechanisme voor de ijzeropname door reticulocyten bestaat, waarbij zure vacuolen niet betrokken zijn.

In hoofdstuk 4 wordt de ijzeropname in aanwezigheid van monensine bestudeerd met als opzet de plaats te achterhalen waar ijzer van transferrine afsplitst.

Monensine veroorzaakt een concentratie-afhankelijke remming van de ijzeropname zonder de transferrine-opname te beïnvloeden. De experimentele resultaten wijzen erop dat er twee mechanismen betrokken zijn bij de ijzeropname: 1) ijzerafgifte van receptor-gebonden transferrine aan de plasmamembraan zonder intracellulaire opname van het transferrine receptor complex en 2) ijzerafgifte van geëndocyteerd transferrine in zure vesicles.

In hoofdstuk 5 worden de resultaten van experimenten beschreven die tot doel hadden het bestaan van twee mechanismen voor de ijzeropname te bevestigen.

De pH van de intracellulaire micro-omgeving van transferrine werd hiertoe bepaald met behulp van met fluoresceïne gemerkt transferrine. Het effect van monensine op de pH is eveneens vastgesteld. Intracellulair transferrine blijkt zich bij benadering in een micro-omgeving met een pH van 5,7 te bevinden. Monensine is in staat om de pH van de micro-omgeving van transferrine binnen enkele minuten te verhogen. Tevens is vastgesteld dat beneden een pH van 6,0 de zuurlabele monovorm van transferrine, TfFe(B), niet kan bestaan.

Deze resultaten vormen een bevestiging voor de aanwijzing dat ijzer wordt afgesplitst van transferrine in zure vacuolen en dat er ijzerafsplitsing van transferrine plaatsvindt op een andere plaats dan de zure vacuolen.

Tenslotte worden in hoofdstuk 6 alle experimentele resultaten tezamen in een breder verband geplaatst.

SUMMARY

The aim of the investigation described in this thesis is to improve our understanding of the processes which play a part in the iron uptake by erythroid cells.

In Chapter 1 a survey is given of the literature on the process of iron uptake by red cell precursors. The site of iron release from transferrin (Tf) after binding of transferrin to the membrane receptor is discussed in detail.

Chapter 2 is devoted to the materials and methods currently used in the course of this study. More specific methods are described in the chapters concerned.

Chapter 3 deals with the question whether lysosomes are directly involved in the iron uptake by reticulocytes.

In order to show a direct functional role of lysosomes in the process of iron uptake, we tried to isolate lysosomes from reticulocytes which had been incubated with $^{59}\text{FeTf}$. However, with various cell fractionating techniques described for liver cells, pure lysosomes could not be obtained from reticulocytes.

Fluorescence and electron microscopy as well as specific enzyme activity measurements showed that reticulocytes rarely contain well-defined lysosomes. Acid vacuoles instead of lysosomes could be involved in the iron uptake process. The presence of apoTf, monoferric TfFe(A) and monoferric TfFe(B) in the medium after incubation of reticulocytes with diferric transferrin, together with the fact that both iron binding sites of transferrin release their iron at the pH present in acid vacuoles, suggest a second mechanism of iron uptake by reticulocytes in which acid vacuoles are not involved.

In Chapter 4 the iron uptake in the presence of monensin was studied in order to localize the site where iron dissociates from transferrin. Monensin inhibits iron uptake by reticulocytes reversibly in a concentration dependent manner, without influencing the transferrin binding. The experimental results

reveal that there are two mechanisms involved in the uptake of iron: 1) iron is released from surface-receptor-bound transferrin at the plasma membrane without internalization of the transferrin receptor complex; 2) iron is released from endocytosed transferrin by acid vesicles.

In Chapter 5 the results are presented of experiments designed to confirm the existence of two mechanisms. The pH of the intracellular micro-environment of transferrin was determined with fluorescein labeled transferrin. The effect of monensin on the pH was also established. Intracellular transferrin was found in a micro-environment with a pH of approximately 5.7. Monensin is able to elevate the pH of the microenvironment of transferrin within some minutes. In addition, we also showed that the acid labile form of transferrin, TffFe(B), could not exist below a pH of 6.0.

These results confirm the suggestion that beside the removal of iron from endocytosed transferrin by low pH a second mechanism is involved in the process of iron uptake by red cell precursors, which is probably located at the cell membrane. Finally in Chapter 6 all experimental results were placed in a wider context.

NASCHRIFT

Op deze plaats wil ik graag mijn dank betuigen aan allen die een bijdrage hebben geleverd aan hetgeen U op de voorgaande pagina's hebt kunnen lezen.

Met name wil ik bedanken:

Mijn promotor, Prof.Dr. H.G. van Eijk, die mij grote vrijheid en vertrouwen heeft gegeven tijdens het onderzoek. Zijn inzicht en bereidwilligheid waren daarbij onmisbaar.

De overige leden van de begeleidingscommissie, Prof. J.H.P. Wilson, Prof.Dr. J. van Gool en Prof.Dr. J.F. Koster, die het manuscript kritisch hebben beoordeeld.

Prof.Dr. B. Leijnse, beheerder van het Instituut Chemische Pathologie, voor de genoten gastvrijheid.

Dr. Cees van der Heul, wiens kennis en waardevolle suggesties in zeer belangrijke mate hebben bijgedragen tot het uiteindelijke resultaat.

Martin Kroos, die op nauwgezette wijze en met een kritische instelling een groot gedeelte van de experimenten heeft verricht.

Nel de Jeu-Jaspars en Wim van Noort, in het bijzonder voor het beschikbaar stellen van radioactief gemerkt transferrine.

Dr. W.H. Moolenaar van het Hubrecht Laboratorium te Utrecht, die mij de mogelijkheid heeft gegeven de pH-waarde van de transferrine micro-omgeving vast te stellen.

Ella van Zaal-de Korte, die op bekwame manier het typewerk en de lay-out van het manuscript heeft verzorgd.

Jan Kruis en Ben van Bloppoel, die altijd bereid waren tot het verlenen van praktisch-technische ondersteuning.

Mijn ouders, die mij de gelegenheid hebben geboden om te studeren.

Willemien, mijn echtgenote, die elke ochtend een eindje met mij heeft meegereisd tussen de Bilt en Rotterdam.

CURRICULUM VITAE

De schrijver van dit proefschrift werd op 6 augustus 1953 geboren te Blankenham (O.). In 1970 werd het diploma HBS-B aan het Jan Hendrik Tromp Meesters Lyceum te Steenwijk behaald, waarna in datzelfde jaar met de studie Scheikunde aan de Rijksuniversiteit Utrecht begonnen werd.

Na het kandidaatsexamen in 1973 werd het doktoraalexamen met keuzerichting levensmiddelenchemie (CIVO-TNO, Zeist) en bijvakken biochemie, analytische chemie en levensmiddelenmicrobiologie in 1978 afgelegd.

Van 1 augustus 1979 tot 1 juni 1981 was hij aangesteld als wetenschappelijk assistent bij de Rijksuniversiteit Utrecht in de Vakgroep Voedingsmiddelen van Dierlijke Oorsprong van de Faculteit der Diergeneeskunde.

In de periode augustus 1981 - augustus 1984 was hij in dienst van de Nederlandse Organisatie voor Zuiver Wetenschappelijk Onderzoek en werd het in dit proefschrift beschreven onderzoek uitgevoerd op de afdeling Chemische Pathologie van de Faculteit der Geneeskunde van de Erasmus Universiteit te Rotterdam.

