

OVER DE ROL VAN
SIALO- EN ASIALOTRANSFERRINEN
IN HET IJZERMETABOLISME

OVER DE ROL VAN SIALO- EN ASIALOTRANSFERRINEN IN HET IJZERMETABOLISME

THE ROLE OF SIALO- AND ASIALO TRANSFERRINS IN IRON METABOLISM

PROEFSCHRIFT

ter verkrijging van de graad van doctor
aan de Erasmus Universiteit Rotterdam
op gezag van de rector magnificus
Prof. Dr. A.H.G. Rinnooy Kan
en volgens besluit van het college van dekanen.
De openbare verdediging zal plaatsvinden op
woensdag 2 december 1987 om 14.00 uur

door

CORNELIS JOHANNES DEKKER

geboren te Westkapelle

1987

Offsetdrukkerij Kanthers B.V.,
Alblasserdam

PROMOTIECOMMISSIE

Promotor: Prof. Dr. H.G. van Eijk
Overige leden: Prof. J.H.P. Wilson
Prof. Dr. J. van Gool
Prof. Dr. J.F. Koster

PUBLICATIES

Het in dit proefschrift beschreven werk is neergelegd in een aantal publicaties.

1. Henk van Eijk, Wim van Noort, Martin Kroos, Kees Dekker and Cees van der Heul. (1983).
The heterogeneity of human transferrin in biological fluids. Differences in physiological functions.
In: Structure and function of iron storage and transport proteins. Eds. I. Urushizaki et al., Elsevier Science Publishers, pp. 261-264.
2. C.J. Dekker, M.J. Kroos, C. van der Heul and H.G. van Eijk (1984).
Iron uptake from sialotransferrins by rat reticulocytes.
Int. J. Biochem. 16, 787-792.
3. H.G. van Eijk, W.L. van Noort, C.J. Dekker and C. van der Heul (1984).
A simple method for the separation and quantitation of neutral carbohydrates of glycoproteins in the one nanomole range on an adapted amino acid analyzer.
Clin. Chim. Acta 139, 187-193.
4. C.J. Dekker, M.J. Kroos, C. van der Heul and H.G. van Eijk (1985).
Uptake of sialo and asialotransferrins by isolated rat hepatocytes. Comparison of a heterologous and a homologous system.
Int. J. Biochem. 17, 701-706.
5. Theo J.C. van Berkel, Cees J. Dekker, J. Kar Kruijt and Henk G. van Eijk (1987).
The interaction in vivo of transferrin and asialotransferrin with liver cells.
Biochem. J. 243, 715-722.

ABSTRACTS

1. C.J. Dekker, C. van der Heul and H.G. van Eijk (1984).
Sialo transferrins and the iron uptake by different cell types.
Abstracts of the XIIth International Carbohydrate Symposium, Utrecht, The Netherlands.
2. H.G. van Eijk, C.J. Dekker and C. van der Heul (1984).
The iron uptake from sialotransferrins by rat reticulocytes and

hepatocytes.

Proceedings of the 25th Dutch Federation Meeting.

3. C.J. Dekker, Th.J.C. van Berkel and H.G. van Eijk (1985).

Sialotransferrin, iron transport and uptake.

Abstracts of the European Iron club Meeting, Amersfoort, The Netherlands.

4. C.J. Dekker and H.G. van Eijk (1986).

Hepatocellular iron. Uptake of sialo and asialotransferrins by isolated rat hepatocytes.

Proceedings of the 27th Dutch Federation Meeting.

5. C.J. Dekker, M.J. Kroos and H.G. van Eijk (1986).

Intracellular pathways of asialotransferrins in rat hepatocytes.

Abstracts of the European Iron Club Meeting, Pavia, Italy.

INHOUD

	pag.
HOOFDSTUK 1 INLEIDING	11
HOOFDSTUK 2 ALGEMENE METHODEN	33
1. Chemicaliën	33
2. Isotopen	33
3. Eiwitten	33
3.1. Transferrines	33
3.2. Asialofetuline	34
4. Het radioactief merken van transferrine met ^{125}I en ^{59}Fe	34
5. Isoelectrische focusering	35
5.1. Preparatieve isoelectrische focusering	35
5.2. Analytische isoelectrische focusering	35
6. Siaalzuurbepaling	36
7. Cellen	36
7.1. Rattereticulocyten	36
7.2. Rattehepatocyten	36
8. Incubatie-experimenten	37
8.1. Reticulocyten	37
8.2. Hepatocyten	37
9. Radioactiviteitsmetingen	38
HOOFDSTUK 3 INVLOED VAN DE KOOLHYDRAATKETENS OP DE TRANSFERRINE- EN IJZEROPNAME DOOR RATTERETICULOCYTEN	41
HOOFDSTUK 4 INVLOED VAN DE KOOLHYDRAATKETENS OP DE TRANSFERRINE- EN IJZEROPNAME DOOR RATTEHEPATOCYTEN. VERGELIJKING VAN EEN HETEROLOOG EN EEN HOMOLOOG SYSTEEM	51
HOOFDSTUK 5 DE INTRACELLULAIRE WEG VAN ASIALOTRANSFERRINES IN RATTEHEPATOCYTEN	63

HOOFDSTUK 6	DE INTERAKTIE VAN TRANSFERRINE EN ASIA- LOTRANSFERRINE MET LEVERCELLEN IN VIVO	69
ALGEMENE DISCUSSIE		85
SAMENVATTING		91
SUMMARY		93
NAWOORD		95
CURRICULUM VITAE		96

HOOFDSTUK 1

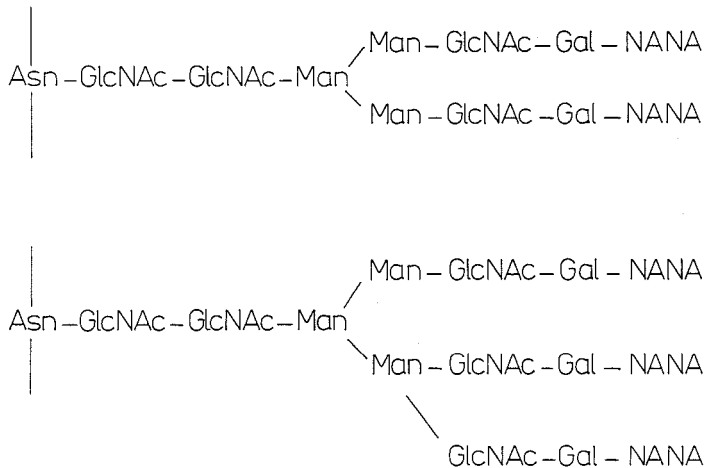
INLEIDING

Het transferrinemolecuul

Elke cel heeft ijzer nodig voor een groot aantal intracellulaire processen. Met name in de energiehuishouding en in reacties in de DNA synthese is ijzer essentieel. Wat betreft het eerste zij genoemd de noodzaak voor heemijzer in de cytochromen. De grootste hoeveelheid ijzer in het lichaam wordt gevonden in de erythrocyten waar het in het hemoglobine essentieel is voor het zuurstoftransporterend vermogen. Het transport van ijzer vanuit de darm, waar het uit het voedsel wordt opgenomen, naar de diverse weefsels stelt het lichaam voor een probleem. Immers, onder aerobe omstandigheden komt vrijwel al het ijzer in de ferri-vorm voor, en aangezien het oplosbaarheidsprodukt van $\text{Fe}(\text{OH})_3$ slechts 4×10^{-38} bedraagt, zullen bij fysiologische pH alle ijzerzouten tot onoplosbaar $\text{Fe}(\text{OH})_3$ gehydrolyseerd worden zodra de concentratie van $\text{Fe}(\text{III})$ hoger wordt dan 10^{-17} mol/l. In zoogdieren wordt dit probleem omzeild door het ferri-ion te complexeren met een β -globuline, transferrine, en het aldus oplosbaar gemaakte ijzer kan zo door de bloedbaan vervoerd worden.

Humaan transferrine is een glycoproteïne met een molecuulmassa van ca. 80.000 en bestaat uit één enkele polypeptide keten die is onder te verdelen in twee domains, het N-terminale en het C-terminale domain. Elk domain bevat één bindingsplaats voor ijzer. De primaire structuur van deze keten is enige jaren geleden opgehelderd (1,2) en laat 40% homologie zien (1) tussen de twee domains, hetgeen doet vermoeden dat het huidige transferrine in de loop van de evolutie door genduplicatie is ontstaan uit een voorouderlijk transferrine met één ijzerbindingsplaats en een molecuulmassa van ca 40.000.

Zoals gezegd is transferrine een glycoproteïne, het bevat dus ook een hoeveelheid suikers in de vorm van twee N-glycanen van het complexe type, die beide zijn aangehecht aan asparagine residuen in het C-terminale domain. Men heeft lange tijd aangenomen dat transferrine homogeen is met betrekking tot de samenstelling van de suikerketens, men veronderstelde dat beide suikerketens van het biantennaire type zijn (Fig. 1). In de zeventiger jaren echter ontdekten Spik et al. (3) door middel van free flow electroforese van een pronase digest van humaan transferrine het

**Figuur 1**

Structuur van een biantennaire en een triantennaire oligo-saccharideketen van humaan transferrine.

Asn = asparagine

GlcNAc = N-acetylglucosamine

Man = mannose

Gal = galactose

NANA = N-actetylneuraminezuur

bestaan van glycanen met drie galactoseresiduen in plaats van twee. Verder onderzoek m.b.v. DEAE-cellulose chromatografie door Regoeczi en medewerkers (4,5) leerde dat er in humaan transferrine minstens vijf frakties te onderscheiden zijn met verschillend gehalte aan siaalzuur. Deze onderzoekers kwamen bovendien tot de conclusie dat de oorzaak van deze heterogeniteit een biosynthetische kwestie is en niet een gevolg van afbraak (5). Door affiniteitschromatografie op Sepharose-concanavoline A (6) werd duidelijk dat er ook transferrinemoleculen bestaan met triantennaire ketens. De structuur van deze triantennaire ketens is in de loop der jaren verder onderzocht; zo beschrijven Krusius en Finne (7) twee typen triantennaire ketens, die in hun vertakkingspatroon verschillen vertonen. Later is de primaire structuur van twee triantennaire ketens opgehelderd (8,9). März et al. (8) maken bovendien melding van het

bestaan van tetra-antennaire ketens, die echter in de helft van de gevallen incompleet zouden zijn.

De zogenoemde microheterogeniteit van humaan transferrine die een gevolg is van verschillen in siaalzuurgehalte is ook aangetoond met behulp van isoelectrische focussing door van Eijk et al. (10,11); met deze techniek werd ook aangetoond dat transferrines afkomstig uit verschillende lichaamsvloeistoffen verschillen in samenstelling met betrekking tot de gehalten aan de diverse sialotransferrines (12).

Over de samenstelling van de suikerketens van transferrines afkomstig van andere diersoorten zijn weinig gegevens bekend. Aan ratteserumtransferrine is in 1979 een studie gewijd door Schreiber et al. (13). Zij rapporteren een isoelectrisch focusseringspatroon waarop twee hoofdbanden te onderscheiden zijn naast twee zeer zwakke banden. Op basis van een scheiding op Sepharose-concanavaleline A en een siaalzuurbepaling komen zij tot de conclusie dat ca. 30% van het ratteserumtransferrine één triantennaire keten draagt en ca. 70% één biantennaire keten.

Over de functie van de oligosaccharideketens van transferrine (en van glycoproteïnen in het algemeen) is veel gespeculeerd, maar bestaat nog veel onduidelijkheid (14,15). Mogelijk spelen ze een rol in bepaalde herkenningprocessen, of vervullen ze een functie in het beïnvloeden of stabiliseren van de tertiaire structuur van het proteïne. Vooralsnog echter blijft de rol van de suikerketens onduidelijk.

Transferrine bezit twee bindingsplaatsen voor Fe(III), een in het C-terminale en een in het N-terminale domain. Voor de binding van ijzer aan transferrine is de gelijktijdige binding van een anion noodzakelijk. Onder fysiologische omstandigheden is dit het bicarbonaat of carbonaat anion. Bij neutrale pH is de binding aan beide ijzerbindingsplaatsen zeer sterk (bindingsconstante 10^{23} M^{-1}), de N-terminale bindingsplaats is gevoeliger voor pH-daling dan de C-terminale (16,17).

Er is veel gespeculeerd over een mogelijk functioneel verschil van de twee ijzerbindingsplaatsen. Fletcher en Huehns postuleerden (18,19) dat het C-terminaal gebonden ijzer voornamelijk aan het erythroïde systeem zou worden afgegeven voor de heemsynthese en het N-terminaal gebonden ijzer aan de lever voor opslag. Zij kwamen tot deze hypothese op basis van incubatiestudies met reticulocyten waarbij zij de ^{59}Fe -opname vergeleken van een plasmamonster A dat al een preïncubatie met reticulocyten had ondergaan en een vers plasma monster B met hetzelfde gehalte

aan ^{59}Fe . De opname van het verse plasmamonster bleek aanzienlijk hoger en hieruit concludeerden zij dat bij de preïncubatie van plasma A het voor de reticulocyt toegankelijke ijzer reeds voor het grootste gedeelte was opgenomen. Hetzelfde experiment is later herhaald door Huebers et al. (20) met hetzelfde resultaat; echter op grond van de vastgestelde preferentiële ijzeropname van diferri Tf in vergelijking met de monoferri vormen (21-23) geven zij als verklaring dat de hogere opname van plasma A het gevolg is van het feit dat het gehalte aan diferri Tf in plasma A door de preïncubatie aanzienlijk lager is dan in plasma B. In de loop der jaren is de Fletcher en Huehns theorie ook door anderen weerlegd en de meeste onderzoekers zijn er dan ook van overtuigd dat er geen functioneel verschil bestaat tussen de twee ijzerbindingsplaatsen.

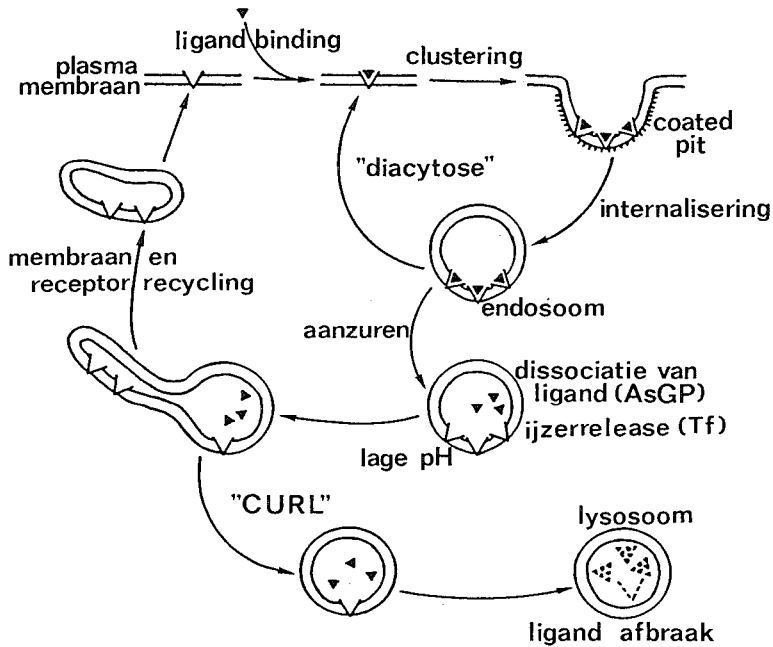
Transferrine-cel interactie

Transferrine verzorgt het ijzertransport van ijzerleverende weefsels, als darm of lever, naar ijzerbehoevende weefsels. Om het ijzer-transferrine uit de circulatie op te kunnen nemen hebben cellen specifieke membraan-receptoren voor transferrine nodig. Sinds de ontdekking van deze receptor door Jandl en Katz (24) is veel werk verricht aan de zuivering en karakterisering van Tf-receptoren afkomstig van verschillende celtypen (zie 25-30). Uit immunologisch onderzoek en "peptide mapping" van humane Tf-receptoren is gebleken dat Tf-receptoren op verschillende celtypen zo niet identiek, dan toch zeer nauw aan elkaar verwant zijn (31,32). De receptor is een transmembraan glycoproteïne met een MW van 170.000-200.000 Dalton en is een dimeer met twee subunits van ca 90.000 Dalton, deze subunits zijn door middel van een disulfide brug met elkaar verbonden. Het grootste deel van de receptor is aan de buitenkant van de membraan gelegen, een polypeptide met MW ca. 70.000, en bevat per monomeer een bindingsplaats voor transferrine en bovendien drie N-asparagine gekoppelde suikerketens; twee mannoserijke en één complexe keten. Het andere deel bevat covalent gebonden vetzuurketens, die mogelijk een rol spelen in de verankering in de membraan, en gefosforyleerde serine-residuen. Het aantal receptoren per cel varieert sterk over de verschillende weefsels en is een weerspiegeling van de ijzerbehoefte van een cel. Zo bezitten sterk groeiende weefsels en heemsynthetiserende cellen als erythroïde voorlopers een groot aantal receptoren per cel. Voor konijne-

reticulocyten zijn receptoraantallen gerapporteerd van 100.000-300.000 (33,34) tegenover 40.000 voor rattehepatocyten (35). Het verband tussen ijzerbehoefte en het aantal Tf-receptoren is aangetoond met K562 cellen, waar men heeft vastgesteld dat de hoeveelheid intracellulair ijzer invloed heeft op het aantal Tf-receptoren (36-41). Bij een groot ijzer-aanbod neemt het aantal Tf-receptoren af, onttrekt men ijzer aan de cel door middel van een ijzerchelator dan neemt het aantal Tf-receptoren toe. Deze regulering blijkt op transcriptieniveau te geschieden (40,41).

Over het mechanisme van ijzeropname van transferrine door de cel bestaat al sinds jaren een verschil van mening onder de diverse onderzoekers. Er is een verdeling te maken in twee groepen: de aanhangers van de theorie van ijzerafsplitsing aan de membraan en de voorstanders van de endocytose theorie. Het eerstgenoemde mechanisme, oorspronkelijk voorgesteld door Jandl en Katz (24) houdt in dat het ijzerbeladen transferrine aan de membraanreceptor bindt, waarna het ijzer afgegeven wordt aan een membraancomponent en de cel ingaat, terwijl het transferrine membraan-gebonden blijft. In de loop der jaren zijn inderdaad uit reticulocyten membraancomponenten geïsoleerd die ijzer kunnen binden (42-44) en een aantal groepen onderzoekers blijft deze theorie aanhangen (44-46). Er komen echter steeds meer bewijzen voor de andere genoemde theorie, die van de receptor-gemedieerde endocytose.

Endocytose is een mechanisme via hetwelk cellen extracellulair materiaal kunnen internaliseren (47). Grofweg kan men endocytose onderverdelen in twee hoofdtypen: fagocytose en pinocytose. Onder fagocytose wordt verstaan het internaliseren van lichtmicroscopisch waarneembare partikels van enkele tienden van een μm of groter. Bij kleinere partikels of opgeloste verbindingen of wanneer het alleen vloeistof betreft spreekt men van pinocytose. Vindt pinocytose plaats van een verbinding via binding aan een receptor met specifieke hoge affiniteit voor die verbinding dan spreekt men over receptor gemedieerde endocytose. Van vele verbindingen is bekend dat ze via receptor gemedieerde endocytose worden opgenomen (48-50). De gebeurtenissen die optreden bij receptor gemedieerde endocytose zijn intussen voor een deel opgehelderd (Fig. 2). Algemeen gesproken bindt een ligand aan zijn specifieke receptor, waarna deze receptoren clusteren in "coated pits", dit zijn indeukingen van de membraan met een diameter van ca 0,1 μm , die aan de cytoplasmatische zijde een eiwit coat bezitten met als voornaamste bestanddeel clathrine



Figuur 2

Schematische voorstelling van receptor-gemedieerde endocytose.

(51). Deze "coated pits" snoeren vervolgens af van de membraan tot coated vesicles. Deze vesicles kunnen een grote verscheidenheid aan receptoren en liganden bevatten. Eenmaal afgesnoerd van de membraan verliezen de vesicles snel hun clathrinecoat. De nu ontstane vesicles worden endosomen genoemd of ook receptosomen (52). Geuze en medewerkers (53) vonden in rattelevercellen een stelsel van vesicles en tubulaire structuren waar receptoren en liganden ontkoppeld voorkwamen, waarvoor zij de naam "CURL" voorstelden: compartment of uncoupling of receptor and ligand. In dit compartiment wordt in de meeste gevallen het ligand van de receptor afgekoppeld, waarna de receptor in vele gevallen gerecycled wordt en dus terug vervoerd naar de membraan; de liganden worden op nog onbekende wijze gesorteerd en ieder naar zijn bestemming gedirigeerd. Het ontkoppelen van receptor en ligand geschiedt onder invloed van een lage pH die in het endosomale compartiment in stand wordt gehouden door een in de

membraan aanwezige ATP-afhankelijke proton pomp. Het snelle verzuren van endosomen tot pH 5,3-5,5 is met behulp van fluoresceïne-gemerkt asialo orosomucoïd aangetoond door Tycko et al. (54). Men vond het gemerkte ligand na 5 minuten incubatie in vesicles met pH 5,3-5,5 en zonder zure fosfatase activiteit. In rattebeenmergcellen vonden Veldman et al. (55) met behulp van FITC-gemerkt transferrine een intra-endosomale pH van 5,7. Experimenten met proton ionoforen als monensine, die de pH gradiënt over de endosomale membraan verstoren, als ook experimenten met zwakke basen als methyamine die de pH in het endosoom verhogen, hebben aangetoond dat de lage pH essentieel is voor de processen van ligand ontkoppeling en receptor recycling (56-60).

In 1969 kwamen Morgan en Appleton (61) tot de conclusie dat transferrine-gebonden ijzer niet aan de membraan van transferrine wordt afgesplitst, maar dat het ijzerbeladen transferrine via de bovenbeschreven weg van receptor-gemedieerde endocytose de cel binnengaat. In talrijke studies met diverse celtypen is later bevestigd dat extracellulair aangeboden transferrine na verloop van tijd in intracellulaire compartimenten wordt aangetroffen (62-70). Door transferrine en de Tf-receptor te merken met verschillende fluorescentie-merkers toonden Enns et al. aan (64), dat beiden gezamenlijk geëndocyteerd worden in K562 cellen. Internalisatie van de Tf-receptor is eveneens aangetoond in A431 cellen (66). Volgens sommige onderzoekers is de cyclus van endocytose en recycling van de Tf-receptor een continu proces waarvoor binding van transferrine niet noodzakelijk is (71), anderen menen echter (64, 68, 72) dat binding van transferrine aan de receptor het signaal is dat de endocytose op gang brengt. Eenmaal geëndocyteerd wordt transferrine aangetroffen in vesicles met een pH tussen 5 en 6, het bovenbeschreven CURL (55, 73, 62). Onder invloed van deze lage pH verliest het transferrine zijn ijzer en in tegenstelling tot de meeste liganden blijft het apotransferrine receptor-gebonden en wordt tegelijk met de receptor gerecycled, waarna het apo-Tf aan de plasmamembraan loslaat van de receptor en in het extracellulaire medium terecht komt. Deze gang van zaken is mogelijk door de verschillende pH-afhankelijkheid van de affiniteit van ijzerbeladen Tf en apo-Tf voor de receptor (74-76). Bij pH 7,4 heeft diferri-Tf een hoge, apo-Tf een lage affiniteit voor de receptor. Bij fysiologische pH zal dus diferritransferrine preferentieel aan de receptor binden. Bij de endosomale pH van ca 5,5 heeft apo-Tf juist een hoge affiniteit voor de

receptor. Door het verlies van het ijzer in het endosoom wordt de binding van het Tf aan de receptor dus juist versterkt. Wanneer een vesicle dat een receptor-apo-Tf complex bevat fuseert met de plasmamembraan wordt de inhoud blootgesteld aan de neutrale pH van het omringende medium en door de lage affiniteit van apo Tf voor de receptor zal dit derhalve loslaten en in het medium terecht komen. Een fraaie studie met KB cellen door Dickson et al. (63) kan dienen als ondersteuning van deze Tf-cyclus theorie. Door transferrine en epidermale groeifactor (EGF) verschillend te merken toonden zij het verschil in intracellulaire weg aan tussen deze twee liganden. Met subcellulaire fractionering en met fluorescentie-microscopie namen zij waar dat 5 minuten na endocytose beide liganden zich in dezelfde ensomen bevinden, maar dat na verloop van tijd een divergentie optreedt. EGF komt terecht in structuren met hogere dichtheid en lysosomale enzymactiviteit, terwijl het transferrine uit de cel verdwijnt en intact in het medium wordt aangetroffen.

Zoals gezegd zijn de meeste onderzoekers ervan overtuigd dat de ijzerafgifte van transferrine aan de cel via receptorgemedieerde endocytose plaatsvindt en een aantal studies met protonionoforen en zwakke basen hebben de noodzaak aangetoond van een lage pH voor ijzerafsplitsing (76-80). Het is evenwel gebleken (81) dat reticulocyten en hepatocyten na incubatie met diferritransferrine niet alleen apo-Tf afgeven aan het omringende medium, maar ook gelijke hoeveelheden van de twee monoferrivormen, hetgeen moeilijk te verklaren is na passage door een milieu met pH 5,5. Van der Heul en medewerkers (80) hebben mede naar aanleiding hiervan voorgesteld dat beide mechanismen, zowel ijzerafsplitsing aan de membraan als ijzerafsplitsing in zure vesicles, betrokken zijn bij de ijzeropname van transferrine.

Na afsplitsing van transferrine dient het ijzer vervoerd te worden door het cytosol naar de plaats van bestemming, zoals bijvoorbeeld de mitochondriën voor de heemsynthese in erythroïde cellen of het cytosol-ferritine in hepatocyten of andere ijzervragende processen in andere organellen. Over de transportmechanismen die hierbij betrokken zijn bestaat nog veel onzekerheid. Gezien het lage oplosbaarheidsprodukt van $\text{Fe}(\text{OH})_3$ is het waarschijnlijk dat het ijzer in gecomplexeerde vorm vervoerd zal worden. Een aantal studies zijn gepubliceerd waarin melding gemaakt wordt van ijzerbindende cytosolcomponenten met sterk variërende molecuulgewichten (82-84). Uit studies van de groep van Romslo blijkt dat

pyrofosfaat de ijzeropname door mitochondriën van diferri-Tf bevordert (85-87). Volgens Morley en Bezkorovainy is het mogelijk dat het ijzertransport in de cel naar ferritine of mitochondriën geschiedt via complexe ijzerzouten zoals citraatcomplexen (88). Vooralsnog echter blijft het mechanisme van het intracellulaire ijzertransport een onderwerp van veel speculatie en is nog veel onderzoek noodzakelijk ter opheldering hiervan.

De asialoglycoproteïne-receptor

De hepatocyt bezit naast transferrine-receptoren een groot aantal specifieke receptorsystemen o.a. voor lipoproteïnen en een groot aantal hormonen en eiwitten (89); de meeste van deze receptorsystemen zijn gelokaliseerd aan de sinusoidale zijde van de hepatocyt. Een receptor-systeem dat in het kader van dit proefschrift van belang is en waarop hier daarom wat nader wordt ingegaan, is het asialoglycoproteïne (AsGP)-receptorsysteem. Dit receptorsysteem herkent eindstandige galactose- en N-acetylgalactosamine-residuen. Wanneer serumglycoproteïnen hun eindstandig siaalzuur verliezen wordt galactose geëxposeerd en de aldus beschadigde glycoproteïnen worden door het AsGP-systeem op de hepatocyten-membraan uit de circulatie weggevangen en geëndocyteerd. Het bestaan van een galactose-specifiek receptorsysteem in de lever werd voor het eerst aangetoond in 1968 door Morell et al. (90) en het is in 1974 door Ashwell en Morell uitgebreid beschreven (91). In de loop der jaren is een groot aantal studies verricht aan dit systeem op hepatocyten en op de sterk aan de hepatocyt verwante hepatoma cellijn Hep G2. Diverse overzichtsar-tikelen zijn de laatste jaren verschenen die de vergaarde kennis samen-vatten (92-95). De AsGP-receptor blijkt in de lever uitsluitend op parenchymcellen voor te komen en is evenals de Tf-receptor een trans-membraanglycoproteïne. De molecuulmassa bedraagt ca. 250.000 Dalton en de receptor bevat ca. 10% koolhydraat. Zowel de receptor afkomstig van de rat, het konijn als de mens blijken opgebouwd uit subunits van MW 40.000-50.000. Het gerapporteerde aantal receptoren per cel varieert tussen 100.000 en 500.000, waarvan het grootste deel in een intracellu-laire pool aanwezig is (96, 97, 98) en mogelijk dient als reservoir van waaruit bij endocytose van ligand-receptor complexen het aantal mem-braanreceptoren wordt aangevuld.

Voor de binding van een ligand aan de receptor is Ca^{2+} absoluut noodzakelijk. De affiniteit van de receptor voor een ligand neemt sterk toe met toenemend aantal geëxposeerde galactose of N-acetylgalactosamine residuen (99,100). Naast het aantal residuen blijkt ook het vertakkingspatroon van de suikerketen en daardoor de onderlinge afstand van de geëxposeerde galactose residuen invloed te hebben op de affiniteit, waarbij de affiniteit toeneemt naarmate de keten sterker vertakt is, dus de affiniteit voor de receptor neemt af in de volgorde tetra- > tri- > bi-antennair. In een model ter verklaring hiervoor van Hardy en medewerkers (100) zijn de galactosebindingsplaatsen in een rooster gerangschikt op de celmembraan en zij stellen zich voor dat de hoge affiniteitsconstante van een ligand met een groot aantal galactoseresiduen en sterk vertakte ketens veroorzaakt wordt doordat de ruimtelijke rangschikking van de galactoseresiduen het mogelijk maakt aan verschillende naast elkaar gelegen bindingsplaatsen tegelijk te binden. Dit model zou tegelijk een verklaring kunnen vormen voor het feit dat het gerapporteerde aantal receptoren per cel sterk varieert met het gebruikte ligand.

De gebeurtenissen die optreden na binding van een asialoglycoproteïne aan de receptor zijn aanvankelijk gelijk aan die, beschreven voor de Tf-receptor. Kort na endocytose wordt het ligand-receptor complex aangetroffen in vesicles met pH 5,3-5,5 (54, 103). Onder invloed van deze pH dissocieert hier echter het ligand van de receptor (104), de noodzaak van een lage pH voor dit proces is aangetoond met behulp van ionoforen als monensine (56, 105). De receptor wordt gerecycled naar de membraan en het ligand komt terecht in de lysosomen, waar het afgebroken wordt. Verschillende auteurs vermelden een "lag period", een pauze tussen het verschijnen van ligand in een lysosomaal compartiment en het verschijnen van de eerste degradatieprodukten. De lengte van deze periode varieert echter in de literatuur van 8 minuten (103) tot 40 minuten (105).

Werd aanvankelijk aangenomen dat binding van een ligand aan dit receptor-systeem onherroepelijk leidt tot lysosomale afbraak, uit het werk van de groep van Regoeczi met humaan asialotransferrine is gebleken dat er uitzonderingen op deze regel bestaan. Al eerder was ontdekt (91) dat desialylering van transferrine weinig invloed had op de serumoverleving en aanvankelijk werd verondersteld dat asialotransferrine in tegenstelling tot andere asialoglycoproteïnen niet bindt aan de galactose-receptor. In 1979 rapporteerden Regoeczi en medewerkers (106) de schei-

ding van humaan AsTf in drie typen: type 1 met twee biantennaire ketens, type 2 met een bi- en een triantennaire keten en type 3 met eveneens een bi- en een triantennaire keten maar met een andere vertakking van de triantennaire keten. De affiniteit voor het galactosespecifieke ratteleverlectine nam toe in de volgorde type 1 < type 2 < type 3. In vivo studies met ratten lieten zien dat geen van de drie typen afgebroken wordt bij lage concentratie maar dat de afbraak geïnduceerd kan worden door verhoging van de concentratie. In verdere in vitro studies met geïsoleerde hepatocyten en AsTf type 3 (107) werd deze concentratie afhankelijke afbraak bevestigd. Daarnaast kwam men tot de conclusie dat ook bij lage concentratie het asialotransferrine wel geëndocyteerd wordt, maar niet afgebroken en weer intact wordt uitgescheiden. Voor dit proces introduceerden deze onderzoekers de term "diacytose". Uit in vivo experimenten bleek dat tijdens deze diacytose het AsTf gedeeltelijk wordt geresialyleerd (108, 109) met snelheden type 1 < type 2 < type 3.

Op basis van de waarneming dat de afbraak van AsTf ook geïnduceerd wordt door hoge concentraties diferri intact Tf hebben Regoeczi et al. een model voorgesteld voor de diacytose, waarbij ook de Tf-receptor betrokken is (110). Het AsTf zou na endocytose via de AsGP-receptor en aanzuring van het endosoom loslaten van deze receptor en zijn ijzer afgeven, waarna het in de apovorm zou binden aan een in hetzelfde endosoom aanwezige Tf-receptor en aldus zou het met de Tf-receptor gerecycled worden. Een grote hoeveelheid intact Tf of AsTf zou alle Tf-receptoren bezetten, waardoor deze weg onmogelijk wordt. Asialotransferrine is uiteraard het enige asialoglycoproteïne waarvoor dit model kan gelden. Inmiddels echter hebben Simmons en Schwartz een studie gepubliceerd met HepG2 cellen waarin zij aantonen dat ook asialoorosomucoïd, een asialoglycoproteïne met hoge affiniteit voor de AsGP-receptor, voor 28% intact weer wordt geëxocyteerd (111). Deze terugkeer naar het celoppervlak zou geschieden zonder passage door een zuur endosomaal compartiment. Al met al is de intracellulaire processing van liganden, geëndocyteerd via het AsGP-receptor systeem niet zo eenvoudig als tot voor kort werd verondersteld.

Probleemstelling

De microheterogeniteit van humaan transferrine, zoals die hiervoor beschreven is, roept vragen op met betrekking tot de betekenis van de koolhydraatketens van transferrine, temeer daar het patroon van de microheterogeniteit van transferrines afkomstig uit verschillende lichaamsvloeistoffen niet hetzelfde blijkt te zijn. Een deel van het in dit proefschrift beschreven onderzoek is gewijd aan onderzoek naar eventuele functionele verschillen van de diverse humane transferrinefrakties. Verder is getracht meer inzicht te krijgen in de rol van de suikerketens bij de verwerking van natieve en gedesialyleerde transferrines door de lever, waarbij met name de interactie met leverparenchymcellen nader is onderzocht.

LITERATUUR

1. MacGillivray, R.T.A., Mendez, E., Sinha, S.K., Sutton, M.R., Lineback-Zins, J. and Brew, K. (1982). The complete amino-acid sequence of human serum transferrin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 2504-2508.
2. MacGillivray, R.T.A., Mendez, E., Shewale, J.G., Sinha, S.K., Lineback-Zins, J. and Brew, K. (1983). The primary structure of human serum transferrin. The structures of seven cyanogen bromide fragments and the assembly of the complete structure. *J. Biol. Chem.* 258, 3543-3553.
3. Spik, G., Bayard, B., Fournet, B., Strecker, G., Bouquelet, S., and Montreuil, J. (1975). Studies on glycoconjugates LXIV. Complete structure of two carbohydrate units of human serotransferrin. *FEBS Letters* 50, 296-299.
4. Wong, K-L. and Regoeczi, E. (1977). Some observations on the carbohydrate composition of purified transferrin. *Int. J. Pept. Prot. Res.* 9, 241-248.
5. Regoeczi, E., Wong, K-L., Ali, M., and Hatton, M.W.C. (1977). The molecular components of human transferrin type C. *Int. J. Pept. Prot. Res.* 10, 17-26.
6. Wong, K-L., Debanne, M.T., Hatton, M.W.C. and Regoeczi, E. (1978). Human transferrin, asialotransferrin and the intermediate forms. *Int. J. Pept. Prot. Res.* 12, 27-37.
7. Krusius, T. and Finne, J. (1981). Use of the Smith degradation in the study of the branching pattern in the complex-type carbohydrate units of glycoproteins. *Carbohydr. Res.* 90, 203-214.
8. März, L., Hatton, M.W.C., Berry, L.R. and Regoeczi, E. (1982). The structural heterogeneity of the carbohydrate moiety of desialylated human transferrin. *Can. J. Biochem.* 60, 624-630.
9. Spik, G., Debruyne, V., Montreuil, J., van Halbeek, H. and Vliegenterhart, J.F.G. (1985). Primary structure of two sialylated triantennary glycans from human serotransferrin. *FEBS Letters* 183, 65-69.
10. van Eijk, H.G., van Noort, W.L., Kroos, M.J. and van der Heul, C. (1982). The heterogeneity of human serum transferrin and human transferrin preparations on isoelectric focusing gels; no functional difference of the fractions in vitro. *Clin. Chim. Acta* 121, 209-216.

11. van Eijk, H.G., van Noort, W.L., and van der Heul, C. (1982). Microheterogeneity of human serum transferrins: a consequence for immunochemical determinations? *Clin. Chim. Acta* 126, 193-195.
12. van Eijk, H.G., van Noort, W.L., Dubelaar, M.L. and van der Heul, C. (1983). The microheterogeneity of human transferrins in biological fluids. *Clin. Chim. Acta* 132, 167-171.
13. Schreiber, G., Dryburgh, H., Millership, A., Matsuda, Y., Inglis, A., Phillips, J., Edwards, K. and Maggs, J. (1979). The synthesis and secretion of rat transferrin. *J. Biol. Chem.* 254, 12013-12019.
14. Berger, E.G., Buddecke, E., Kamerling, J.P., Kobata, A., Paulson, J.C. and Vliegenthart, J.F.G. (1982). Structure, biosynthesis and functions of glycoprotein glycans. *Experientia* 38, 1129-1162.
15. Schachter, H. (1984). Glycoproteins: Their structure, biosynthesis and possible clinical implications. *Clin. Biochem.* 17, 3-14.
16. Aisen, P. (1980). The transferrins. In: *Iron in Biochemistry and medicine II*. A. Jacobs and M. Worwood, eds., pp 87-129.
17. van Eijk, H.G., van Noort, W.L., Kroos, M.J. and van der Heul, C. (1978). Analysis of the iron-binding sites of transferrin by isoelectric focusing. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 16, 557-560.
18. Fletcher, J. and Huehns, E.R. (1967). Significance of the binding of iron by transferrin. *Nature* 215, 584-586.
19. Fletcher, J. and Huehns, E.R. (1968). Function of transferrin. *Nature* 218, 1211-1214.
20. Huebers, H.A., Huebers, E., Csiba, E. and Finch, C.A. (1984). Heterogeneity of the plasma iron pool: explanation of the Fletcher-Huehns phenomenon. *Am. J. Physiol.* 247, R280-R283.
21. Huebers, H.A., Csiba, E., Huebers, E. and Finch, C.A. (1983). Competitive advantage of diferric transferrin in delivering iron to reticulocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 300-304.
22. Huebers, H., Csiba, E., Huebers, E. and Finch, C.A. (1985). Molecular advantage of diferric transferrin in delivering iron to reticulocytes: a comparative study. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 179, 222-226.
23. Young, S.P., Bomford, A. and Williams, R. (1984). The effect of the iron saturation of transferrin on its binding and uptake by rabbit reticulocytes. *Biochem. J.* 219, 505-510.

24. Jandl, J.H. and Katz, J.H. (1963). The plasma-to-cell cycle of transferrin. *J. Clin. Invest.* 42, 314-326.
25. Newman, R., Schneider, C., Sutherland, R., Vodinelich, L. and Greaves, M. (1982). The transferrin receptor. *Trends Biochem. Sci.* 7, 397-400.
26. Trowbridge, I.S., Newman, R.A., Domingo, D.L. and Sauvage, C. (1984). Transferrin receptors: Structure and function. *Biochem. Pharmacol.* 33, 925-932.
27. Huebers, H.A. and Finch, C.A. (1984). Transferrin: Physiologic behaviour and clinical implications. *Blood* 64, 763-767.
28. Young, S.P. and Bomford, A. (1984). Transferrin and cellular iron exchange. *Clin. Sci.* 67, 273-278.
29. Bomford, A.B. and Munro, H.N. (1985). Transferrin and its receptor: their roles in cell function. *Hepatology* 5, 870-875.
30. Hanover, J.A. and Dickson, R.B. (1985). Transferrin: receptor-mediated endocytosis and iron delivery. In: *Endocytosis*. I. Pastan and M.C. Willingham, eds. pp 131-161.
31. Stein, B.S. and Sussman, H.H. (1983). Peptide mapping of the human transferrin receptor in normal and transformed cells. *J. Biol. Chem.* 258, 2668-2673.
32. Enns, C.A. and Sussman, H.H. (1981). Similarities between the transferrin receptor proteins on human reticulocytes and human placenta. *J. Biol. Chem.* 256, 12620-12623.
33. van Bockxmeer, F.M., Yates, G.K. and Morgan, E.H. (1978). Interaction of transferrin with solubilized receptors from reticulocytes. *Eur. J. Biochem.* 92, 147-154.
34. Baker, E. and Morgan, E.H. (1969). The kinetics of the interaction between rabbit transferrin and reticulocytes. *Biochemistry* 8, 1133-1141.
35. Young, S.P. and Aisen, P. (1980). The interaction of transferrin with isolated hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 633, 145-153.
36. Louache, F., Testa, U., Pelicci, P., Thomopoulos, P., Titeux, M. and Rochant, H. (1984). Regulation of transferrin receptors in human hematopoietic cell lines. *J. Biol. Chem.* 259, 11576-11582.
37. Bridges, K.R. and Cudkowicz, A. (1984). Effect of iron chelators on the transferrin receptor in K562 cells. *J. Biol. Chem.* 259, 12970-12977.

38. Rudolph, N.S., Ohlsson-Wilhelm, B.M., Leary, J.F. and Rowley, P.T. (1985). Regulation of K 562 cell transferrin receptors by exogenous iron. *J. Cell. Physiol.* 122, 441-450.
39. Rao, K.K., Shapiro, D., Mattia, E., Bridges, K. and Klausner, R. (1985). Effects of alterations in cellular iron on biosynthesis of the transferrin receptor in K 562 cells. *Mol. Cell. Biol.* 5, 595-600.
40. Rao, K., Harford, J.B., Rouault, T., McClelland, A., Ruddle, F.H. and Klausner, R.D. (1986). Transcriptional regulation by iron of the gene for the transferrin receptor. *Mol. Cell. Biol.* 6, 236-240.
41. Louache, F., Pelosi, E., Titeux, M., Peschle, C. and Testa, U. (1985). Molecular mechanisms regulating the synthesis of transferrin receptors and ferritin in human erythroleukemic cell lines. *FEBS Letters* 183, 223-227.
42. 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 ghost on iron-containing components in the ghost suspension. *Biochim. Biophys. Acta* 601, 572-583.
43. Glass, J., Nunez, M.T. and Robinson, S.H. (1980). Transferrinbinding and iron-binding proteins of rabbit reticulocyte plasma membranes. Three distinct moieties. *Biochim. Biophys. Acta* 598, 293-304.
44. Nunez, M.T., Cole, E.S., and Glass, J. (1983). The reticulocyte plasma membrane pathway of iron uptake as determined by the mechanism of, $\alpha\alpha'$ -dipyridyl inhibition. *J. Biol. Chem* 258, 1146-1151.
45. Cole, E.S. and Glass, J. (1983). Transferrin binding and iron uptake in mouse hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 762, 102-110.
46. Morley, C.D. and Bezborovainy, A. (1985). Cellular iron uptake from transferrin. Is endocytosis the only mechanism? *Int. J. Biochem.* 17, 553-564.
47. Besterman, J.M. and Low, R.B. (1983). Endocytosis: a review of mechanisms and plasma membrane dynamics. *Biochem. J.* 210, 1-13.
48. Goldstein, J.L., Anderson, R.G.W. and Brown, M.S. (1979). Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis. *Nature* 279, 679-685.
49. Wileman, T., Harding, C. and Stahl, P. (1985). Receptor-mediated endocytosis. *Biochem. J.* 232, 1-14.

50. Stahl, P. and Schwartz, A.L. (1986). Receptor-mediated endocytosis. *J. Clin. Invest.* 77, 657-662.
51. Pearse, B.M.F (1976). Clathrin: a unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73, 1255-1259.
52. Pastan, I.H. and Willingham, M.C. (1981). Journey to the center of the cell: Role of the endosome. *Science* 214, 504-509.
53. Geuze, H.J., Slot, J.W., Strous, G.J.A.M., Lodish, H.F. and Schwartz, A.L. (1983). Intracellular site of asialoglycoprotein receptor-ligand uncoupling: Double-label immunoelectron microscopy during receptor-mediated endocytosis. *Cell* 32, 277-287.
54. Tycko, B., Keith, C.H. and Maxfield, F.R. (1983). Rapid acidification of endocytic vesicles containing asialo- glycoprotein in cells of a human hepatoma cell line. *J. Cell. Biol.* 97, 1762-1776.
55. Veldman, A., van der Heul, C., Kroos, M.J. and van Eijk, H.G. (1986). Fluorescence probe measurement of the pH of the transferrin microenvironment during iron uptake by rat bone marrow erythroid cells. *Brit. J. Haematol.* 62, 155-162.
56. Berg, T., Blomhoff, R., Naess, L., Tolleshaug, H. and Drevon, C.A. (1983). Monensin inhibits receptor-mediated endocytosis of asialoglycoproteins in rat hepatocytes. *Exp. Cell. Res.* 148, 319-330.
57. Harford, J., Wolkoff, A.W., Ashwell, G. and Klausner, R.D. (1983). Monensin inhibits intracellular dissociation of asialoglycoproteins from their receptor. *J. Cell. Biol.* 96, 1824-1828.
58. Schwartz, A.L., Bolognesi, A. and Fridovich, S.E. (1984). Recycling of the asialoglycoprotein receptor and the effect of lysosomotropic amines in hepatoma cells. *J. Cell. Biol.* 98, 732-738.
59. Rustan, A.C., Nossen, J.O., Berg, T. and Drevon, C.A. (1985). The effects of monensin on secretion of very low density lipoprotein and metabolism of asialofetuin by cultured rat hepatocytes. *Biochem. J.* 227, 529-536.
60. Strous, G.J., DuMaine, A., Zijderhand-Bleekemolen, J.E., Slot, J.W. and Schwartz, A.L. (1985). Effect of lysosomotropic amines on the secretory pathway and on the recycling of the asialoglycoprotein receptor in human hepatoma cells. *J. Cell. Biol.* 101, 531-539.
61. Morgan, E.H. and Appleton, T.C. (1969). Autoradiographic localiza-

- tion of ^{125}I -labelled transferrin in rabbit reticulocytes. *Nature* 223, 1371-1372.
62. 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 K 562 cells: Identification of a nonlysosomal acidic compartment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 79, 6186-6190.
 63. 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. *Biochemistry* 22, 5667-5674.
 64. Enns, C.A., Larrick, J.W., Suomalainen, H., Schroder, J. and Sussman, H.H. (1983). Co-migration and internalization of transferrin and its receptor on K 562 cells. *J. Cell. Biol.* 97, 579-585.
 65. 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.
 66. Hopkins, C.R. and Trowbridge, I.S. (1983). Internalization and processing of transferrin and the transferrin receptor in human carcinoma A 431 cells. *J. Cell. Biol.* 97, 508-521.
 67. 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.
 68. Klausner, R.D., Harford, J. and van Renswoude, J. (1984). Rapid internalization of the transferrin receptor in K 562 cells is triggered by ligand binding or treatment with a phorbol ester. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 3005-3009.
 69. 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.
 70. Yamashiro, D.J., Tycko, B., Fluss, S.R. and Maxfield, F.R. (1984). Segregation of transferrin to a mildly acidic (pH 6.5) para-Golgi compartment in the recycling pathway. *Cell* 37, 789-800.
 71. Watts, C. (1985). Rapid endocytosis of the transferrin receptor in the absence of bound transferrin. *J. Cell. Biol.* 100, 633-637.

72. Larrick, J.W., Enns, C., Raubitschek, A. and Weintraub, H. (1985). Receptor-mediated endocytosis of human transferrin and its cell surface receptor. *J. Cell. Physiol.* 124, 283-287.
73. Paterson, S., Armstrong, N.J., Iacopetta, B.J., Mc Ardle, M.J. and Morgan, E.H. (1984). Intravesicular pH and iron uptake by immature erythroid cells. *J. Cell. Physiol.* 120, 225-232.
74. Dautry-Varsat, A., Ciechanover, A. and Lodish, H.F. (1983). pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 2258-2262.
75. Morgan, E.H. (1983). Effect of pH and iron content of transferrin on its binding to reticulocyte receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 762, 498-502.
76. 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.
77. Rao, K., van Renswoude, J., Kempf, C. and Klausner, R.D. (1983). Separation of Fe^{3+} from transferrin in endocytosis. Role of the acidic endosome. *FEBS Letters* 160, 213-216.
78. Bomford, A., Young, S.P. and Williams, R. (1985). Release of iron from the two iron-binding sites of transferrin by cultured human cells: modulation by methylamine. *Biochemistry* 24, 3472-3478.
79. Stein, B.S., Bensh, K.G. and Sussman, H.H. (1984). Complete inhibition of transferrin recycling by monensin in K 562 cells. *J. Biol. Chem.* 259, 14762-14772.
80. van der Heul, C., Veldman, A., Kroos, M.J. and van Eijk, H.G. (1984). Two mechanisms are involved in the process of iron uptake by rat reticulocytes. *Int. J. Biochem.* 16, 383-389.
81. Young, S.P. (1982). Evidence for the functional equivalence of the iron-binding sites of rat transferrin. *Biochim. Biophys. Acta* 718, 35-41.
82. Romslo, I. (1980). Intracellular transport of iron. In: *Iron in biochemistry and medicine II*. A. Jacobs and M. Worwood, eds., pp 325-362.
83. 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*. P. Saltman and J. Heggenauer, eds. pp 189-191.

84. Bakkeren, D.L., de Jeu-Jaspars, C.M.H., van der Heul, C. and van Eijk, H.G. (1985). Analysis of iron-binding components in the low molecular weight fraction of rat reticulocyte cytosol. *Int. J. Biochem.* 17, 925-930.
85. Nilsen, T. and Romslo, I. (1984). Pyrophosphate as a ligand for delivery of iron to isolated rat-liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 766, 233-239.
86. Nilsen, T. and Romslo, I. (1984). Transferrin as a donor of iron to mitochondria. Effect of pyrophosphate and relationship to mitochondrial metabolism and heme synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 802, 448-453.
87. Nilsen, T. and Romslo, I. (1985). Iron uptake and heme synthesis by isolated rat liver mitochondria. Diferric transferrin as iron donor and the effect of pyrophosphate. *Biochim. Biophys. Acta* 842, 162-169.
88. Morley, C.G.D. and Bezkorovainy, A. (1983). Identification of the iron chelate in hepatocyte cytosol. *IRCS Med. Sci.* 11, 1106-1107.
89. Evans, W.H. (1981). Membrane traffic at the hepatocyte's sinusoidal and canalicular surface domains. *Hepatology* 1, 452-457.
90. Morell, A.G., Irvine, R.A., Sternleib, I., Scheinberg, I. and Ashwell, G. (1968). Physical and chemical studies on ceruloplasmin: V. Metabolic studies on sialic acid-free ceruloplasmin in vivo. *J. Biol. Chem.* 243, 155-159.
91. Ashwell, G. and Morell, A.G. (1974). The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition and transport of circulating glycoproteins. *Adv. Enzymol.* 41, 99-128.
92. Schwartz, A.L. (1984). The hepatic asialoglycoprotein receptor. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 16, 207-233.
93. Harford, J. and Ashwell, G. (1985). Chemical and physical properties of the hepatic receptor for asialoglycoproteins. In: *Endocytosis*, I. Pastan and M.C. Willingham, eds., pp 69-83.
94. Stockert, R.J. (1983). Asialoglycoproteins: Hepatic clearance and degradation of serum proteins. In: *Receptor-mediated endocytosis (Receptors and recognition, series B vol 15)*. P. Cuatrecasas and T.F. Roth, eds., pp. 167-185.
95. Ashwell, G. and Harford, J. (1982). Carbohydrate-specific receptors of the liver. *Ann. Rev. Biochem.* 51, 531-554.

96. Steer, C.J. and Ashwell, G. (1980). Studies on a mammalian hepatic binding protein specific for asialoglycoproteins. *J. Biol. Chem.* 255, 3008-3013.
97. Baenziger, J.U. and Fiete, D. (1980). Galactose and N-acetylgalactosamine-specific endocytosis of glycopeptides by isolated rat hepatocytes. *Cell* 22, 611-620.
98. Weigel, P.H. and Oka, J.A. (1983). The large intracellular pool of asialoglycoprotein receptors functions during the endocytosis of asialoglycoproteins by isolated rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 258, 5095-5102.
99. Lee, Y.C., Townsend, R.R., Hardy, M.R., Lönnngren, J., Arnarp, J., Haraldsson, M. and Lönn, H. (1983). Binding of synthetic oligosaccharides to the hepatic Gal/GalNAc lectin. *J. Biol. Chem.* 258, 199-202.
100. Hardy, M.R., Townsend, R.R., Parkhurst, S.M. and Lee, Y.C. (1985). Different modes of ligand binding to the hepatic galactose/N-acetylgalactosamine lectin on the surface of rabbit hepatocytes. *Biochemistry* 24, 22-28.
101. Baenziger, J.U. and Maynard, Y. (1980). Human hepatic lectin. Physicochemical properties and specificity. *J. Biol. Chem.* 255, 4607-4613.
102. Bezouska, K., Taborsky, O., Kubrycht, J., Pospisil, M. and Kocourek, J. (1985). Carbohydrate-structure-dependent recognition of desialylated serum glycoproteins in the liver and leucocytes. Two complementary systems. *Biochem. J.* 227, 345-354.
103. Bridges, K., Harford, J., Ashwell, G. and Klausner, R.D. (1982). Fate of receptor and ligand during endocytosis of asialoglycoproteins by isolated hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 350-354.
104. Harford, J., Bridges, K., Ashwell, G. and Klausner, R.D. (1983). Intracellular dissociation of receptor-bound asialoglycoproteins in cultured hepatocytes. A pH-mediated nonlysosomal event. *J. Biol. Chem.* 258, 3191-3197.
105. Drevon, C.A., Tolleshaug, H., Carlander, B. and Berg, T. (1983). Metabolism of asialoglycoproteins in cultured rat hepatocytes: evidence for receptor mediated uptake and degradation which is not feed-back regulated. *Int. J. Biochem.* 15, 827-833.

106. Regoeczi, E., Taylor, P., Debanne, M.T., März, L. and Hatton, M.W.C. (1979). Three types of human asialotransferrin and their interactions with the rat liver. *Biochem. J.* 184, 399-407.
107. Tolleshaug, H., Chindemi, P.A. and Regoeczi, E. (1981). Diacytosis of human asialo transferrin type 3 by isolated rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 256, 6526-6528.
108. Regoeczi, E., Chindemi, P.A., Debanne, M.T. and Charlwood, P.A. (1982). Partial resialylation of human asialotransferrin type 3 in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 2226-2230.
109. Regoeczi, E., Chindemi, P.A. and Debanne, M.T. (1984). Partial resialylation of human asialotransferrin types 1 and 2 in the rat. *Can. J. Biochem. Cell. Biol.* 62, 853-858.
110. Regoeczi, E. and Koj, A. (1985). Diacytosis of human asialotransferrin type 3 in the rat liver is due to the sequential engagement of two receptors. *Exp. Cell. Res.* 160, 1-8.
111. Simmons, C.F. and Schwartz, A.L. (1984). Cellular pathways of galactose-terminal ligand movement in a cloned human hepatoma cell line. *Mol. Pharmacol.* 26, 509-519.

HOOFDSTUK 2

ALGEMENE METHODEN

In dit hoofdstuk worden de methoden beschreven die regelmatig gebruikt zijn in het in dit proefschrift beschreven onderzoek. De overige, meer specifieke methoden worden beschreven in de betreffende hoofdstukken.

1. Chemicaliën

Alle gebruikte chemicaliën waren van pro-analyse kwaliteit. "Phosphate-buffered saline" (PBS) volgens Dulbecco (1) was afkomstig van Oxford Ltd., U.K. Eagle's minimum essential medium (MEM) werd betrokken van Flow Laboratories, Irvine, Scotland, U.K.

2. Isotopen

De gebruikte radioactieve isotopen werden verkregen van The Radiochemical Centre, Amersham, Bucks, U.K. ^{59}Fe werd verkregen als $^{59}\text{Fe}(\text{III})$ citraat of $^{59}\text{FeCl}_3$ met een specifieke activiteit van 5-20 Ci/g ijzer.

^{125}I werd verkregen als NaI (IMS 30) of als Bolton en Hunter reagens met een specifieke activiteit van 2000 Ci/mmol.

3. Eiwitten

3.1 Transferrines

Humaan transferrine werd verkregen van Kabi, Zweden.

Rattetransferrine werd uit ratteserum geïsoleerd met behulp van affiniteitschromatografie over een antitransferrine CNBr-Sepharose-4B kolom (2).

Asialotransferrines werden bereid door digestie van transferrine met CNBr-Sepharose-4B gekoppeld neuraminidase. 20 mg neuraminidase (0,2 U/mg) werd gekoppeld aan 2,5 gram CNBr-Sepharose-4B volgens het voorschrift van Pharmacia. Het aldus geïmmobiliseerde neuraminidase werd in een BioRad Econo 70 kolom gepakt in 0,1 M citraat pH 5,6 en op deze kolom werd het te desialyleren transferrine geladen in dezelfde buffer. Na 2 dagen bij kamertemperatuur werd de kolom geëluëerd met dezelfde buffer. De mate van desialylering werd gecontroleerd met een siaalzuurbepaling en met analytische isoelec-

trische focusering; in alle gevallen was de desialylering voor 99-100% compleet.

3.2. Asialofetuline

Fetuline (van foetaal kalfsserum, Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.) werd op gelijksoortige wijze gedessialyleerd als hierboven beschreven voor transferrine. De met fetuline beladen kolom moest nu echter een week bij kamertemperatuur staan om 99-100% desialylering te bewerkstelligen.

4. Het radioactief merken van transferrine met ^{125}I en ^{59}Fe .

Transferrines werden radioactief gemerkt met ^{125}I volgens

- a) de methode van Katz (3) of
- b) de methode van Bolton en Hunter (4).

ad a) De molaire verhouding $\text{I} : \text{NaI}$ in de joderingsoplossing gebruikt bij de jodering volgens Katz was 1:2 of 1:1,3, afhankelijk van de gewenste specifieke activiteit van het transferrine. Bij een hoeveelheid van 15 mg transferrine in 0,1 M Tris/HCl pH 8,5 werd de joderingsoplossing gevoegd samen met het $\text{Na } ^{125}\text{I}$. Het mengsel werd overnacht bij 4°C geroerd en vervolgens werd het niet gebonden ^{125}I verwijderd door chromatografie over een anionenwisselaar (Amberlite IR Cl^-). De fracties met de hoogste ^{125}I activiteit werden samengevoegd.

ad b) 15 mg transferrine werd in 500 μl 0,1 M boraat pH 8,5 gevoegd bij 0,25 mCi drooggedampt Bolton en Hunter reagens. Dit mengsel werd 30 minuten geroerd bij 4°C . Het verkregen ^{125}I -transferrine werd van laagmoleculaire bijprodukten gezuiverd door gelfiltratie over Sephadex G25 in 0,05 M fosfaatbuffer pH 7,5. De eiwitfracties met de hoogste ^{125}I -activiteit werden samen-gevoegd.

De aldus gejodeerde transferrines werden ijzervrij gemaakt door tweemaal dialyse tegen 0,05 M NaAc/HAc, 0,02 M EDTA pH 5,0, gevolgd door driemaal dialyse tegen aqua bidest. Na tweemaal dialyse tegen 0,1 M Tris/HCl, pH 8,6 werd het transferrine gemerkt met ^{59}Fe door toevoegen van ^{59}Fe (III) citraat, of $^{59}\text{FeCl}_3$, al of niet verdund met ^{56}Fe (III) citraat, afhankelijk

van de gewenste specifieke aktiviteit. De totaal toegevoegde hoeveelheid ijzer bedroeg 300% van de theoretisch noodzakelijke hoeveelheid voor oplading tot diferri. Tegelijkertijd werd een 50-100 voudige overmaat NaHCO_3 toegevoegd als tegen-ion voor de ijzerbinding. De overmaat ijzer werd verwijderd door gelfiltratie over Sephadex G25 in 0,1 M Tris/HCl pH 8,5 en dialyse.

5. Isoëlectrische focussering

5.1 Preparatieve isoëlectrische focussering

Preparatieve isoëlectrische focussering werd uitgevoerd in Ultrodex granulaire gel met Ampholine pH 5-7. De bereiding van de gel en de focussering vonden in grote lijnen plaats volgens het voorschrift van LKB (Application Note 198) met enige wijzigingen zoals beschreven door van Eijk et al. (5). Om bij de kathode een voldoende hoge pH te verkrijgen, waarbij geen afsplitsing van ijzer van transferrine plaatsvindt, vond alvorens het transferrine sample op de gel aan te brengen, een voorfocussering plaats gedurende een uur bij 10°C. Stroomsterkte, voltage en vermogen werden begrensd op resp. 25 mA, 1200 V en 15 W. Vervolgens werd het transferrine in 0,05 M Tris/HCl pH 8,6 op de gel aangebracht op een afstand van ca. 1 cm van de kathode met behulp van electrodestrips en werd de focussering voortgezet tot de banden een optimale scherpte hadden. De verschenen banden werden uitgeschept en uit de gel geëlueerd met 0,05 M Tris/HCl pH 8,6. Van de verkregen frakties werd de ijzerbelading nagegaan door de ratio E470/E280 te bepalen en de zuiverheid werd getest door analytische isoëlectrische focussering.

5.2 Analytische isoëlectrische focussering

Analytische isoëlectrische focussering werd uitgevoerd in 2 mm polyacrylamide gel. De bereiding van de gel en de focussering vonden in grote lijnen plaats volgens het voorschrift van LKB (Application Notes 75 en 306) met enige wijzigingen zoals beschreven door van Eijk et al. (6) met Ampholine van pH 5-7 of pH 3-10. Ook hier vond eerst een voorfocussering plaats gedurende een uur. Stroomsterkte, voltage en vermogen werden begrensd op resp. 50 mA, 1200 V en 30 W. Ca 5 µl monster werd op ca 1 cm van de kathode opgebracht en de

focusering werd voortgezet gedurende 2 à 3 uur. Hierna werd de gel gekleurd met Coomassie Brilliant Blue G250.

6. **Siaalzuurbepaling**

De bepaling van het siaalzuurgehalte van de transferrines vond plaats volgens de methode van Horgan (7), waarbij de hydrolyse omstandigheden waren geoptimaliseerd voor de analyse van transferrine. Optimaal bleek een hydrolyse in 0,01 M H_2SO_4 bij 70°C gedurende 3 uur.

7. **Cellen**

7.1 **Rattereticulocyten**

In normale manlijke Wistar ratten werd een reticulocytose geïnduceerd door dagelijks gedurende 5 dagen 5-7 ml bloed af te nemen via orbita puncties, waarbij tussen de derde en vierde punctie een interval lag van twee dagen.

De ratten werden verbloed, waarbij het bloed werd opgevangen in 40 ml buizen met 50 E heparine. Op basis van een kleuring met Brilliant Cresyl Blue werd het reticulocytenpercentage vastgesteld. Dit bedroeg doorgaans 20-35%. De cellen werden afgecentrifugeerd en driemaal gewassen met ijskoude PBS, pH 7,4, waarbij ook de "buffy coat" werd verwijderd.

7.2 **Rattehepatocyten**

Rattehepatocyten werden verkregen door een collagenaseperfusie van de rattelever. Alle perfusiebuffers werden geëquilibreerd met 95% O_2 /5% CO_2 . Manlijke Wistar ratten van 200-300 g werden verdoofd door intraperitoneale injectie met pentobarbital. De buikholte werd geopend en één draadje werd onderdoor de vena cava gehaald craniaal van de renale vene. Twee draadjes werden onderdoor de leverpoortader gehaald. Vervolgens werd de poortader gecannuleerd (canule G18-0,5) en werd de canule vastgelegd door de twee draadjes aan te trekken. De perfusie werd gestart met 10 mM Hepes, 140 mM NaCl, 7 mM KCl, pH 7,6 met een snelheid van 12 ml/min. De vena cava werd craniaal van de renale vene afgesloten en caudaal ervan doorgeknipt, waarna de borstholte werd geopend. Twee draadjes werden onder door de vena cava gehaald, waarna deze door het atrium heen werd gecannuleerd

(canule G17-1,4). De perfusiesnelheid werd vervolgens opgevoerd tot 48 ml/min. Nadat 500 ml van de eerste buffer de lever had gepasseerd werd de perfusie vervolgd met een collagenasebuffer met de volgende samenstelling; 100 mM Hepes, 66 mM NaCl, 7 mM KCl, 3,6 mM CaCl₂, pH 7,4, bevattende 1% BSA en 0,05% collagenase. Bij deze perfusietaap werd de uitstromende perfusievloeistof gerecirculeerd tot de desintegratie van de lever voldoende ver was voortgeschreden. Het collagenase werd vervolgens verwijderd door perfusie met 150 ml 50 mM Hepes, 110 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,74 mM MgCl₂, 1,26 mM CaCl₂, pH 7,4, bevattende 1% BSA. De lever werd uitgeknipt en in een klein volume van de derde buffer werden de cellen voorzichtig losgemaakt. Na filtratie door twee lagen gaasdoek werden de hepatocyten afgecentrifugeerd in 30 seconden bij 50 g en 4°C en vervolgens driemaal gewassen met dezelfde buffer. De viability van de cellen werd gecontroleerd door kleuring met Trypan Blue. Bij deze kleuring blijven intacte cellen kleurloos, terwijl beschadigde cellen blauw kleuren. Alleen hepatocyten suspensies waarvan meer dan 80% levend was werden gebruikt voor incubatiestudies.

8. **Incubatie-experimenten**

8.1 **Reticulocyten**

Incubatie-experimenten met reticulocyten werden uitgevoerd in glazen buizen in een schudwaterbad bij 37°C en 4°C. In duplo werden $0,5-1 \times 10^8$ reticulocyten geïncubeerd met 2 nmol transferrine, gemerkt met ⁵⁹Fe of ¹²⁵I. Op het gewenste tijdstip werd de reactie gestopt door toevoegen van 5 ml ijskoude PBS, pH 7,4, waarna de cellen 3 minuten werden gecentrifugeerd bij 500 g en tweemaal nagewassen met PBS.

8.2 **Hepatocyten**

Gezien het feit dat de viability van de hepatocyten vrij snel terugloopt was het noodzakelijk om direct na isolatie de cellen voor incubatiestudies te gebruiken. De celconcentratie van de gebruikte suspensie werd achteraf bepaald door een eiwitbepaling volgens Markwell (8), waarbij ervan werd uitgegaan dat 1 mg eiwit overeenkomt met 1×10^6 hepatocyten. Doorgaans lag de celconcentratie van de suspensies tussen $0,5$ en 2×10^7 cellen per ml. Er werden verschil-

lende transferrine concentraties gebruikt. Het incubatiemedium had dezelfde samenstelling als de derde perfusiebuffer: 50 mM Hepes, 66 mM NaCl, 7 mM KCl, 0,74 mM MgCl₂, 1,26 mM CaCl₂, pH 7,4 met 1% BSA.

De experimenten werden uitgevoerd door een hoeveelheid van de celsuspensie met de gewenste hoeveelheid transferrine en eventueel andere eiwitten te incuberen in glazen erlenmeyers in een schudwaterbad van 37°C of 4°C. Op de geschikte tijdstippen werd in duplo een monster van 500 µl afgenomen en gebracht in 5 ml ijskoude PBS pH 7,4 en afgecentrifugeerd gedurende 3 min. bij 200 g en tweemaal nagewassen met PBS.

9. Radioactiviteitsmetingen

Metingen van ¹²⁵I en ⁵⁹Fe activiteit werden verricht met een Packard 500 C autogamma spectrometer.

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. van Eijk, H.G. and van Noort, W.L. (1976). Isolation of rat transferrin using CNBr activated Sepharose 4B. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 14, 475-478.
3. Katz, J.H. (1961). Iron and protein kinetics studied by means of doubly labeled human crystalline transferrin. *J. Clin. Invest.* 40, 2143-2152.
4. Bolton, A.E. and Hunter, W.M. (1973). The labeling of proteins to high specific radioactivity by conjugation to a ^{125}I -containing acylating agent. *Biochem. J.* 133, 529-539.
5. van Eijk, H.G., van Noort, W.L., Kroos, M.J. and van der Heul, C. (1980). Isolation of the two monoferric human transferrins by preparative isoelectric focussing. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 18, 563-566.
6. van Eijk, H.G., van Noort, W.L., Kroos, M.J. and van der Heul, C. (1978). Analysis of the iron-binding sites of transferrin by isoelectric focussing. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 16, 557-560.
7. Horgan, I.E. (1981). A modified spectrophotometric method for determination of nanogram quantities of sialic acid. *Clin. Chim. Acta* 116, 409-415.
8. 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.

HOOFDSTUK 3

INVLOED VAN DE KOOLHYDRAATKETENS OP DE TRANSFERRINE- EN IJZEROPNAME DOOR RATTE-RETICULOCYTEN

INLEIDING

In hoofdstuk 1 werd reeds melding gemaakt van de microheterogeniteit van humaan transferrine. Deze microheterogeniteit, die tot uiting komt bij een isoelectrische focusering van diferritransferrine (1,2), wordt veroorzaakt door verschillen in siaalzuurgehalte. Omdat de verdeling van de verschillende sialotransferrines in verschillende lichaamsvloeistoffen niet gelijk is (3) en omdat in sommige pathologische sera het patroon van normaal afwijkt (4), is het van belang na te gaan of de diverse transferrinevormen naast chemische verschillen ook functionele verschillen vertonen met betrekking tot de ijzerafgifte aan cellen.

In de nu volgende twee hoofdstukken worden incubatiestudies beschreven met diverse humane sialotransferrines, verkregen via preparatieve isoelectrische focusering, en twee celtypen die van belang zijn in het ijzermetabolisme:

- 1) reticulocyten, erythroïde voorlopers die ijzer opnemen voor de heemsynthese.
- 2) hepatocyten, die een belangrijke rol vervullen in de opslag van ijzervoorraden en ijzer opnemen voor inbouw in ferritine.

MATERIALEN EN METHODEN

Commercieel verkregen humaan transferrine werd opgeladen tot diferri en onderworpen aan een preparatieve isoelectrische focusering. De verkregen frakties werden verder gezuiverd via een tweede preparatieve isoelectrische focusering, waarna de zuiverheid werd getest met analytische isoelectrische focusering.

Daarnaast werd het siaalzuurgehalte bepaald.

Incubatie-experimenten werden uitgevoerd met rattereticulocyten en drie van de geïsoleerde frakties, alsmede een asialotransferrine, verkregen uit totaal humaan transferrine met behulp van neuraminidase zoals beschreven in hoofdstuk 2. Voor details van de overige hier vermelde technieken wordt eveneens verwezen naar hoofdstuk 2.

RESULTATEN

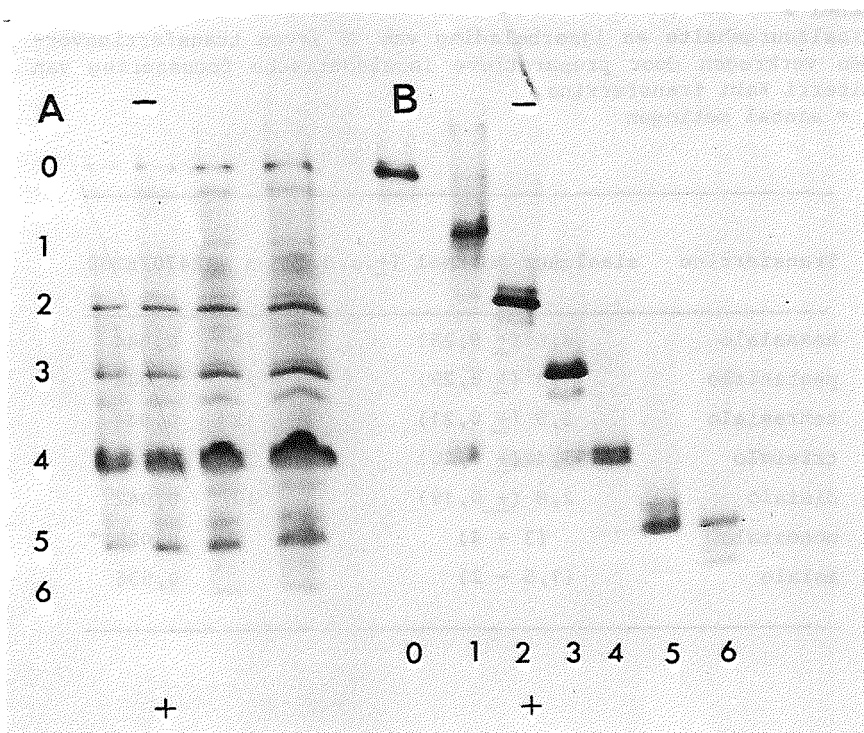
Opsplitsing van humaan transferrine

Preparatieve isoelectrische focussing leverde zeven frakties op met zeven verschillende pI's, die op basis van het focusseringspatroon voorlopig hexa-, penta-, tetra-, tri-, di-, mono- en asialo transferrine zijn genoemd. In figuur 1 is het focusseringspatroon te zien van het uitgangsmateriaal en de gezuiverde frakties. In tabel 1 is de samenstelling weergegeven van Kabi transferrine met betrekking tot de zeven frakties, alsmede de pI's en de vermoedelijke antennaire samenstelling. In tabel 2 zijn de resultaten te zien van de bepaling van het siaalzuurgehalte van de frakties, alsmede de contrôle op de ijzerbelading door middel van de bepaling van de ratio E470/E280. De waarden voor deze ratio van de monosialo en asialo frakties tonen aan dat deze frakties verontreinigd zijn met onvolledig beladen transferrine; met de beschikbare technieken was een verdere zuivering echter niet mogelijk, zodat een nadere analyse van deze frakties achterwege is gelaten. Om dezelfde reden werd voor incubatiedoeleinden een asialotransferrine gebruikt dat verkre-

Tabel 1

Isoelectrische punten en vermoedelijke structuur van de koolhydraatketens van zeven humane transferrinevormen verkregen door preparatieve isoelectrische focussing van diferri Kabi transferrine.

Transferrine	% in Kabi trans- ferrine	pI	antennaire structuur
hexasialo	4	5,45	2x triantennair
pentasialo	7	5,5	triantennair + biantennair
tetrasialo	69	5,6	2x biantennair
trisialo	8	5,7	2x biantennair
disialo	7	5,8	2x biantennair
monosialo	3	5,9	2x biantennair
asialo	2	6,0	2x biantennair



Figuur 1

Microheterogeniteit van humaan serum transferrine.

- A. Analytische isoelectrische focussering van vier verschillende concentraties totaal Kabi humaan diferri transferrine.
- B. Analytische isoelectrische focussering van de frakties verkregen door preparatieve isoelectrische focussering van Kabi transferrine.

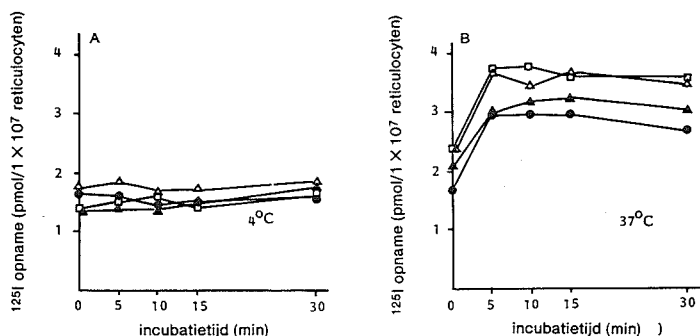
De getallen geven het verwachte siaalzuurgehalte aan.

Tabel 2

Siaalzuurgehalte en ijzerbelading van de zeven transferrinevormen verkregen door preparatieve isoelectrische focussing van diferri Kabi transferrine.

n = aantal metingen

Transferrine	siaalzuur mol/mol ($\pm$ s.d.)	n	E470/E280
hexasialo	4,6 ($\pm$ 0,28)	19	0,044
pentasialo	4,3 ($\pm$ 0,29)	21	0,044
tetrasialo	3,9 ($\pm$ 0,21)	12	0,044
trisialo	3,4 ($\pm$ 0,26)	22	0,042
disialo	2,8 ($\pm$ 0,19)	19	0,042
monosialo	(3 - 4)		0,028
asialo	(1,5 - 2)		0,036

**Figuur 2**

Opname door rattereticulocyten van diverse humane transferrinen. Reticulocyten werden geïncubeerd met ^{125}I -gemarkt hexasialo (Δ), tetrasialo ($\blacktriangle$), disialo ($\square$) en asialo ($\bullet$) transferrine bij 4°C (A) en 37°C (B).

gen was door behandeling van totaal Kabi transferrine met neuraminidase.

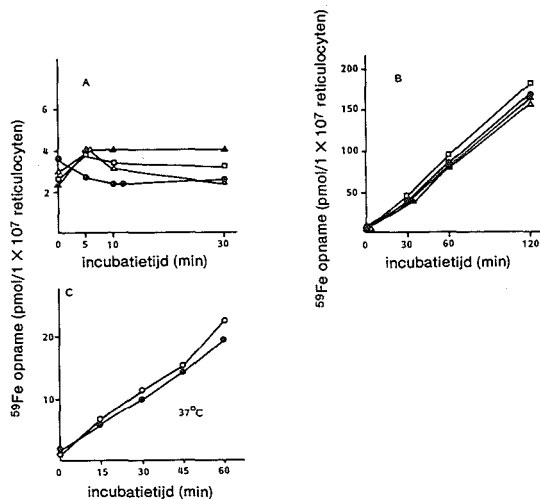
Opname van transferrine

Teneinde na te gaan wat de invloed is van verschillen in samenstelling van de koolhydraatketens op de binding en opname van transferrine door erythroïde voorlopers, werden rattereticulocyten geïncubeerd met diferri preparaten van ^{125}I -gemerkt hexa-, tetra-, di- en asialotransferrine bij 4°C en 37°C. De resultaten zijn weergegeven in figuur 2A (4°C) en 2B (37°C). Bij geen van de twee temperaturen zijn significante verschillen te constateren tussen de vier transferrinevormen. Uit het resultaat bij 4°C kan geconcludeerd worden dat er evenveel transferrinereceptoren beschikbaar zijn voor alle transferrinevormen. Het resultaat bij 37°C laat zien dat alle transferrinevormen na binding aan de receptor met dezelfde snelheid worden geprocessed, dat wil zeggen: bij alle vormen zien we wat de ^{125}I activiteit betreft een steady-state na 5 à 10 minuten, waarbij de binding van nieuw diferritransferrine gelijke tred houdt met het afstoten van apo- of monoferrittransferrinemoleculen.

IJzeropname

Het feit dat de verschillende sialotransferrines geen significante verschillen vertonen in hun binding aan reticulocyten sluit niet uit dat er verschillen kunnen zijn in de afgifte van ijzer. Om dit te onderzoeken werden rattereticulocyten geïncubeerd met ^{59}Fe -gemarkte diferri preparaten van hexa-, tetra-, di- en asialotransferrine bij 4°C en 37°C.

Bij 4°C (figuur 3A) zien we bij alle vier transferrines alleen receptorbinding en geen ijzerafgifte in de loop van de tijd. Bij 37°C treedt ijzerafgifte aan de cel op, resulterend in een lineaire ijzeropname gedurende tenminste 2 uur (figuur 3B). Er zijn geen significante verschillen te bespeuren tussen de sialotransferrines. Echter, we mogen deze conclusie alleen trekken voor het geval waarin de sialotransferrines afzonderlijk aan de cel worden aangeboden. Onder fysiologische condities wordt de reticulocyt evenwel geconfronteerd met een mengsel van alle verschillende sialotransferrines en is het niet uitgesloten dat er een competitive voorkeur bestaat voor de ene vorm boven de andere, waarbij de tetrasialovorm de meest waarschijnlijke kandidaat zou zijn voor het genieten van zo'n voorkeur, aangezien het de meest voorkomende vorm is en



Figuur 3

Opname van ijzer door rattereticulocyten van diverse humane transferrinen.

(A) en (B): Reticulocyten werden geïncubeerd met ^{59}Fe -gemerkt hexasialo (Δ), tetrasialo ($\blacktriangle$), disialo ($\square$) en asialo ($\bullet$) transferrine bij 4°C (A) en 37°C (B).

(C): Reticulocyten werden geïncubeerd bij 37°C met ^{59}Fe -gemerkt tetrasialotransferrine ($\bullet$) in aanwezigheid van een equimolaire hoeveelheid ^{56}Fe -beladen asialotransferrine en met ^{59}Fe -gemerkt asialotransferrine ($\circ$) in aanwezigheid van een equimolaire hoeveelheid ^{56}Fe -beladen tetrasialotransferrine.

de asialovorm, in feite een incompleet molecule, de minst waarschijnlijke. Figuur 3C toont het resultaat van een experiment ter controle hierop. Rattereticulocyten werden geïncubeerd met een equimolair mengsel van ^{59}Fe -tetrasialotransferrine en ^{56}Fe -asialotransferrine en in een parallel experiment met een equimolair mengsel van ^{59}Fe -asialotransferrine en ^{56}Fe -tetrasialotransferrine. De opname van ^{59}Fe was in beide gevallen gelijk zodat men kan concluderen dat rattereticulocyten geen voorkeur hebben voor de ene transferrinevorm boven de andere.

DISCUSSIE

De heterogeniteit van humaan serumtransferrine is al sinds een aantal jaren bekend en is aangetoond met verschillende technieken (1,2,5,6,7).

De oorzaak ervan ligt in verschillen in structuur en samenstelling van de koolhydraatketens. De microheterogeniteit zoals die zichtbaar wordt bij een isoelectrische focussering wordt, afgezien van de ijzerbelading, toegeschreven aan verschillen in siaalzuurgehalte (2,6). In dit hoofdstuk is een scheiding van humaan transferrine in zeven frakties beschreven met behulp van isoelectrische focussering.

Op basis van het focusseringspatroon zijn deze frakties voorlopig hexa-, penta-, tetra-, tri-, di-, mono- en asialotransferrine genoemd. Uit tabel 2 blijkt dat deze naamgeving evenwel niet geheel met de werkelijkheid overeenstemt; de gemiddelden van een aantal bepalingen resulteren niet in een eenvoudige reeks hele getallen van 0 tot 6. Een nadere beschouwing van het focusseringspatroon leert dat de hoofdbanden van de frakties omgeven zijn door talrijke kleine bandjes, wat het waarschijnlijk maakt dat de geïsoleerde frakties zelf ook nog mengsels zijn van verschillende vormen. Deze verschijnselen duiden erop dat naast de bekende microheterogeniteit een nog verdergaande "ultramicroheterogeniteit" bestaat die niet alleen veroorzaakt wordt door verschillen in de mate van sialylering, maar vermoedelijk ook door verschillen in de lokalisering van de siaalzuurresten op de antennes; een andere antennaire samenstelling dan de in tabel 1 vermelde meest voor de hand liggende; mogelijk spelen ook andere suikerresten dan siaalzuur hierbij een rol.

De "monosialo" en "asialo" frakties vertonen een E470/E280 ratio die te laag is voor diferri transferrine (2) en zijn vermoedelijk verontreinigd met respectievelijk monoferri TfFe(A) en apotransferrine. Een poging tot opladen van "mono-sialo" transferrine tot diferri resulteerde inderdaad in een focusseringspatroon met de hoofdband op de plaats van diferri tetrasialotransferrine. De werkelijk aanwezige hoeveelheid monosialo en asialotransferrine in Kabi transferrine is vermoedelijk miniem. Met vier transferrinevormen, variërend van de meest tot de minst gesialyleerde vorm zijn incubatiestudies uitgevoerd met rattereticulocyten. De resultaten bevestigen eerdere experimenten gedaan door van Eijk et al. (2). Alle experimenten laten gelijke opname zien van transferrine en ijzer bij alle geteste transferrine vormen. Dit suggereert dat de samenstelling van de koolhydraatketens geen invloed heeft op de binding van transferrine aan zijn specifieke receptor en evenmin op de daaropvolgende processen die resulteren in de afgifte van ijzer aan de cel. Daaruit kan geconcludeerd

worden dat de glycanen waarschijnlijk niet direkt betrokken zijn bij de bovengenoemde processen.

LITERATUUR

1. Hamann, A. (1977). Microheterogeneity of serum glycoproteins as revealed by flat-bed gel isoelectric focusing. In: *Electrofocusing and Isotachopheresis* (Eds.: Radola, B.J. and Graesslin, B.) pp 329-335. W. de Gruyter, Berlin.
2. van Eijk, H.G., van Noort, W.L., Kroos, M.J. and van der Heul, C. (1982). The heterogeneity of human serum transferrin and human transferrin preparations on isoelectric focusing gels; no functional difference of the fractions in vitro. *Clin. Chim. Acta* 121, 209-216.
3. van Eijk, H.G., van Noort, W.L., Kroos, M.J., Dekker, C.J. and van der Heul, C. (1983). The heterogeneity of human transferrin in biological fluids. Differences in physiological functions. 6th International Conference on Proteins of Iron Transport and Iron Storage, pp 261-265.
4. Stibler, H., Sydow, O. and Berg, S. (1980). Quantitative estimation of abnormal microheterogeneity of serum transferrin in alcoholics. *Pharmac. Biochem. Behav.* 13, Suppl. 1, 47-51.
5. Spik, G., Bayard, B., Fournet, B., Strecker, G., Bouquelet, S. and Montreuil, J. (1975). Studies on glycoconjugates LXIV. Complete structure of two carbohydrate units of human sero transferrin. *FEBS Letters* 50, 296-299.
6. Wong, K-L. and Regoeczi, E. (1977). Some observations on the carbohydrate composition of purified transferrin. *Int. J. Pept. Protein. Res.* 9, 241-248.
7. März, L., Hatton, M.W.C., Berry, L.R. and Regoeczi, E. (1982). The structural heterogeneity of the carbohydrate moiety of desialylated human transferrin. *Can. J. Biochem.* 60, 624-630.

HOOFDSTUK 4

INVLOED VAN DE KOOLHYDRAATKETENS OP DE TRANSFERRINE- EN IJZEROPNAME DOOR RATTEHEPATOCYTEN. VERGELIJKING VAN EEN HETEROLOOG EN EEN HOMOLOOG SYSTEEM

INLEIDING

In het vorige hoofdstuk is aangetoond dat de suikerketens van humaan transferrine vermoedelijk geen directe rol spelen bij de binding van transferrine aan de specifieke receptor op rattereticulocyten, noch op de daarop volgende processen die uiteindelijk leiden tot de afsplitsing van ijzer. In dit hoofdstuk wordt de studie met sialotransferrines uitgebreid tot ratteleverparenchymcellen of hepatocyten. In hepatocyten worden ijzervoorraden opgeslagen in de vorm van ferritine. Vele onderzoekers hebben aangetoond dat hepatocyten specifieke transferrinereceptoren bezitten (1,2,3), naast talrijke andere receptorsystemen, die voornamelijk gelokaliseerd zijn aan de sinusoidale zijde van de hepatocyt (4).

De meeste onderzoekers rapporteren een Tf-receptor aantal van ca. 40.000 per cel.

In dit hoofdstuk wordt nagegaan in hoeverre de samenstelling van de suikerketens van humaan transferrine invloed heeft op de binding en opname van transferrine door rattehepatocyten en op de daaropvolgende ijzerafsplitsing.

Daarnaast wordt een vergelijking gemaakt tussen dit heterologe systeem en een homoloog systeem, bestaande uit rattehepatocyten en ratte- transfer- rine.

MATERIALEN EN METHODEN

Voor de methoden, gebruikt bij de bereiding van de gebruikte eiwitten en voor de isolatie van rattehepatocyten wordt verwezen naar hoofdstuk 2.

Incubatie-experimenten met rattehepatocyten werden uitgevoerd als beschreven in hoofdstuk 2 met concentraties radioactief gemerkt transfer- rine van 1 en 20 µg/ml incubatiemengsel.

Bij experimenten met selectieve receptorblokkering werd, alvorens het gemerkte transferrine toe te voegen, een preïncubatie van 10 min. bij 4°C

uitgevoerd met ongemerkt tetrasialotransferrine in een concentratie van 500 µg/ml incubatiemengsel ter verzadiging van de Tf-receptor of met ongemerkt asialofetuline in een concentratie van 250 µg/ml incubatiemengsel ter verzadiging van de AsGP receptor of met beide, ter bepaling van de niet-specifieke opname. Bij de experimenten in het homologe systeem werd de Tf-receptor verzadigd met ongemerkt rattetransferrine.

Na de preïncubatie werd het gemerkte transferrine toegevoegd en werd het mengsel op 37°C gebracht.

RESULTATEN

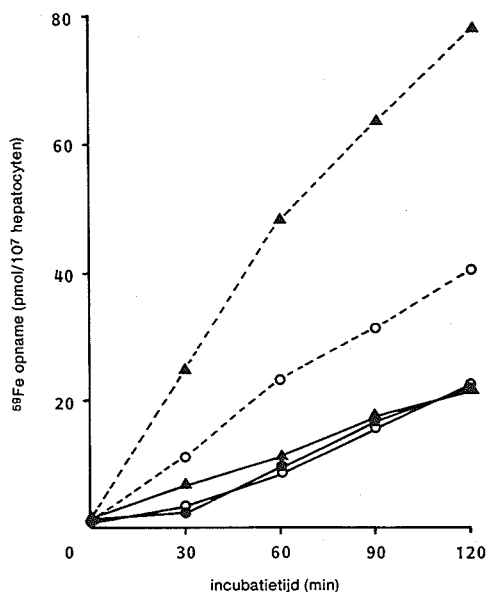
Heteroloog systeem

Eerst werden experimenten uitgevoerd om vast te stellen of de verschillende humane transferrines functionele verschillen vertonen wat betreft hun ijzer-afgifte aan rattehepatocyten. Daartoe werden hepatocyten geïncubeerd met ^{59}Fe gemerkte diferripreparaten van hexasialo-, tetrasialo-, disialo HTf en twee asialovormen: asialo-4 en asialo-6 HTf, respectievelijk bereid door desialylering van tetrasialo- en hexasialo HTf (Fig. 1). De ijzeropname van de drie sialotransferrines was gelijk. De opname van asialo-4 HTf was aanzienlijk hoger en de opname van asialo-6 HTf was ongeveer tweemaal zo hoog als van asialo-4 HTf. Dit resultaat werd toegeschreven aan de aanwezigheid van de galactosespecifieke asialoglycoproteïne receptor (AsGP-receptor) op hepatocyten. Dat de ijzeropname van asialo-6 HTf tweemaal zo hoog is als van asialo-4 HTf, vindt vermoedelijk zijn oorzaak in het grotere aantal geëxposeerde galactoseresiduen in asialo-6 HTf.

Deze waarnemingen doen de vraag rijzen in welke mate de twee receptor-systemen betrokken zijn in de opname van asialotransferrines. Om hierop een antwoord te vinden werden experimenten uitgevoerd met gedesialyleerd totaal HTf, gemerkt met ^{125}I en ^{59}Fe , waarbij de twee receptorsystemen selectief werden geblokkeerd. De transferrinereceptor werd geblokkeerd door preïncubatie van de cellen bij 4°C met een overmaat ongemerkt tetrasialo HTf en de AsGP receptor werd geblokkeerd met een overmaat asialofetuline (AsFet). Niet-specifieke opname werd bepaald door incubaties met een overmaat aan zowel tetrasialo HTf als AsFet. Teneinde na te gaan, of de verdeling van gemerkt AsHTf over de twee receptorsystemen

concentratie-afhankelijk is, werden de experimenten uitgevoerd bij twee AsHTf-concentraties van 1 $\mu\text{g/ml}$ en 20 $\mu\text{g/ml}$. (Fig.2).

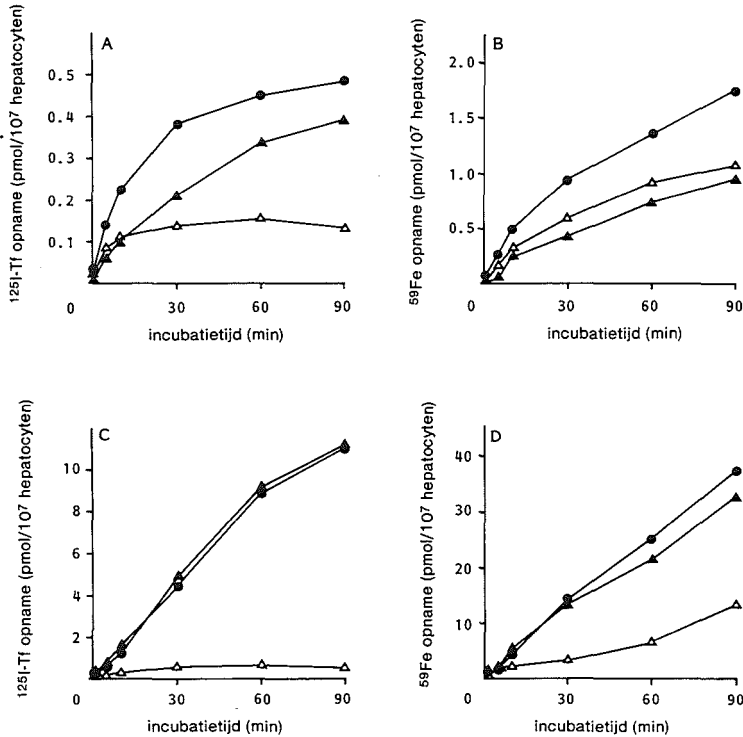
Bij een concentratie van 1 $\mu\text{g/ml}$ (Fig.2A en 2B) had blokkering van de Tf-receptor een reductie in eiwitopname van ca. 20% tot gevolg, terwijl de ijzeropname tot ongeveer de helft werd gereduceerd. Blokkering van de AsGP-receptor reduceerde de eiwitopname tot het niveau van de sialotransferrines en halveerde de ijzeropname. Bij een concentratie van 20 $\mu\text{g/ml}$ (Fig.2C en 2D) had blokkering van de Tf-receptor nauwelijks effect op zowel de eiwit- als de ijzeropname, terwijl blokkering van de AsGP-receptor de opname wederom terug bracht tot het niveau van de sialotransferrines. Deze waarnemingen suggereren dat de mate waarin het AsGP-receptorsysteem betrokken is bij de opname van AsHTf afhankelijk is van



Figuur 1

IJzeropname door rattehepatocyten van verschillende humane transferrines.

Hepatocyten werden geïncubeerd bij 37°C met 20 $\mu\text{g/ml}$ ^{59}Fe gemerkte sialotransferrines (getrokken lijnen): disialo (●), tetrasialo (○) en hexasialo HTf (▲) en twee gedesialyleerde transferrines (stippellijnen): asialo 4 (○) en asialo 6 HTf (▲).

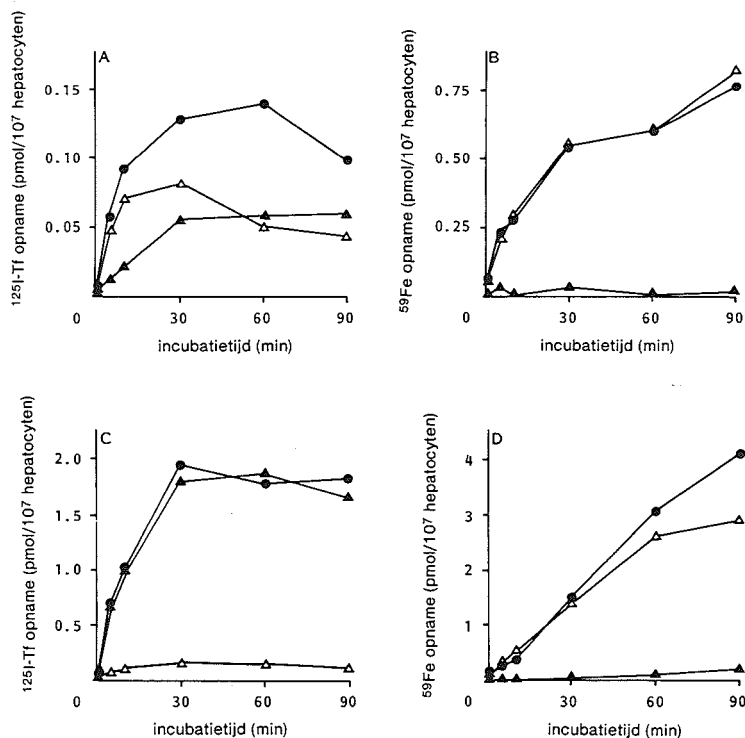


Figuur 2

Opname van humaan asialotransferrine door rattehepatocyten. Invloed van selectieve receptorverzadiging op eiwit- en ijzeropname. Hepatocyten werden bij 37°C geïncubeerd met 1 µg/ml (A,B), of 20 µg/ml (C,D) ^{125}I ^{59}Fe gemerkt AsHTf alleen (●), in aanwezigheid van 250 µg/ml asialo fetuïne (Δ), of 500 µg/ml ongemerkt tetrasialo HTf (▲).

De gegevens zijn gecorrigeerd voor niet-specifieke opname, bepaald in aanwezigheid van zowel asialofetuïne als tetrasialo HTf.

de AsHTf-concentratie: Als deze wordt verhoogd neemt ook het percentage van de totale opname waarvoor het AsGP systeem verantwoordelijk is, toe. De selectiviteit van de receptorblokkering werd gecontroleerd door het bovenbeschreven experiment te herhalen met 20 µg/ml gemerkt HTf in plaats van AsHTf. AsFet had geen invloed op transferrine- of ijzeropname, terwijl tetrasialo HTf de opname terugbracht tot niet-specifiek niveau.

**Figuur 3**

Opname van asialo rattetransferrine door rattehepatocyten. Invloed van selectieve receptorverzadiging op eiwit- en ijzeropname. Hepatocyten werden bij 37°C geïncubeerd met 1 µg/ml (A,B) of 20 µg/ml (C,D) ^{125}I ^{59}Fe gemerkt AsRTf alleen (●), in aanwezigheid van 250 µg/ml asialofetuline (Δ), of 500 µg/ml ongemerkt RTf (▲).

De gegevens zijn gecorrigeerd voor niet-specifieke opname, bepaald in de aanwezigheid van zowel asialofetuline als RTf.

Homoloog systeem

De bovenbeschreven experimenten zijn alle uitgevoerd in een heteroloog in vitro incubatiesysteem. Uiteraard is een homoloog systeem een betere benadering van de situatie in vivo. Daarom zijn dezelfde experimenten als bovenbeschreven met humaan asialotransferrine ook uitgevoerd met dubbelgemerkt ratte-asialotransferrine (AsRff) (Fig. 3). Bij een concentratie van 1 µg/ml werd de transferrine-opname door blokkering van de Tf-receptor gereduceerd met ca. 50%, bij 20 µg/ml was het effect zeer klein. Dit beeld lijkt op wat in het heterologe systeem werd gevonden.

Echter, de invloed van receptorblokkering op de ijzeropname is totaal anders dan in het heterologe systeem. Het blijkt dat bij beide concentraties verzadiging van de AsGP-receptor nauwelijks enige invloed heeft op de ijzeropname, terwijl blokkering van de Tf-receptor de ijzeropname vrijwel tot nul terugbrengt. Dit suggereert dat in dit homologe systeem alleen via de specifieke Tf-receptor transferrine-ijzer kan worden afgegeven aan de hepatocyt.

DISCUSSIE

Aangezien de ijzeropname van de sialo-HTf vormen gelijk is (Fig. 1), mogen we concluderen dat de suikerketens niet direct betrokken zijn bij de interactie van transferrine met zijn specifieke receptor op de hepatocyt, evenmin als dat bij de reticulocyt het geval was. Echter, incubatie van hepatocyten met gedesialyleerde transferrines resulteert in een veel hogere ijzeropname, wat veroorzaakt wordt door de aanwezigheid van de galactose-specifieke asialoglycoproteïne receptoren. De snelheid van de ijzeropname blijkt af te hangen van het aantal geëxposeerde galactoseresiduen: de opname van asialo-6 HTf (6 galactoses) is ca. 2 x de opname van asialo-4 HTf (4 galactoses). Dit stemt overeen met de waarnemingen van Debanne et al. (5), dat de affiniteit van humane asialo-transferrinen voor gezuiverde plasma membranen van de rattelever hoger is voor moleculen met triantennaire ketens dan voor moleculen met biantennaire ketens. Ook uit studies met synthetische oligosacchariden (6) is gebleken dat de affiniteit van het Gal/GalNac-specifieke leverlectine voor een ligand sterk toeneemt met toenemend aantal eindstandige galactoseresiduen.

Op basis van de in hoofdstuk 3 vermelde vermoedelijke antennaire samenstelling van disialotransferrine zou men verwachten dat deze HTf-vorm twee eindstandige galactoseresiduen heeft en derhalve aan de AsGP-receptor zou moeten binden. Dit blijkt niet het geval te zijn, aangezien er geen verhoogde ijzeropname van disialo HTf optrad (Fig.1). Uit koolhydraatanalyse van de diverse HTf-fracties is echter gebleken, dat in het algemeen het galactosegehalte gelijk is aan het siaalzuurgehalte (7), waaruit geconcludeerd kan worden dat laaggesialyleerde HTf-vormen van biosynthetische oorsprong geen eindstandige galactoseresiduen bezitten in

tegenstelling tot HTf-vormen waarvan het siaalzuur is afgesplitst met behulp van neuraminidase.

De experimenten met selectieve receptorblokkering leveren verder bewijs voor de betrokkenheid van het AsGP-receptorsysteem bij de opname van asialotransferrines, immers, blokkering van dit systeem heeft een aanzienlijke reductie in eiwitopname tot gevolg, zowel in het homologe als in het heterologe systeem. Verder suggereren deze experimenten, dat bij toenemende AsHTf-concentratie de opname in toenemende mate plaatsvindt via het AsGP-systeem ten koste van opname via het Tf-receptor-systeem, aangezien bij hoge concentratie verzadiging van de Tf-receptoren slechts een verwaarloosbaar effect heeft op zowel eiwit- als ijzeropname. Dit verschijnsel kan weer teniet gedaan worden door het AsGP-receptorsysteem te verzadigen. Een soortgelijke waarneming aangaande de concentratie-afhankelijkheid van de endocytose van AsHTf via het AsGP-systeem is ook gerapporteerd door de groep van Regoeczi (8,9); deze auteurs voeren als verklaring voor dit verschijnsel aan, dat AsHTf-moleculen bij hogere concentratie in staat zijn elkaars endocytose te bevorderen.

Homoloog AsRTf blijkt ook te kunnen binden aan beide receptorsystemen, in overeenstemming met de bevindingen van Young et al. (10). Het patroon van de eiwitopname (Fig. 3A en 3C) suggereert, dat de bovengenoemde verschuiving naar preferentiële opname via het AsGP-systeem ook hier plaatsvindt, maar te oordelen naar het patroon van de ijzeropname is er hier geen gelijktijdig verlies van opname via het Tf-receptorsysteem.

Het meest opvallende verschil tussen de twee incubatiesystemen is het effect van receptorblokkering op de ijzeropname. Uit de figuren 2B, 2D, 3B en 3D moeten we concluderen, dat in een heteroloog systeem via beide receptorsystemen ijzer wordt afgegeven aan de hepatocyt, terwijl in het homologe systeem alleen transferrine, dat via de Tf-receptor de cel binnenkomt zijn ijzer aan de cel afgeeft. De meest plausibele verklaring hiervoor lijkt de volgende:

In het homologe systeem wordt ijzerbeladen AsRTf dat via de AsGP-receptor de cel binnenkomt ongewijzigd weer als ijzerbeladen AsRTf geëxocytiseerd, terwijl AsRTf dat aan de Tf-receptor gebonden wordt de normale transferrinecyclus volgt. In het heterologe systeem wordt AsHTf dat via het AsGP-systeem binnenkomt naar lysosomen gedirigeerd en afgebroken, waarbij het ijzer vrij komt voor de cel.

Uit de hier gepresenteerde resultaten kunnen we niet concluderen of het concentratie effect, dat waargenomen is voor de endocytose, ook geldt voor de mate van afbraak van AsHTf, zoals beschreven voor AsHTf type 3 (9,11).

Wat betreft de hier voorgestelde diacytose van AsRTf via het AsGP-receptorsysteem is er een discrepantie met gegevens van Young et al. (10), die vonden dat AsRTf, opgenomen via het AsGP-systeem, voor 80% afgebroken de cel weer verlaat. Als dit in onze experimenten ook het geval was geweest, dan zou dit betekenen dat samen met de degradatie-produkten ook het ijzer de cel verlaten zou hebben, wat zeer onwaarschijnlijk lijkt. Onze bevindingen zouden alleen met die van Young te rijmen zijn, als het AsRTf-gebonden ijzer reeds aan de membraan wordt afgesplitst en aldus niet cel-geassocieerd wordt.

Samenvattend kunnen we stellen dat een toenemende AsTf-concentratie resulteert in een toenemende voorkeur voor het AsGP-receptorsysteem. In het heterologe systeem gaat dit gepaard met een verlies van binding aan het Tf-receptorsysteem, blijkbaar treedt dit verlies niet op in het homologe systeem in het geteste concentratiegebied. In het heterologe systeem wordt het AsTf dat via het AsGP-systeem de cel binnenkomt vermoedelijk afgebroken. Homoloog AsRTf dat binnenkomt via het AsGP-systeem wordt niet afgebroken, maar verlaat de cel als ijzertransferrine bij beide geteste concentraties. Deze verschillen in verwerking van asialotransferrines kunnen eenvoudigweg een gevolg zijn van het verschil in galactosegehalte van AsHTf (gemiddeld 4Gal/Tf) en AsRTf (gemiddeld 2Gal/Tf); dit zou zeer goed de sterke affiniteitsverhoging van AsHTf voor de AsGP-receptor bij stijgende concentratie kunnen verklaren.

Wat betreft de intracellulaire verwerking van de asialotransferrines is een andere verklaring, die wellicht overweging verdient, het bestaan van een herkenningssysteem voor soortspecificiteit. Een soortvreemd AsTf zou dan herkend kunnen worden als een ongewenst asialoglycoproteïne, voornamelijk bij hogere concentraties, en verwerkt worden via de voor asialoglycoproteïnen gebruikelijke weg, namelijk via lysosomale afbraak. Soort eigen AsRTf wordt als zodanig herkend en via een onbekend mechanisme gevrijwaard van lysosomale afbraak en intact uit de cel verwijderd, in welk proces het beschadigde proteïne mogelijk gerepareerd wordt door resialylering (12,13,14).

Verder onderzoek naar de intracellulaire gebeurtenissen, die plaats vinden na endocytose van asialotransferrines zal verder duidelijkheid moeten verschaffen hieromtrent.

LITERATUUR

1. Cole, E.S. and Glass, J. (1983). Transferrin binding and iron uptake in mouse hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 762, 102-110.
2. Young, S.P. and Aisen, P. (1980). The interaction of transferrin with isolated hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 633, 145-153.
3. Page, M.A., Baker, E. and Morgan, E.H. (1984). Transferrin and iron uptake by rat hepatocytes in culture. *Am. J. Physiol.* 246, G26-G33.
4. Evans, W.H. (1981). Membrane traffic at the hepatocyte's sinusoidal and canalicular surface domains. *Hepatology* 1, 452-457.
5. Debanne, M.T., Chindemi, P.A. and Regoeczi, E. (1981). Binding of asialo transferrins by purified rat liver plasma membranes. *J. Biol. Chem.* 256, 4929-4933.
6. Lee, Y.C., Townsend, R.R., Hardy, M.R., Lönngren, J., Arnarp, J., Haraldsson, M. and Lönn, H. (1983). Binding of synthetic oligosaccharides to the hepatic Gal/GalNAc lectin. *J. Biol. Chem.* 258, 199-202.
7. van Eijk, H.G., van Noort, W.L., Dekker, C.J. and van der Heul, C. (1984). A simple method for the separation and quantitation of neutral carbohydrates of glycoproteins in the one nanomole range on an adapted amino acid analyzer. *Clin. Chim. Acta* 139, 187-193.
8. Regoeczi, E., Taylor, P., Debanne, M.T., März, L. and Hatton, M.W.C. (1979). Three types of human asialo transferrins and their interactions with the rat liver. *Biochem. J.* 184, 399-407.
9. Tolleshaug, H., Chindemi, P.A. and Regoeczi, E. (1981). Diacytosis of human asialo transferrin type 3 by isolated rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 256, 6526-6528.
10. Young, S.P., Bomford, A. and Williams, R. (1983). Dual pathways for the uptake of rat asialo transferrin by rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 208, 4992-4976.
11. Tolleshaug, H. (1984). Intracellular segregation of asialotransferrin and asialofetuin following uptake by the same receptor system in suspended hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 803, 182-190.
12. Regoeczi, E., Chindemi, P.A., Debanne, M.T. and Charlwood, P.A. (1982). Partial resialylation of human asialotransferrin type 3 in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 2226-2230.

13. Debanne, M.T., Evans, W.H., Flint, N. and Regoeczi, E. (1982). Receptor-rich intracellular membrane vesicles transporting asialo transferrin and insulin in liver. *Nature* 298, 398-400.
14. Regoeczi, E., Chindemi, P.A. and Debanne, M.T. (1984). Partial resialylation of human asialotransferrin types 1 and 2 in the rat. *Can. J. Biochem.* 62, 853-858.

HOOFDSTUK 5

DE INTRACELLULAIRE WEG VAN ASIALOTRANSFERRINES IN RATTEHEPATOCYTEN

INLEIDING

In hoofdstuk 4 is op basis van opname-experimenten de hypothese geopperd dat AsHTf, wanneer het door rattehepatocyten geëndocyteerd wordt via het AsGP-receptor systeem tenminste gedeeltelijk wordt afgebroken en dat AsRTf tegen afbraak beschermd wordt en intact weer wordt geëxocyteerd. Deze hypothese impliceert verschillende intracellulaire wegen voor deze twee liganden. Het meest waarschijnlijk lijkt dat AsHTf tenminste voor een deel naar lysosomen getransporteerd zal worden en dat AsRTf van deze weg gevrijwaard zal blijven. In dit hoofdstuk worden enkele experimenten beschreven waarin met behulp van celfractionering deze hypothese getoetst wordt.

MATERIALEN EN METHODEN

UDP-¹⁴C galactose werd verkregen van The Radiochemical Centre, Amersham, Bucks, U.K.

Ovalbumine en ferritine (uit paardemilt) werden verkregen van Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.

Voor de isolatie van rattehepatocyten wordt verwezen naar hoofdstuk 2.

Hepatocyten werden 60 min. bij 37°C geïncubeerd als beschreven in hoofdstuk 2 met 20 µg/ml AsHTf, AsRTf of RTf. Bij incubaties met asialotransferrines werd de Tf-receptor geblokkeerd zoals beschreven in hoofdstuk 4. Na 60 min. incubatie werd de suspensie tot 0°C afgekoeld en de cellen werden gewassen met en opgenomen in 0,25 M sucrose, 10 mM Hepes, pH 7,4, 1 mM EDTA, 1% ethanol. De cellen werden gelyseerd door cavitatie na een verblijf van 30 min. bij 4°C in een stikstof cavitatiebom (Parr, type 4639, Molina, U.S.A.) onder een druk van 200 psi, gevolgd door 1-10 halen in een Potter-Elvehjem homogenisator.

De celfractioneringsmethode met behulp van isopycniche sucrosegradiënt centrifugatie was gebaseerd op een methode beschreven door Smith en Peters (1). Van het homogenaat werd 5 ml geladen op een 30 ml lineaire sucrosegradiënt (dichtheden 1,05 - 1,28 g/ml), die rustte op een 2 ml sucrose-kussen met dichtheid 1,32 g/ml en 16 uur gecentrifugeerd bij

27.000 rpm in een Beckman SW 27 rotor. Elke gradiënt werd gefractioneerd in 20-25 frakties, waarvan monsters werden onderzocht op ^{125}I en ^{59}Fe activiteit en activiteit van marker enzymen.

Zure fosfatase, 5'nucleotidase en succinaatdehydrogenase werden bepaald volgens de methoden van respectievelijk Walter en Schutt (2), Gerlach en Hilby (3) en Meyer et al (4). Galactosyltransferase werd bepaald door meting van de overdracht van ^{14}C -gemerkt galactose van UDP-galactose naar ovalbumine. Het reaktiemengsel, met een eindvolume van 0,1 ml, bevatte 62,5 mM Hepes, pH 6,8, 1 mM UDP- ^{14}C galactose (specifieke activiteit 0,4 mCi/mmol), 12,5 mM MnCl_2 , 0,5% Triton X-100, 1% ovalbumine en 25 μl monster. Na 60 min. incubatie bij 37°C werd de reactie gestopt door toevoeging van 1 ml 8% TCA. De pellet werd twee keer gewassen met 8% TCA en opgelost in 1 ml 1 M NaOH. Na neutraliseren met 1 M HCl werd de radioactiviteit gemeten van hoeveelheden van 1,8 ml, verdund met 10 ml Insta-gel (Packard) in een Searle Isocap 300 scintillatieteller.

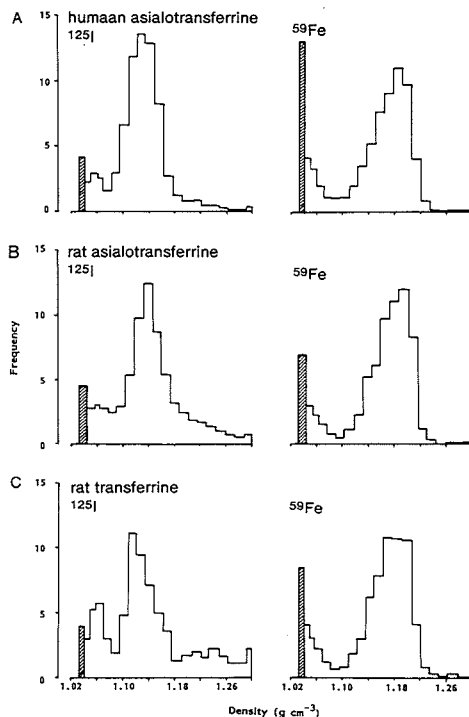
Met de verkregen gegevens werden frequency-density histogrammen geconstrueerd volgens de methode van Leighton et al. (5).

RESULTATEN EN DISCUSSIE

Zoals hierboven reeds gesteld werd was de verwachting, gebaseerd op de hypothese uit hoofdstuk 4, dat AsHTf tenminste voor een deel naar de lysosomen gedirigeerd zal worden en AsRTf niet. Als AsRTf gedurende de voor dit ligand voorgestelde diacytose geresialyleerd wordt (6,7), zou men verwachten dit aan te treffen in het Golgi-apparaat waar het systeem van glycosyltransferases gelokaliseerd is.

Hepatocyten werden 60 min. bij 37°C geïncubeerd met 20 $\mu\text{g/ml}$ dubbel gemerkt AsHTf en AsRTf, waarbij de Tf-receptor geblokkeerd werd. Bij deze concentratie vertonen beide asialotransferrines een voorkeur voor binding aan de AsGP-receptor (zie hoofdstuk 4). Ter vergelijking werd ook een incubatie uitgevoerd met 20 $\mu\text{g/ml}$ natief RTf, wat zoals bekend de transferrinecyclus volgt, een weg waarbij de lysosomen niet betrokken zijn.

Zoals te zien is in Fig. 1A en 1B sedimenteren beide asialotransferrines bij een dichtheid van ca. 1,14 g/ml, wat correspondeert met de sedimentatie van de Golgi marker galactosyltransferase (Fig. 2). Ook natief RTf sedimenteert bij deze dichtheid (Fig. 1C). Dit leidt tot de conclusie dat



Figuur 1

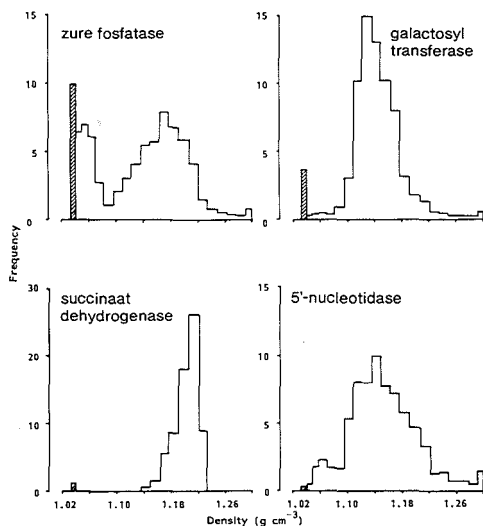
Frequency-density verdeling van ^{125}I en ^{59}Fe in sucrose gradiënt frakties van rattehepatocyten.

Hepatocyten werden 60 min. bij 37°C geïncubeerd met 20 $\mu\text{g/ml}$ dubbelgemerkt AsHTf (A), AsRTf (B), RTf (C). A en B na een preïncubatie van 10 min. bij 4°C met overmaat RTf.

Gearceerde blokken stellen de activiteit voor in de opbrengstlaag.

geen van de twee asialotransferrines naar de lysosomen wordt getransporteerd, maar dat beide liganden in structuren met lage dichtheid blijven gedurende de hele intracellulaire weg, wat een aanwijzing is voor een diacytose zoals ook natief RTf vertoont. Het feit dat de asialotransferrines bij dezelfde dichtheid sedimenteren als de marker van het Golgisysteem houdt de mogelijkheid open dat er resialylering van de asialotransferrines plaatsvindt gedurende hun intracellulaire weg. Echter het scheidend vermogen van deze techniek is niet voldoende om Golgi-vesicles te scheiden van andere kleine vesicles als bijvoorbeeld endosomen, zodat hieromtrent niets met zekerheid is te zeggen.

Ter controle van de lysosomale weg werd ook een incubatie uitgevoerd van

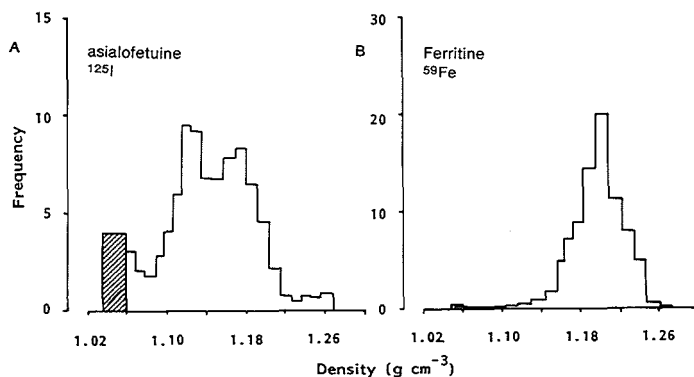


Figuur 2

Frequency-density verdeling van marker enzymen in sucrose gradiënt frakties van rattehepatocyten, geïncubeerd als in Fig. 1.

hepatocyten met 20 µg/ml ^{125}I -gemerkt asialofetueine. Zoals in Fig. 3A is te zien wordt na 60 min. bij 37°C ruwweg de helft van het ^{125}I aangetroffen in frakties met een dichtheid van ca. 1,18 g/ml, overeenkomend met de sedimentatie van de lysosomale marker zure fosfatase (Fig. 2). De andere helft, die bij lagere dichtheden sedimenteert, bevindt zich vermoedelijk in endosomen of overgangsstructuren tussen endosomen en lysosomen (8).

Het ijzer dat door de hepatocyten is opgenomen van de twee asialotransferrines en rattetransferrine komt in alle drie de gevallen terecht in een brede piek met een dichtheid van 1,18 - 1,20 g/ml (Fig. 1) en is vermoedelijk geïncorporeerd in cytosolferritine aangezien een hoeveelheid ferritine, opgeladen met ^{59}Fe en direct geladen op de gradiënt, bij dezelfde dichtheid bleek te sedimenteren (Fig. 3B). Hierbij dient vermeld te worden dat de hoeveelheid ijzer, geaccumuleerd van AsRTf, evenals bij de experimenten beschreven in hoofdstuk 4 zeer klein was. De hoogte van de pieken in de hier weergegeven frequency-density histogrammen is dan



Figuur 3

- A. Frequency-density verdeling van ^{125}I in sucrose gradiënt frakties van rattehepatocyten na 60 min. incubatie bij 37°C met 20 µg/ml ^{125}I -asialofetuin.
- B. Frequency-density verdeling van ^{59}Fe in sucrose gradiënt frakties van 100 µg ^{59}Fe -gemerkt ferritine direct geladen op de gradiënt. Het ferritine werd op de gradiënt gebracht in 5 ml homogenisatiebuffer.

ook niet evenredig met absolute hoeveelheden ijzeropname maar is slechts een maat voor de relatieve hoeveelheden in de frakties.

Concluderend kan gesteld worden dat zowel AsHTf als AsRTf bij concentraties, waarbij voorkeur bestaat voor opname via het AsGP-receptor systeem, worden gevrijwaard van een lysosomale weg, wanneer ze via dit systeem worden opgenomen. Desalniettemin suggereert het verschil in ijzerafgifte via dit systeem een verschil in intracellulaire behandeling. De aard van dit verschil blijft echter vooralsnog onduidelijk.

LITERATUUR

1. Smith, G.D. and Peters, T.J. (1980). Analytical subcellular fractionation of rat liver with special reference to the localisation of putative plasma membrane marker enzymes. *Eur. J. Biochem.* 104, 305-311.
2. Walter, K. and Schutt, Ch. (1974). In: *Methods of enzymatic analysis*, vol. 2. Ed. Bergmeyer, H.U. (Academic Press, New York, London) pp 856-870.
3. Gerlach, U. and Hilby, W. (1974). In: *Methods of enzymatic analysis*. Vol. 2. Ed. Bergmeyer, H.U. (Academic Press, New York, London) pp. 871-873.
4. 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. *Histochemistry* 51, 297-303.
5. Leighton, F., Poole, B., Beaufay, H., Baudhuin, P. Coffey, J.W., Fowler, S. and De Duve, C. (1968). The large-scale separation of peroxisomes, mitochondria and lysosomes from the livers of rats injected with Triton WR-1339. Improved isolation procedures, automated analysis, biochemical and morphological properties of fractions. *J. Cell. Biol.* 37, 482-512.
6. Regoeczi, E., Chindemi, P.A., Debanne, M.T. and Charlwood, P.A. (1982). Partial resialylation of human asialotransferrin type 3 in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 2226-2230.
7. Regoeczi, E., Chindemi, P.A. and Debanne, M.T. (1984). Partial resialylation of human asialotransferrin types 1 and 2 in the rat. *Can. J. Biochem. Cell. Biol.* 62, 853-858.
8. Debanne, M.T., Bolyos, M., Gauldie, J. and Regoeczie, E. (1984). Two populations of prelysosomal structures transporting asialoglycoproteins in rat liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 2995-2999.

HOOFDSTUK 6

DE INTERAKTIE VAN TRANSFERRINE EN ASIALOTRANSFERRINE MET LEVERCELLEN IN VIVO

INLEIDING

In de vorige hoofdstukken zijn experimenten beschreven, waarin de interactie werd bestudeerd van transferrines met hepatocyten in vitro. Daarbij werd ervan uitgegaan dat hepatocyten specifieke receptoren voor transferrine bezitten.

Recentelijk echter is in de literatuur twijfel uitgesproken over het bestaan van transferrinereceptoren op hepatocyten (1,2). Volgens de betreffende onderzoekers zijn endotheelcellen de enige levercellen die specifieke Tf-receptoren bezitten.

Het leverendotheel zou zo transferrine uit de circulatie opnemen en het ijzer doorgeven aan het aangrenzende weefsel. De verzadigbare, receptor-gemedieerde opname van transferrine, die doorgaans gevonden wordt in studies met hepatocyten-suspensies zou volgens deze auteurs een gevolg zijn van verontreiniging van deze suspensies met endotheelcellen. Dit was aanleiding om de specificiteit van de transferrine-opname door levercellen in vivo te onderzoeken. Hiertoe werd gebruik gemaakt van een systeem, ontwikkeld om de receptor-afhankelijke opname van liganden met de diverse levercellen te bepalen (3,4).

Bij deze methode wordt een radioactief gemerkt ligand geïnjecteerd en na de gewenste circulatietijd wordt een leverperfusie gestart bij lage temperatuur, 8°C, teneinde het metabolisme stil te leggen, een leverlobje wordt afgebonden ter bepaling van de totale leveropname en vervolgens worden celscheidings- en zuiveringsprocedures uitgevoerd bij 8°C om de cel-geassocieerde radioactiviteit van parenchym-, endotheel- en Kupffer-cellen vast te stellen. Dit onderzoek is zowel met natief rattetransferrine als met asialorattetransferrine uitgevoerd. Dit onderzoek vond plaats in nauwe samenwerking met Prof. Dr. Th.J.C. van Berkel, destijds verbonden aan de afdeling Biochemie I.

MATERIALEN EN METHODEN

Metrizamide werd verkregen van Neijegaard & Co. A/S, Oslo, Noorwegen. Mannaan, N-acetyl-D-galactosamine en N-acetyl-D-glucosamine werden verkregen van Sigma.

In vivo serumverdwijning en leverassociatie

Gedurende deze studie werden 12 weken oude Wistar ratten gebruikt. De ratten werden verdoofd door intraperitoneale injectie met 20 mg Nembutal. De buikholte werd geopend, waarna het gemerkte transferrine geïnjecteerd werd in de vena cava ter hoogte van de renale vene. De lichaamstemperatuur van de rat werd op 36,5 - 37°C gehouden met behulp van een infrarode lamp. Op de aangegeven tijdstippen werd 0,2 ml bloed afgenomen uit de vena cava op tenminste 2 cm distaal van het injectiepunt. De monsters werden 2 min. gecentrifugeerd bij 20.000 g en de radioactiviteit werd gemeten in de supernatant. Op de aangegeven tijdstippen werd een leverperfusie gestart. Na wegen van een leverlobje en bepaling van de radioactiviteit, werd de totale leveropname berekend, waarbij gebruik werd gemaakt van de aanname, dat de lever 3,75% uitmaakt van het totale lichaamsgewicht (3).

Celisolatie

Verdoving en injectie met gemerkt transferrine geschiedde als bovenbeschreven. Op de aangegeven tijdstippen na injectie werd de leverpoortader gecannuleerd en werd een leverperfusie gestart met Hanks buffer pH 7,4 plus Hepes (2,4 g/l) bij 8°C.

Na 8 minuten perfusie met een snelheid van 14 ml/min. werd een lobje afgebonden ter bepaling van de totale leveropname. Om de diverse celtypen te scheiden werd de lever vervolgens onderworpen aan een lage temperatuur perfusie (8°C) met 0,05% collagenase. De scheiding van parenchymcellen bij 8°C werd uitgevoerd als beschreven door Nagelkerke et al. (3).

Een verdere onderverdeling van het niet-parenchymcellen preparaat in endotheel- en Kupfercellen werd uitgevoerd als beschreven (3).

Fig. 1 toont een schema van de totale celisolatieprocedure. Tijdens de isolatie procedures bij lage temperatuur trad geen verlies op van ¹²⁵I-aktiviteit of vorming van zuur-oplosbare aktiviteit, wat leidt tot een kwantitatieve opbrengst van de totale lever-geassocieerde aktiviteit

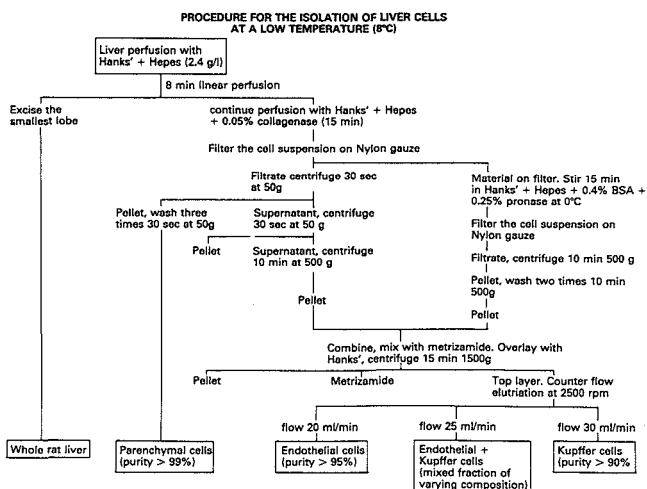
in de geïsoleerde cellen. Dit werd na elke celisolatie gecontroleerd door de uit de relatieve bijdrage van de drie celtypen berekende en de gemeten totale leverassociatie met elkaar te vergelijken. Wat betreft de ^{125}I -activiteit varieerden de opbrengst percentages tussen 92 en 104%.

De opbrengst van ^{59}Fe van transferrine en asialotransferrine was aanzienlijk lager dan van het eiwit (zie Fig. 3 en 5), met percentages variërend van 47 - 62% na 5 min. circulatie, 37 - 42% na 30 min. en 27 - 31% na 120 min. circulatie.

Omrekening van de bijdrage van de verschillende celtypen tot de totale leveropname werd uitgevoerd als beschreven (3). De zuiverheid van de celpreparaten werd microscopisch gecontroleerd na kleuring op peroxidase en door bepaling van de verdeling van de isoenzymen van pyruvaat kinase (3).

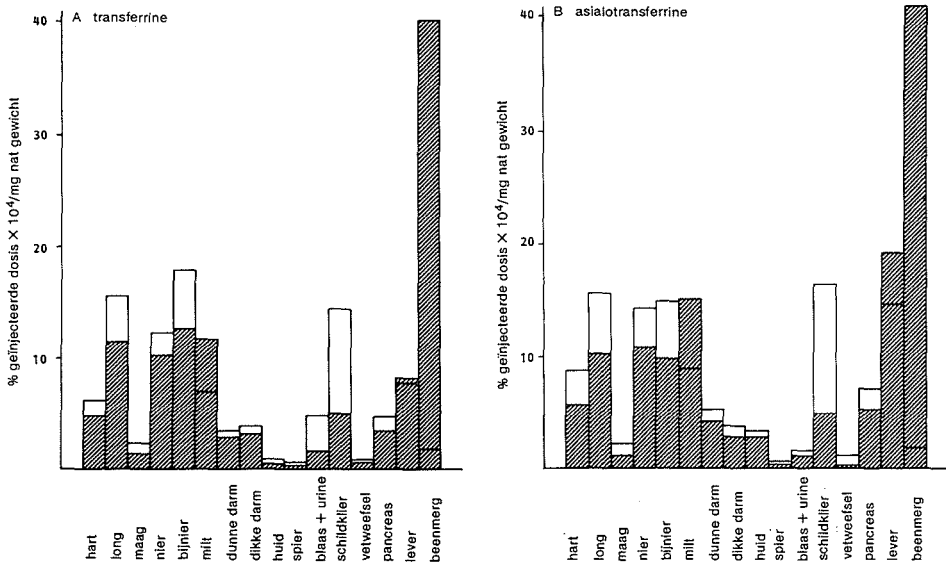
Verdeling van (asialo) transferrine over de weefsels

(Asialo)transferrine werd geïnjecteerd en na 30 min. werden de weefsels verwijderd, gewogen en werd de radioactiviteit gemeten.



Figuur 1

Schematische voorstelling van de levercelisolatieprocedure.



Figuur 2

Verdeling over de weefsels van ^{125}I ^{59}Fe -rattetrasferrine en ^{125}I ^{59}Fe -asialorattetrasferrine 30 min. na injectie.

Diferri RTf (0,38 mg) of diferri AsRTf (0,38 mg) werd geïnjecteerd in verdoofde ratten en na 30 min. werd de rat gedood, snel afgekoeld tot 4°C en werden de diverse organen verwijderd, gewogen en werd de radioactiviteit gemeten. De waarden zijn gegeven als percentage van de geïnjecteerde dosis x 10⁴ mg nat gewicht. Gearceerde blokken stellen de ^{59}Fe activiteit voor, open blokken de ^{125}I activiteit.

RESULTATEN

Verdeling van transferrine en asialotrasferrine over de weefsels

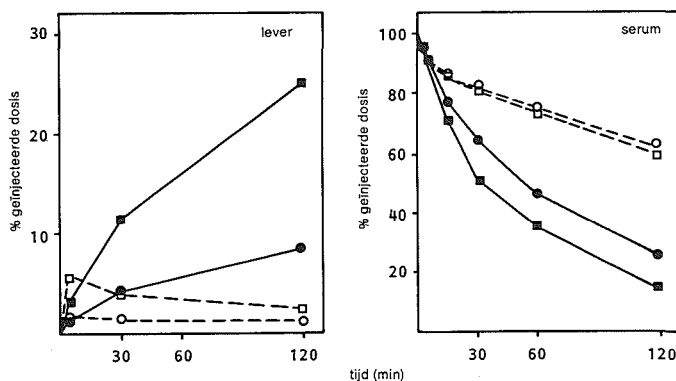
Om de weefsel-specificiteit van de ijzeropname van transferrine en asialotrasferrine na te gaan werd bepaald welk percentage van de geïnjecteerde dosis geassocieerd was met de verschillende organen en weefsels na 30 min. circulatie (Fig.2 A,B). Alleen lever, milt en beenmerg vertoonden een $^{59}\text{Fe}/^{125}\text{I}$ verhouding die hoger was dan die van het toegediende transferrine. De hoogste verhouding werd gevonden in het beenmerg. Injectie van transferrine en asialotrasferrine resulteerde in gelijkscortige opnamepatronen met uitzondering van een duidelijk verhoogde leveropname van asialotrasferrine.

De tijdsafhankelijke accumulatie in de lever van ^{59}Fe , aangeleverd door transferrine of asialotransferrine (Fig.3) toont aan, dat de opname reeds 30 min. na injectie significant is. Hierbij zij opgemerkt, dat in deze experimenten een lage temperatuur-perfusie van de lever heeft plaatsgevonden, zodat een bijdrage van het bloed aan de gemeten waarde vermeden is. Uit het verschil in verloop van de serumverdwijningscurves van ^{125}I en ^{59}Fe blijkt, dat reeds 15 min. na injectie ijzerafgifte moet hebben plaatsgevonden (Fig. 3).

Terwijl de ^{125}I -aktiviteit in serum voor Tf en AsTf vergelijkbaar is, is te zien, dat er een meer actieve ^{59}Fe afgifte heeft plaatsgevonden van AsTf, die verklaard kan worden uit de hogere opname door de lever.

Cellulaire verdeling van (asialo)transferrine in de lever

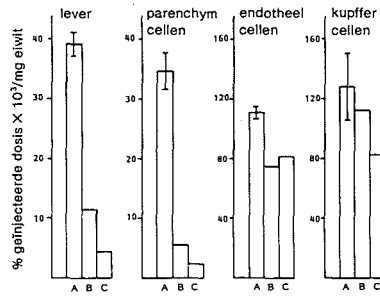
Teneinde de waarde vast te stellen van het celisolatiesysteem, weergegeven in Fig. 1, werd de cellulaire opname bepaald van ^{125}I -asialofetuin (Fig. 4). Tien min. na injectie was $77 \pm 3\%$ ($n=3$) van de geïnjecteerde dosis aanwezig in de lever.



Figuur 3

Leverassociatie en serumverdwijning van ^{125}I ^{59}Fe rattetransferrine en ^{125}I ^{59}Fe asialorattetransferrine. Diferri RTf (0,40 mg) of diferri AsRTf (0,40 mg) werd geïnjecteerd in verdoofde ratten en de serumverdwijning en leverassociatie van ^{125}I -RTf (O), ^{125}I -AsRTf (□), ^{59}Fe -RTf (●) en ^{59}Fe -AsRTf (■) werden bepaald op de aangegeven tijdstippen. De serumverdwijningswaarden zijn de gemiddelden van 3 - 5 onafhankelijke experimenten met een standaardafwijking van 1 - 2%.

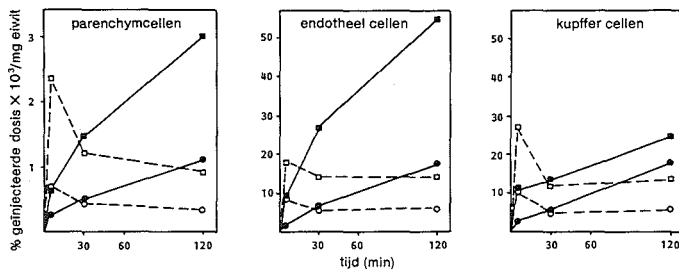
De levers werden geperfundeerd gedurende 8 min. om een bijdrage van het bloed aan de leverwaarden te vermijden.



Figuur 4

Het effect van een preinjectie met asialofetuline op de associatie van ^{125}I -asialofetuline met parenchym-, endotheel- en Kupffercellen.

^{125}I -AsFet (9 μg) werd geïnjecteerd in verdoofde ratten, die 1 min. tevoren een preinjectie toegediend hadden gekregen van 5 mg AsFet (B), 25 mg AsFet (C) of alleen oplosmiddel (A). Tien minuten na injectie van ^{125}I -AsFet werd een leverperfusie gestart en de totale leverassociatie (na 8 min. perfusie bij 8°C) en de associatie met de vervolgens geïsoleerde parenchym-, endotheel- en Kupffercellen werd bepaald.



Figuur 5

Tijdsafhankelijke associatie van ^{125}I ^{59}Fe RTf en ^{125}I ^{59}Fe AsRTf met parenchym-, endotheel- en Kupffercellen.

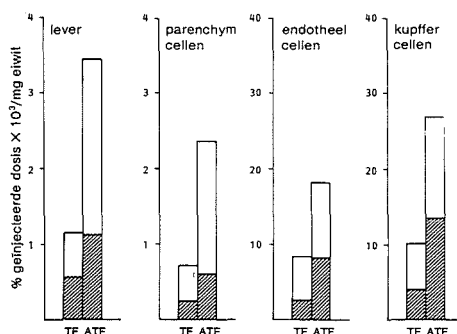
Diferri RTf (0,40 mg) of diferri AsRTf (0,40 mg) werd geïnjecteerd in verdoofde ratten. Op de aangegeven tijdstippen werd een celscheiding gestart en de celassociatie van ^{125}I -RTf (○), ^{125}I -AsRTf (□), ^{59}Fe van RTf (●) en ^{59}Fe van AsRTf (■) werd bepaald.

Tabel 1

Relatieve bijdrage van de verschillende leverceltypen aan de totale leveropname van asialofetuïne, transferrine en asialotransferrine.

De hoeveelheid radioactiviteit/mg celeiwit in de geïsoleerde celpreparaten werd vermenigvuldigd met de hoeveelheid eiwit, die elk celtype bijdraagt aan de totale hoeveelheid levereiwit. Voor transferrine en asialotransferrine zijn de waarden berekend uit de waarden voor de celopname 2 uur na injectie, voor asialofetuïne werd de waarde van 10 min. na injectie gebruikt.

Celtype	AsFet	^{125}I -Tf	^{59}Fe -Tf	^{125}I -AsTf	^{59}Fe -AsTf
parenchym- cellen (%)	83	44	51	51	53
endotheel- cellen (%)	9	32	27	28	35
Kupffer- cellen (%)	8	24	22	21	12

**Figuur 6**

Het effect van een preïnjectie met transferrine of asialofetuïne op de celassociatie van ^{125}I -RTf of ^{125}I -ASRTf met parenchym-, endotheel- en Kupffercellen.

^{125}I -RTf (TF 0,40 mg) of ^{125}I -ASRTf (ATF 0,40 mg) werd geïnjecteerd in verdoofde ratten. Gearceerde blokken bij TF stellen de celassociatie voor van ^{125}I -RTf na een preïnjectie 2 min. vóór ^{125}I -RTf met ongelabeld RTf.

Gearceerde blokken bij ATF stellen de celassociatie voor van ^{125}I -ASRTf na preïnjectie met 25 mg AsFet. Open blokken stellen de celassociatie voor na preïnjectie van alleen de oplosbuffer. De celscheidingsprocedure werd gestart 5 min. na injectie van het gemerkte transferrine.

Uitgedrukt per mg celeiwit is de associatie van ^{125}I -asialofetuline met Kupffer- en endotheelcellen ongeveer driemaal zo hoog als met parenchymcellen.

Wanneer rekening gehouden wordt met de bijdrage, die elk celtype levert aan de totale hoeveelheid celeiwit in de lever (parenchymcellen 92,5%, endotheelcellen 3,3%, Kupffercellen 2,5%), kunnen de percentages van de totale leveropname berekend worden, waarvoor de diverse celtypes verantwoordelijk zijn (3). Voor parenchymcellen is dit percentage 82,5%, voor endotheelcellen 9,3% en voor Kupffercellen 8,2%. Associatie met hoge affiniteit (effecieve competitie door ongelabeld asialofetuline) wordt alleen aangetroffen bij parenchymcellen.

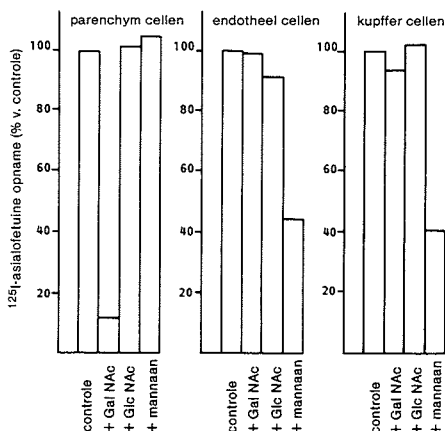
Voor de associatie van ^{125}I -Tf met de lever zijn zowel de parenchymcellen als de niet-parenchymcellen verantwoordelijk (Fig. 5). Verrassend is, dat ^{125}I -AsTf in alle drie celtypen leidt tot een verhoogde celassociatie, vergeleken met sialo Tf.

Kort na de injectie is de specifieke activiteit, uitgedrukt per mg celeiwit, in endotheel- en Kupffercellen ongeveer 10 maal zo hoog als in parenchymcellen (zie ook Fig. 6). Bij langere circulatietijden is deze factor zelfs nog hoger (15 - 20 x).

Omrekenen van specifieke activiteiten naar de relatieve bijdrage aan de totale leveropname (Tabel 1) laat zien, dat ongeveer de helft van de totale leveropname geassocieerd is met de parenchymcellen, ongeveer 30% met endotheelcellen en ongeveer 20% met Kupffercellen. Deze percentages zijn berekend uit de gegevens na 120 min. circulatie. Na 5 min. en 30 min. circulatie zijn de waarden voor parenchymcellen 55 - 67%, resp. 53 - 60%, voor endotheelcellen 17 - 26%, resp. 22 - 34% en voor Kupffercellen 18 - 22%, resp. 15 - 18%.

Het effect van asialofetuline en ongelabeld transferrine

De rol van de bindingsplaatsen met hoge affiniteit voor Tf in de interactie met de verschillende levercellen werd onderzocht door middel van een injectie met een overmaat ongelabeld Tf, 2 min. voor toediening van het radioactieve ligand. Vijf min. na injectie van ^{125}I -Tf werden de cellen geïsoleerd en werd de cel-geassocieerde radioactiviteit gemeten (Fig. 6). De associatie van ^{125}I -Tf met de cellen blijkt bij alle drie celtypen op gelijksoortige wijze geremd te worden door een overmaat onge-



Figuur 7

Het effect van een preïnjectie met GalNAc, GlcNAc of mannaan op de celassociatie van ^{125}I -AsFet met parenchym-, endotheel- en Kupffercellen.

^{125}I -AsFet (9 μg) werd geïnjecteed in verdoofde ratten 1 min. na een injectie met 0,5 mmol GalNAc, 0,5 mmol GlcNAc, 5 mg mannaan of alleen het oplosmiddel van deze verbindingen (controle). Tien min. na injectie van ^{125}I -AsFet werd de celisolatieprocedure gestart. De waarden zijn gegeven als percentages van de controle.

labeld Tf.

Een preïnjectie met 25 mg asialofetueine reduceerde de associatie van ^{125}I -AsTf met de verschillende levercellen tot een niveau, gelijk aan dat van het gesialyleerde Tf.

Het effect van GalNAc, GlcNAc en mannaan

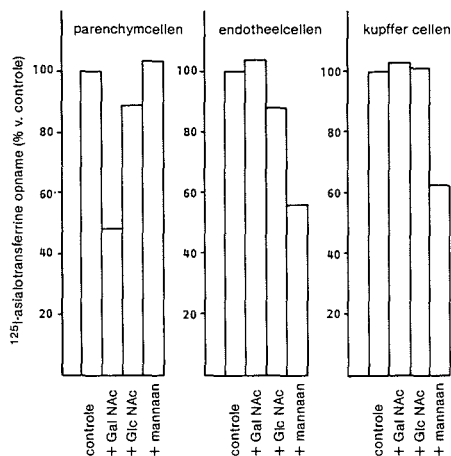
De suikerspecificiteit van de cel-associatie van ^{125}I -asialofetueine en ^{125}I -asialotransferrine werd onderzocht door middel van preïnjecties met competitieve suikers.

Een preïnjectie met GalNAc blokkeerde de opname van ^{125}I -AsFet door parenchymcellen vrijwel volledig (Fig. 7). Daarentegen werd de associatie met endotheel- en Kupffercellen niet beïnvloed door GalNAc, terwijl een preïnjectie met mannaan specifiek de opname door endotheel- en Kupffercellen reduceerde.

De opname van ^{125}I -AsTf door hepatocyten werd met meer dan 52% teruggebracht door een preïnjectie met GalNAc (Fig. 8). Hierbij moet opgemerkt worden, dat de associatie van het gesialyleerde Tf met de cellen ongeveer 30% is van die van AsTf, zodat de maximale inhibitie door een competitief suiker 70% bedraagt. Evenals bij ^{125}I -AsFet heeft GalNAc geen invloed op de interactie van ^{125}I -AsTf met endotheel- of Kupffercellen, terwijl ook hier mannaan specifiek effect heeft.

DISCUSSIE

De gegevens tonen aan, dat het met de hier gebruikte levercel isolatieprocedure mogelijk is, in vivo de specifieke interactie van transferrine en asialotransferrine met de verschillende leverceltypen vast te stellen. De evaluatie van de methode met behulp van ^{125}I -asialofetueine levert als



Figuur 8

Het effect van een preïnjectie met GalNAc, GlcNAc of mannaan op de celassociatie van ^{125}I -AsRTf met parenchym-, endotheel- en Kupffercellen.

^{125}I -AsTf (0,38 mg) werd geïnjecteerd in verdoofde ratten 1 min. na een injectie met 0,5 mmol GalNAc, 0,5 mmol GlcNAc, 5 mg mannaan of alleen het oplosmiddel van deze verbindingen (controle). Vijf min. na injectie van ^{125}I -AsRTf werd de celisolatieprocedure gestart. De waarden zijn gegeven als percentages van de controle.

uitkomst dat 83% van het met de lever geassocieerde ligand teruggevonden wordt in de hepatocyten. Preinjectie met 5 en 25 mg ongelabeld AsFet brengt een reductie teweeg in de associatie van ^{125}I -AsFet met de parenchymcellen van respectievelijk 84,2% en 92,6%. Met een autoradiografische methode vonden Hubbard et al. (5), dat 20 mg ongelabeld AsFet de associatie van ^{125}I -AsFet met parenchymcellen voor 99% verhindert en met endotheel- en Kupffercellen voor 24%. Met onze cel-isolatiemethode vinden wij voor laatstgenoemde celtypen inhibitie percentages van 22,3% en 28,5% met respectievelijk 5 en 25 mg ongelabeld AsFet. Een vergelijking van de autoradiografische data met onze celisolatie data laat dus een zeer goede overeenstemming zien. De specifieke interactie van Tf met de leverendotheel- en Kupffercellen, uitgedrukt per mg celeiwit, was minstens het tienvoudige van de opname door parenchymcellen. Echter, omdat deze celtypen slechts resp. 3,3 en 2,5% van het levereiwit bevatten (3), is hun relatieve bijdrage aan de totale leveropname niet meer dan resp. 35 en 24%. De leverparenchymcellen zijn dus verantwoordelijk voor meer dan 44% van de leveropname van transferrine.

De betrokkenheid van een bindingsplaats met hoge affiniteit voor Tf bij de opname door parenchym-, endotheel- en Kupffercellen in vivo wordt gesuggereerd door het opnameblokkerende effect van een overmaat ongelabeld Tf. Bovendien gaat in alle drie celtypen de opname van Tf gepaard met ijzerafgifte. Dit is in tegenspraak met de bewering, dat voor ijzerafgifte aan parenchymcellen transcytose door endotheelcellen noodzakelijk is (1,2). Hierbij moet men zich realiseren, dat parenchymcellen in direct contact staan met de bloedstroom, aangezien leverendotheelcellen fenestrae bevatten van ca. 100 nm (6), waardoor vrije uitwisseling mogelijk is van componenten uit sinusoidaal bloed met de ruimte van Disse. De kwantitatieve aspecten van de ijzeropname in de geïsoleerde cellen moeten echter voorzichtig geïnterpreteerd worden omdat, in tegenstelling tot het ^{125}I -eiwit, een deel van het ^{59}Fe verloren gaat bij de celisolatie-procedure.

De verhoogde interactie van gedesialyleerd Tf met de levercellen wordt verondersteld plaats te vinden via een receptor die ook hoge affiniteit bezit voor asialofetueine (7). Inderdaad vinden we dat de opnameverhoging van AsTf, vergeleken met Tf, volledig teniet wordt gedaan door een overmaat AsFet in alle drie celtypen. Wat betreft Kupffer- en endotheelcellen was de verhoogde opname onverwacht en competitie-experimenten

met verschillende suikers waren nodig om de specificiteit van de herkenning vast te stellen. De verhoogde interactie van AsTf met parenchymcellen werd specifiek verhinderd door GalNAc en werd niet beïnvloed door GlcNAc of mannaan.

Eenzelfde resultaat werd verkregen met ^{125}I -AsFet, wat erop duidt dat de herkenning van AsTf door leverparenchymcellen geschiedt door een galactosespecifieke receptor.

Echter noch de interactie van AsTf noch van AsFet met Kupffer- en endotheelcellen werd beïnvloed door GalNAc. Deze gegevens sluiten de mogelijkheid uit, dat galactose-receptoren van niet-parenchymcellen AsTf of AsFet binden (8). Deze celtypen bezitten evenwel mannose-specifieke receptoren (9,10) en competitie-experimenten met mannaan duiden er inderdaad op, dat mannose residuen betrokken zijn bij de interactie van AsTf en AsFet met Kupffer- en endotheelcellen. Dit vormt tegelijkertijd een verklaring voor het blokkerende effect van AsFet op de binding van AsTf aan deze celtypen. Het is bekend, dat de verwijdering van siaalzuur van koolhydraatketens niet alleen de eindstandige galactosegroepen blootstelt aan receptorherkenning, maar ook verderop in de keten gelegen koolhydraten (5). Aangezien de mannoseresiduen in AsTf en AsFet op gelijksoortige wijze in de ketens ingebouwd zijn, is het resultaat dat beide liganden na desialylering een verhoogde interactie met Kupffer- en endotheelcellen te zien geven.

De verhoogde interactie van AsTf met de diverse levercellen leidt in vivo blijikbaar ook tot een verhoogde ijzerafgifte. Wat betreft de parenchymcellen is dit in tegenspraak met de resultaten uit de in vitro experimenten, beschreven in hoofdstuk 4. Daar werd gevonden, dat AsRTf juist geen extra ijzer aan hepatocyten afgeeft. De naar aanleiding daarvan geopperde veronderstelling dat AsRTf niet afgebroken zou worden, wordt evenwel ondersteund door de waarneming dat de verhoogde ijzerafgifte van AsTf aan de lever, vergeleken met Tf, niet leidt tot een evenredig verlaagde serumwaarde van ^{125}I -AsTf; dit duidt erop, dat in vivo ^{125}I -AsTf na ijzerafgifte weer intact in de circulatie terecht komt. De oorzaak van de discrepantie tussen de resultaten van de in vivo en de in vitro experimenten betreffende de ijzerafgifte is vooralsnog onduidelijk.

Tot slot kan gesteld worden dat parenchym-, Kupffer- en endotheelcellen alle drie tegelijkertijd betrokken zijn bij de interactie van Tf en AsTf met de lever en dat bij de studies over de rol van de lever in het

metabolisme van (As)Tf, alle drie celtypen betrokken zullen moeten worden.

LITERATUUR

1. Soda, R. and Tavassoli, M. (1984). Liver endothelium and not hepatocytes or Kupffer cells have transferrin receptors. *Blood* 63, 270-276.
2. Kishimoto, T. and Tavassoli, M. (1985). Endothelial binding of transferrin in fractionated liver cell suspensions. *Biochim. Biophys. Acta* 846, 14-20.
3. Nagelkerke, J.F., Barto, K.P. and van Berkel, Th.J.C. (1983). In vivo and in vitro uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein by rat liver endothelial, Kupffer and parenchymal cells. *J. Biol. Chem.* 258, 12221-12227.
4. van Berkel, Th.J.C., Kruijt, J.K., Spanjer, H.H., Nagelkerke, J.F., Harkes, L. and Kempen, H.J.M. (1985). The effect of a water-soluble Tris-galactoside-terminated cholesterol derivative on the fate of low density lipoproteins and liposomes. *J. Biol. Chem.* 260, 2694-2699.
5. Hubbard, A.L., Wilson, G., Ashwell, G. and Stukenbrok, H. (1979). An electron microscope autoradiographic study of the carbohydrate recognition systems in rat liver. I. Distribution of ¹²⁵I-ligands among the liver cell types. *J. Cell. Biol.* 83, 47-64.
6. Wisse, E. (1970). An electron microscopic study of the fenestrated endothelial lining of rat liver sinusoids. *J. Ultrastruct. Res.* 31, 125-150.
7. Ashwell, G. and Morell, A.G. (1974). The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition and transport of circulating glycoproteins. *Adv. Enzymol.* 41, 99-128.
8. Kolb-Bachofen, V., Schlepper-Schäfer, J. and Vogell, W. (1982). Electron microscopic evidence for an asialoglycoprotein receptor on Kupffer cells: localization of lectin-mediated endocytosis. *Cell* 29, 859-866.
9. Steer, C.J. and Clarenburg, R. (1979) Unique distribution of glycoprotein receptors on parenchymal and sinusoidal cells of rat liver. *J. Biol. Chem.* 254, 4457-4461.
10. Achord, D.T., Brot, F.E., Bell, C.E. and Sly, W.S. (1978). Human β -glucuronidase: in vivo clearance and in vitro uptake by a glyco-

protein recognition system on reticuloendothelial cells. Cell 15,
269-278

ALGEMENE DISCUSSIE

Over de functie van de oligosaccharideketens van glycoproteïnen bestaat tot op heden veel onzekerheid. Werd in het verleden weinig aandacht aan glycoproteïneglycanen geschonken in de veronderstelling dat de enige functie van koolhydraten die van voedselreserve was, in de loop der jaren is duidelijk geworden dat de koolhydraatketens op glycoproteïnen een wezenlijk onderdeel vormen van het glycoproteïne en essentieel zijn voor de structuur en functië van het glycoproteïne. Men neemt aan dat ze functies vervullen in biologische herkenningsprocessen en in de stabilisering van de tertiaire structuur van glycoproteïnen. Membraanglycoproteïnen zouden als structurele componenten van de membraan kunnen fungeren en aldus de membraanstructuur stabiliseren (1,2). Echter omtrent de moleculaire mechanismen waarop deze processen berusten is weinig bekend.

Aan de siaalzuren, die veelal als eindstandig suiker van de ketens worden aangetroffen wordt wel een rol toegeschreven als maskering van herkenningsplaatsen op glycoproteïnemoleculen (3). Voorbeelden van deze maskering zijn o.a. de fagocytose door macrofagen van erythrocyten waarvan het siaalzuur verwijderd is met behulp van sialidase en, het bekendste voorbeeld, het wegvangen van asialoglycoproteïnen uit de circulatie door de lever. Verder is bekend dat membranen van tumorcellen een groot aantal siaalzuurresten bevatten en mogelijk zijn deze verantwoordelijk voor de kennelijk efficiënte bescherming van deze cellen tegen de immuunafweer.

Omtrent de betekenis van de heterogeniteit van glycoproteïne-glycanen die behalve bij transferrine ook bij veel andere glycoproteïnen wordt aangetroffen, is nog weinig bekend.

Algemeen wordt aangenomen dat deze heterogeniteit niet een gevolg is van degradatie en evenmin een artefact van de gebruikte isolatietechniek, maar een biosynthetisch verschijnsel, waarvan de regulering vermoedelijk in het Golgi-systeem plaatsvindt (4).

In dit proefschrift is een onderzoek beschreven dat tot doel had na te gaan of de heterogeniteit van de glycanen van humaan transferrine betekenis heeft voor de herkenning door de specifieke transferrinereceptor op ratte reticulocyten en ratte hepatocyten of op de afgifte van ijzer aan deze celtypen. Het blijkt dat de transferrinereceptoren op beide

celtypen geen onderscheid maken tussen de diverse humane transferrinevormen, bovendien is ook de ijzerafgifte van alle transferrinevormen gelijk. Waarschijnlijk zijn de koolhydraatketens dan ook niet direct betrokken bij de herkenning van transferrine door zijn receptor op deze cellen, noch bij de daaropvolgende processen die leiden tot de afgifte van ijzer. Gezien het feit dat de transferrinereceptoren op alle weefsels vermoedelijk identiek zijn (5,6), geldt deze conclusie waarschijnlijk voor alle celtypen. De vraag blijft of er betekenis moet worden toegekend aan de microheterogeniteit. Het is bekend dat bij sommige ziekten een afwijkend microheterogeniteitspatroon van transferrine wordt aangetroffen. Er zijn aanwijzingen dat ook tijdens zwangerschap een afwijkend patroon bestaat waarbij relatief meer hoger gesialyleerd transferrine voorkomt. In overeenstemming hiermee is de waarneming dat bij de cavia de verhouding tussen "fast" en "slow" transferrine, waarbij "fast" de sterker geglycosyleerde vorm is, tijdens zwangerschap omhoog gaat (7). Het is dus denkbaar dat de heterogeniteit een functie heeft tijdens de zwangerschap, wanneer een massaal ijzertransport van de moederlijke naar de foetale circulatie plaats moet vinden en men zou zich voor kunnen stellen dat er dan een afwijkende placentaire transferrine-receptor wordt gesynthetiseerd met hoge affiniteit voor sterker geglycosyleerde transferrinevormen. Overigens blijkt uit een studie van Raynes (8) dat niet alleen de glycosylering van transferrine maar ook die van andere plasma glycoproteïnen omhoog gaat tijdens zwangerschap. Hij toont aan dat dit geschiedt onder invloed van oestrogeen en concludeert hieruit dat vermoedelijk de glycosylering van alle plasma glycoproteïnen onder hetzelfde hormonale reguleringsysteem valt.

Als het eindstandige siaalzuur van humaan transferrine wordt verwijderd blijkt dit geen invloed te hebben op de opname door reticulocyten; hepatocyten daarentegen nemen gedesiayleerd transferrine op zowel via de transferrinereceptor als via de galactosespecifieke asialoglycoproteïne (AsGP) receptor; de snelheid van opname via dit laatste systeem is afhankelijk van het aantal geëxposeerde galactose residuen en van de concentratie. Voor het homologe rat asialotransferrine blijkt hetzelfde te gelden. De afgifte van ijzer echter, die in het heterologe systeem via beide receptorsystemen optreedt, vindt in het homologe systeem alleen via de transferrinereceptor plaats. Er moet dus een verschil zijn in de intracellulaire verwerking van asialotransferrinen afkomstig van de mens

en van de rat, wanneer ze geëndocyteerd worden via het AsGP-receptor systeem. Onze onderzoekingen tonen echter aan dat beide asialotransferrinen gedurende hun intracellulaire verblijf in structuren met lage dichtheid blijven en niet met lysosomen geassocieerd raken, zoals de meeste asialoglycoproteïnen. Verder onderzoek zal nodig zijn om het verschil in ijzerafgifte te verklaren.

Tijdens het uitvoeren van het onderzoek, beschreven in dit proefschrift, verschenen in de literatuur berichten als zouden leverparenchymcellen geen specifieke receptoren voor transferrine bezitten; alleen op het leverendotheel zouden transferrinereceptoren voorkomen (9,10). Uit onze onderzoekingen met rattetransferrine in vivo blijkt echter dat zowel hepatocyten als Kupffer- en endotheelcellen receptoren voor transferrine bezitten. Zeer recent hebben Vogel et al. (11) een onderzoek gepubliceerd met geïsoleerde parenchymale en niet-parenchymale cellen, waarin onze waarnemingen worden bevestigd. Desialylering van rattetransferrine blijkt zoals verwacht ook in vivo een verhoogde associatie met hepatocyten tot gevolg te hebben. Opmerkelijk is echter dat ook niet-parenchymcellen een verhoogde associatie van rat asialotransferrine te zien geven; bekend is weliswaar dat ook deze cellen een Gal/GalNAc-specifiek receptor systeem bezitten doch dit systeem heeft alleen hoge affiniteit voor galactose exposerende partikels van ≥ 17 nm en bindt geen circulerende asialoglycoproteïnen (12). De door ons waargenomen verhoogde associatie van asialotransferrine blijkt tot stand te komen via een mannose-specifiek receptorsysteem, wat ook asialofetuline blijkt te binden. Deze waarneming vormt een illustratie van de hierboven gememoreerde maskerende functie van het eindstandige siaalzuur; desialylering maakt niet alleen het galactose toegankelijk voor herkenning, maar ook het verderop in de keten gelegen mannose.

LITERATOUR

1. Berger, E.G., Buddecke, E., Kamerling, J.P., Kobata, A., Paulson, J.C. and Vliegenthart, J.F.G. (1982). Structure, biosynthesis and functions of glycoprotein glycans. *Experientia* 38, 1129-1162.
2. Schachter, H. (1984). Glycoproteins: their structure, biosynthesis and possible clinical implications. *Clin. Biochem.* 17, 3-14.
3. Schauer, R. (1985). Sialic acids and their role as biological masks. *Trends Biochem. Sci.* 10, 357-360.
4. Hatton, M.W.C., März, L. and Refoeczi, E. (1983). On the significance of heterogeneity of plasma glycoproteins possessing N-glycans of the complex type: a perspective. *Trends Biochem. Sci.* 8, 287-291.
5. Stein, B.S. and Sussman, H.H. (1983). Peptide mapping of the human transferrin receptor in normal and transformed cells. *J. Biol. Chem.* 258, 2668-2673.
6. Enns, C.A. and Sussman, H.H. (1981). Similarities between the transferrin receptor proteins on human reticulocytes and human placentae. *J. Biol. Chem.* 256, 12620-12623.
7. Bierings, M.B., Heeren, J.W.A., van Noort, W.L., van Dijk, J.P. and van Eijk, H.G. (1987). Pregnancy and guinea pig iso-transferrins. Isolation and characterization of both iso-transferrins. *Clin. Chim. Acta*, in press.
8. Raynes, J. (1982). Variations in the relative proportions of microheterogeneous forms of plasma glycoproteins in pregnancy and disease. *Biomedicine* 36, 77-86.
9. Soda, R. and Tavassoli, M. (1984). Liver endothelium and not hepatocytes or Kupffer cells have transferrin receptors. *Blood* 63, 270-276.
10. Kishimoto, T. and Tavassoli, M. (1985). Endothelial binding of transferrin in fractionated liver cell suspensions. *Biochim. Biophys. Acta* 846, 14-20.
11. Vogel, W., Bomford, A., Young, S. and Williams, R. (1987). Heterogeneous distribution of transferrin receptors on parenchymal and non-parenchymal liver cells: biochemical and morphological evidence. *Blood* 69, 264-270.
12. Kolb-Bachofen, V., Schlepper-Schäfer, J., Roos, P., Hülsmann, D. and Kolb, H. (1984). GalNAc/Gal-specific rat liver lectins: their role

in cellular recognition. Biol. Cell 51, 219-226.

SAMENVATTING

Dit proefschrift beschrijft een onderzoek naar de functie van de glycanen van transferrine, in het bijzonder naar de betekenis van de microheterogeniteit van humaan serumtransferrine, alsmede onderzoek naar het effect van desialylering van transferrine op de verwerking door de lever. Hoofdstuk 1 geeft een overzicht van de literatuur betreffende het transferrinemolecuul en zijn koolhydraatketens. Verder wordt de interactie van transferrine met verschillende celtypen behandeld als ook de verwerking van asialoglycoproteinen door de lever.

Hoofdstuk 2 beschrijft de methoden die veelvuldig gebruikt zijn in het in dit proefschrift beschreven onderzoek. De meer specifieke methoden zijn in de betreffende hoofdstukken beschreven.

Hoofdstuk 3 is gewijd aan een onderzoek naar de betekenis van de microheterogeniteit van humaan serumtransferrine. De preparatieve scheiding van humaan serumtransferrine in 7 frakties met verschillend siaalzuurgehalte wordt beschreven, alsmede een onderzoek naar eventuele functionele verschillen in ijzerafgifte aan rattereticulocyten. Het blijkt dat reticulocyten geen onderscheid maken tussen de verschillende humane transferrinevormen, waaruit geconcludeerd wordt dat de koolhydraatketens vermoedelijk geen directe rol spelen bij de interactie van transferrine met de specifieke transferrinereceptor op reticulocyten. Eenzelfde conclusie wordt getrokken in Hoofdstuk 4 omtrent de interactie van humaan transferrine met de transferrinereceptor op rattehepatocyten op basis van soortgelijke waarnemingen. De verhoogde interactie van gedesialyleerd humaan transferrine met rattehepatocyten wordt toegeschreven aan de aanwezigheid van het galactosespecifieke receptorsysteem voor asialoglycoproteinen. Verdere analyse van de interactie van humaan asialotransferrine met hepatocyten door middel van selectieve receptorverzadiging bevestigt dit vermoeden. Tevens blijkt dat bij verhoging van de concentratie van humaan asialotransferrine een toenemende voorkeur voor het asialoglycoproteinen (AsGP)-receptor systeem valt te constateren. Vergelijking van dit heterologe systeem met een homoloog systeem met gedesialyleerd rattetransferrine laat zien dat deze verschuiving ook daar optreedt. Het grote verschil tussen deze twee systemen is echter dat in het heterologe systeem zowel via het AsGP-receptor als het transferrinereceptor systeem ijzer wordt geaccumuleerd, terwijl in het homologe

systeem ijzeraccumulatie alleen via het transferrine-receptor systeem optreedt. Geconcludeerd wordt dat dit zijn oorzaak moet vinden in een verschil in intracellulaire verwerking van de twee asialotransferrinen.

In Hoofdstuk 5 wordt getracht door middel van celfraktering meer inzicht te krijgen in de intracellulaire weg van deze twee liganden. Het blijkt dat geen van de twee asialotransferrinen naar lysosomen wordt getransporteerd maar dat beide gedurende hun intracellulaire verblijf in structuren met lage dichtheid blijven, wat wijst op een diacytose vergelijkbaar met de transferrinecyclus.

Hoofdstuk 6 beschrijft een onderzoek naar de interactie van natief en gedesialyleerd rattetransferrine met levercellen in vivo. Hierbij is gebruik gemaakt van een celisolatiesysteem dat het mogelijk maakt de receptorafhankelijkheid van de opname van liganden in Kupffer-, endotheel- en parenchymcellen te bestuderen. Het blijkt dat alle drie celtypen transferrine opnemen via specifieke transferrinereceptoren en ijzer accumuleren. Bovendien wordt asialotransferrine door alle drie celtypen in verhoogde mate opgenomen. Competitie-experimenten met pre-injecties met competitieve suikers leiden tot de conclusie dat deze verhoging in parenchymcellen plaatsvindt via de AsGP-receptor en in Kupffer- en endotheelcellen via een mannose-specifiek receptorsysteem.

SUMMARY

In this thesis an investigation is described of the function of the transferrin glycans and in particular of the significance of the microheterogeneity of human serum transferrin. In addition the effect of desialylation of transferrin on processing by the liver is investigated. Chapter 1 provides a survey of the literature on the transferrin molecule and its carbohydrate chains. The interaction of transferrin with various cell types is also discussed as is the processing of asialoglycoproteins by the liver.

Chapter 2 describes the methods that have been used frequently during the investigations reported in this thesis. More specific methods are described in the subsequent chapters.

Chapter 3 describes a study on the significance of the microheterogeneity of human serum transferrin. The preparative separation of human serum transferrin in 7 fractions with different sialic acid content is described. Experiments were performed to detect possible functional differences of the fractions with respect to the iron donation to rat reticulocytes. These cells did not discriminate between the various human transferrin forms. The carbohydrate chains are therefore probably not directly involved in the interaction of transferrin with the specific transferrin-receptor on reticulocytes. The same conclusion is drawn in Chapter 4 regarding the interaction of human transferrin with the transferrin-receptor on rat hepatocytes. The enhanced interaction of desialylated human transferrin with rat hepatocytes is attributed to the presence of the galactose-specific receptor system for asialoglycoproteins. Further analysis of the interaction of human asialotransferrin with hepatocytes by means of selective receptor saturation confirms this presumption. Moreover on raising the concentration of human asialotransferrin an increasing preference for the asialoglycoprotein (AsGP) receptor system can be observed. Comparison of this heterologous system with a homologous system with desialylated rat transferrin shows that this shift towards preferential uptake via the AsGP-receptor system also occurs in the homologous system. The most marked difference between these two systems lies in the accumulation of iron. In the heterologous system iron is accumulated via both the AsGP-receptor and the transferrin-receptor system while in the homologous system iron accumulation only takes place

via the transferrin-receptor system. This must be caused by a difference in intracellular processing of the two asialotransferrins.

In Chapter 5 an attempt is made to elucidate the intracellular pathways of these two ligands by subcellular fractionation. Neither of the two asialotransferrins appears to be directed to lysosomes, but both remain in low density structures throughout their intracellular journey, indicative of a diacytic pathway resembling the transferrin cycle.

Chapter 6 describes a study on the interaction of native and desialylated rat transferrin with rat liver cells in vivo. The cell isolation system used in these experiments enables the study of the receptor dependency of the uptake of ligands by Kupffer-, endothelial and parenchymal cells. This investigation shows that all three cell types take up transferrin via specific transferrin-receptors and accumulate iron. Moreover all three cell types show an enhanced uptake of asialotransferrin. Competition experiments with preinjections of competitive sugars lead to the conclusion that this enhancement is mediated in parenchymal cells via the AsGP-receptor system and in Kupffer- and endothelial cells via a mannose-specific receptor system.

NAWOORD

Op deze plaats wil ik graag iedereen bedanken die aan de totstandkoming van dit proefschrift heeft bijgedragen.

In de eerste plaats mijn promotor Prof. van Eijk voor de plezierige wijze van begeleiden gedurende de afgelopen vier jaar.

De overige leden van de promotiecommissie: Prof. Koster, Prof. Wilson en Prof. van Gool voor het kritisch beoordelen van het manuscript.

Prof. Leijnse voor de gastvrijheid genoten op zijn instituut.

Wim van Noort, die mij bij de start van het onderzoek heeft ingevoerd in de geheimen van transferrine en het focuseren en aan wiens kennis ik veel heb gehad.

Martin Kroos voor de onmisbare en deskundige hulp en bijstand bij de incubatie-experimenten.

Cees van der Heul voor de adviezen en suggesties gedurende de eerste helft van het onderzoek.

Dirk Bakkeren voor de "stimulating discussions" en goede adviezen. Op elke vraag wist je wel een antwoord.

De hele ijzergroep voor het kritisch meedenken.

Alice Leusink, Lia 't Hart-Vooren, Patricia Schulze en last but not least Linda Harkes voor het "verwerken" van de tekst.

Tot slot de hele bevolking van Chem. Path. voor de uiterst plezierige en gezellige werksfeer, die mij ertoe heeft gebracht mijn volgende werkkring zo dichtbij mogelijk te kiezen, nl. aan de overkant van de liften.

CURRICULUM VITAE

De schrijver van dit proefschrift werd geboren op 12 juli 1952 te Westkapelle. Na het behalen van het diploma Gymnasium β aan de Rijks-scholengemeenschap "Koningin Wilhelmina" te Oostburg in 1971 werd in datzelfde jaar begonnen met de studie Scheikunde aan de Rijksuniversiteit van Utrecht.

In mei 1976 werd het kandidaatsexamen afgelegd en in juni 1980 het doktoraalexamen met als keuzerichting biochemie en als bijvakken toxicologie en fysiologische chemie.

Van juli 1981 tot juli 1982 was hij als wetenschappelijk assistent verbonden aan de vakgroep Biochemie van de subfaculteit Scheikunde van de Rijksuniversiteit van Utrecht.

Van oktober 1982 tot oktober 1986 was hij als wetenschappelijk assistent verbonden aan de afdeling Chemische Pathologie van de Faculteit der Geneeskunde van de Erasmus Universiteit te Rotterdam. In deze periode werd het onderzoek verricht dat in dit proefschrift is weergegeven.

Vanaf 1 november 1986 is hij werkzaam als wetenschappelijk onderzoeker bij de afdeling Biochemie I van de Faculteit der Geneeskunde van de Erasmus Universiteit te Rotterdam.