

ENKELE ASPECTEN VAN DE IJZEROPNAME DOOR ERYTROÏDE CELLEN

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR IN DE
GENEESKUNDE
AAN DE ERASMUS UNIVERSITEIT ROTTERDAM
OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS
PROF. DR. J. SPERNA WEILAND
EN VOLGENS BESLUIT VAN HET COLLEGE VAN DEKANEN.
DE OPENBARE VERDEDIGING ZAL PLAATSVINDEN OP
WOENSDAG 14 OKTOBER 1981 DES NAMIDDAGS
TE 3.45 UUR

DOOR

CORNELIS VAN DER HEUL
geboren te Rotterdam

1981

Wima Offsetdruk B.V.
's-Hertogenbosch

PROMOTOR : PROF. DR. H.G. VAN ELJK
CO-REFERENTEN : PROF. DR. J. ABELS
: PROF. DR. J. VAN GOOL

Aan Joke en Sander

Dit proefschrift werd bewerkt op het Instituut Chemische Pathologie, Vakgroep Biochemie, van de Erasmus Universiteit Rotterdam.
Het bewerkte onderwerp is een deel van het ijzeronderzoek, dat in BION-verband bewerkt wordt.

De uitgave van dit proefschrift kwam tot stand door financiële steun van de Firma Boehringer Mannheim BV, Amsterdam.

De foto op de omslag werd met toestemming overgenomen uit "Natuur en Techniek", Copyright: Joh. Wagenveld, Tietjerk/Natuur en Techniek, Maastricht.

De foto's van de isoelectrische focussing patronen werden met toestemming overgenomen uit "Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry", Publisher Walter de Gruyter, Berlin.

De in dit proefschrift beschreven resultaten zijn tevens neergelegd in de volgende publicaties:

- Hoofdstuk II Van der Heul, C., Van Eijk, H.G., Wiltink, W.F. and Leijnse, B. (1972).
The binding of iron to transferrin and to other serum components at different degrees of saturation with iron.
Clin. Chim. Acta 38, 347-353.
- Hoofdstuk III 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. Biochem. 16, 557-560.
- Hoofdstuk IV 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. Biochem. 18, 563-566.
- Hoofdstuk V Van der Heul, C., Kroos, M.J., Van Noort, W.L. and Van Eijk, H.G. (1981).
No functional difference of the two iron-binding sites of human transferrin in vitro.
Clinical Science 60, 185-190.
- Van der Heul, C., Kroos, M.J., Van Noort, W.L. and Van Eijk, H.G. (1981).
No functional difference between the two iron-binding sites of transferrin for hepatocytes and erythroid cells in vitro. Geaccepteerd voor: *Proteins of Iron Storage and Transport*, Ed. P. Saltman.
- Hoofdstuk VI Van der Heul, C., Kroos, M.J. and Van Eijk, H.G. (1977).
On the binding sites of iron transferrin on rat reticulocytes.
In: *Proteins in Iron Metabolism*, Ed. E.B. Brown, 299-304, Grune and Stratton, New York.
- Hoofdstuk VII Van der Heul, C., Van Eijk, H.G. and Kroos, M.J. (1978).
Binding sites of iron transferrin on rat reticulocytes, inhibition by specific antibodies.
Biochim. Biophys. Acta 511, 430-441.
- Hoofdstuk VIII Van der Heul, C., Kroos, M.J. and Van Eijk, H.G. (1981).
Characterization and localization of the transferrin receptor on rat reticulocytes.

Aangeboden voor publicatie in *Biochim. Biophys. Acta*.

- Hoofdstuk IX Van der Heul, C., Kroos, M.J., De Jeu-Jaspars, C.M.H. and Van Eijk, H.G. (1980).
The uptake of iron by rat reticulocytes. The influence of purification of the ghosts on iron-containing components in the ghost suspension.
Biochim. Biophys. Acta 601, 572-583.
- Hoofdstuk X Van der Heul, C., Kroos, M.J., De Jeu-Jaspars, C.M.H. and Van Eijk, H.G. (1981).
Intracellular iron transport and iron-binding components of reticulocytes.
Geaccepteerd voor: *Proteins of Iron Storage and Transport*, Ed. P. Saltman.

INHOUD

	pag.
Hoofdstuk I. Inleiding, literatuuroverzicht en probleemstelling	13
Hoofdstuk II. Algemene Methoden	30
a. Chemicaliën	30
b. Isotopen	31
c. De bereiding van transferrine	31
d. De bereiding van ijzervrije transferrine-oplossingen	32
e. Het radioactief maken van transferrine met ¹²⁵ I	32
f. Het opladen van transferrine met ⁵⁹ Fe	33
g. Het verkrijgen van reticulocyten en beenmergcellen van de rat	33
h. Algemene incubatieprocedure van erythroïde cellen met transferrine	34
i. De bereiding van reticulocyten ghostsuspensie	34
j. Radioactiviteitsmetingen	35
k. De bereiding van antilichamen	35
Hoofdstuk III. Analyse van de twee ijzerbindingsplaatsen van transferrine	
Inleiding	36
Materiaal en Methoden	36
Resultaten	
1. Isoelektrische focuseringspatroon van een transferrine-oplossing tot 50% verzadigd met ijzer	38
2. Isoelektrische focusering van transferrine-oplossingen met verschillende verzadigingspercentages aan ijzer	39
3. De vorming van TfFe(A) en TfFe(B) bij pH=9 en wisselende incubatietijd en incubatietemperatuur	40
Discussie	41
Literatuur	42
Hoofdstuk IV. Bereiding van zuiver humaan transferrine A en transferrine B met behulp van een preparatieve isoelektrische focuserings-techniek	
Inleiding	43
Materiaal en Methoden	44
Resultaten	45
Discussie	47
Literatuur	49
Hoofdstuk V. Geen functioneel verschil tussen de twee ijzerbindingsplaatsen van humaan transferrine in vitro	
Inleiding	50
Materiaal en Methoden	51
Resultaten	
1. Mogelijke invloed van ampholine en de isoelektrische focuserings-techniek op de functie van transferrine	51
2. Incubatie van humane beenmergcellen met humaan	

monoferric TfFe(A) en monoferric TfFe(B)	52
3. Incubatie van rattenreticulocyten en rattenbeenmergcellen met humaan monoferric TfFe(A) en monoferric TfFe(B)	54
4. Incubatie van humane beenmergcellen met een oplossing die evenveel TfFe(A) als TfFe(B) bevat	54
5. Incubatie met beide monoferric transferrinen en diferric transferrine	55
Discussie	56
Literatuur	57

Hoofdstuk VI. De localisatie en isolatie van de transferrine-receptor op de membraan van de rattenreticulocyten

Inleiding	59
Materiaal en Methoden	59
Resultaten	
1. Immunofluorescentiestudies	62
2. Gelfiltratie-experimenten	62
3. De invloed van de incubatietijd op de componenten A, B ₁ , B ₂	65
4. De invloed van de incubatietemperatuur op de ⁵⁹ Fe- en ¹²⁵ I-activiteit van de componenten A, B ₁ , B ₂	67
5. De incubatie van een suspensie van unsealed ghosts, resealed ghosts, opgeloste ghosts en erythrocyten	69
Discussie	69
Literatuur	70

Hoofdstuk VII. De rol van de geïsoleerde membraancomponent B₂ bij het ijzeropnameproces door de reticulocyt

Inleiding	71
Materiaal en Methoden	71
Resultaten	
1. Zuivering van het anti-B ₂ immunoglobuline	73
2. Incubatie van gezuiverd anti-B ₂ met een reticulocytensuspensie	73
3. Splitsing van het gezuiverde anti-B ₂ immunoglobuline in Fab- en Fc-fragmenten	74
4. De invloed van de preïncubatie met Fab-fragmenten op de transferrine-binding en ijzeropname door de reticulocyt	74
Discussie	77
Literatuur	80

Hoofdstuk VIII. Nadere karakterisering van de transferrine-receptor op de reticulocytenmembranen van de rat

Inleiding	81
Materiaal en Methoden	82
Resultaten	
1. Bepaling van de relatieve molecuulmassa van de transferrine-receptor met behulp van polyacrylamide gel elektroforese	87
2. Nadere localisatie van het transferrine-receptor eiwit in de membraan	88

Discussie	96
Literatuur	98

Hoofdstuk IX. Over de invloed van de bereidingswijze en zuivering van de ghosts op de ijzer-bevattende componenten in de ghostsuspensie

Inleiding	100
Materiaal en Methoden	100
Resultaten	
1. De bij de verschillende centrifugatiesnelheden verkregen ghostsuspensies	103
2. Zuivering van de ghostsuspensies door sucrose gradient centrifugatie	106
3. Gelfiltratie van de gezuiverde membraan- en mitochondriënfraction	107
Discussie	109
Literatuur	112

Hoofdstuk X. Het intracellulaire ijzertransport van de rattenreticulocyt

Inleiding	113
Materiaal en Methoden	113
Resultaten	
1. Chromatografie van een reticulocyten cytosol over Sephadex G-100	116
2. Nadere karakterisering van de componenten I en IV van Sephadex G-100 kolom	118
3. De invloed van een verminderde heemsynthese op de verdeling van ⁵⁹ Fe over de componenten I t/m IV in de cytosol	119
4. Incubatie van cytosolcomponenten I & IV met een reticulocyten hemolysaat en cytosol	120
5. Reïncubatie van met ⁵⁹ Fe-, ¹²⁵ I-transferrine geïncubeerde reticulocyten	120
6. Reïncubatie van een met ⁵⁹ Fe- en ¹²⁵ I-gemerkte reticulocyten ghostsuspensie met Hanks'	123
7. Incubatie van een met ⁵⁹ Fe- en ¹²⁵ I-gemerkte ghostsuspensie met een reticulocyten cytosol	124
8. Incubatie van met ⁵⁹ Fe- en ¹²⁵ I-gemerkte ghostcomponenten met reticulocyten cytosol	126
9. Incubatie van met ⁵⁹ Fe- en ¹²⁵ I-gemerkte ghostcomponenten met reticulocyten hemolysaat	127
Discussie	128
Literatuur	130

Samenvatting	131
-------------------------------	------------

Summary	134
--------------------------	------------

Naschrift	137
----------------------------	------------

Curriculum Vitae	139
-----------------------------------	------------

HOOFDSTUK I

Inleiding, literatuuroverzicht en probleemstelling

Het menselijk lichaam bevat circa 4 g ijzer; de verdeling van dit ijzer over de verschillende compartimenten en componenten is weergegeven in figuur 1 en tabel I.

Het lichaam gaat zeer economisch om met ijzer, getuige het feit dat het ijzerverlies slechts 1-2 mg per dag bedraagt. Dit ijzer verlaat het lichaam via excretie door nieren, darm en zweetklieren; tevens gaat een geringe hoeveelheid ijzer verloren door fysiologisch celverval van huid, haren en nagels. Het lichaam beschikt niet over een actief excretiemechanisme voor ijzer en de ijzerbalans wordt dan ook voornamelijk gehandhaafd door veranderingen in de absorptie, welke vanuit de tractus digestivus plaatsvindt. Vanuit de mucosacel van het duodenum wordt het opgenomen ijzer via de bloedbaan naar de verschillende organen getransporteerd. Gezien het feit dat het oplosbaarheidsproduct van $\text{Fe}(\text{OH})_3$ slechts 4×10^{-38} bedraagt, is de regulatie van de ijzerhuishouding geen eenvoudige taak voor het menselijk lichaam. Onder aërobe omstandigheden zullen in het lichaam ferro(Fe II)-verbindingen gemakkelijk oxyderen tot ferri(Fe III)-verbindingen. Bij een lichaams-pH van 7,4 kan een concentratie van vrije Fe(III) ionen voorkomen van slechts 10^{-17} mol/l, deze uiterst geringe concentratie is onmeetbaar. Uit dit gegeven en het feit dat in het plasma een concentratie van meer dan 20 $\mu\text{mol/l}$ Fe(III) kan voorkomen, zal het duidelijk zijn dat het lichaam over verbindingen moet beschikken die een complex kunnen vormen met dit Fe. In het plasma wordt ijzer gebonden door een beta-globuline, siderofiline of transferrine genoemd.

Dit transferrinemolecuul is opgebouwd uit een enkele polypeptideketen, met een molecuulmassa van 81.000, welke twee domains bevat, die de N-terminale (N_t) en C-terminale (C_t) genoemd worden. Dit molecuul bevat twee bindingsplaatsen voor Fe(III), de zogenaamde A- en B-bindingsplaats, respectievelijk gelegen in het C_t - en N_t -domain.

In het serum is transferrine in het algemeen slechts voor dertig procent verzadigd en er komen dan ook transferrinemoleculen met een wisselend ijzerverzadigingspercentage voor, te weten: apotransferrine (0 ijzeratomen), monoferric transferrine (1 ijzeratoom op één van de twee bindingsplaatsen, d.w.z. TfFe(A) en TfFe(B)) en diferric transferrine (2 ijzeratomen).

Tabel I — Verdeling van de Fe in het lichaam

circa 70	% als hemoglobine in de erythrocyten
circa 20	% als ferritine in lever, milt, beenmerg en darm
circa 0,3%	als celhemine, cytochromen, katalase
circa 4	% als myoglobine
circa 0,1%	als transportijzer in plasma, transferrine
circa 0,1%	als hemosiderine in lever

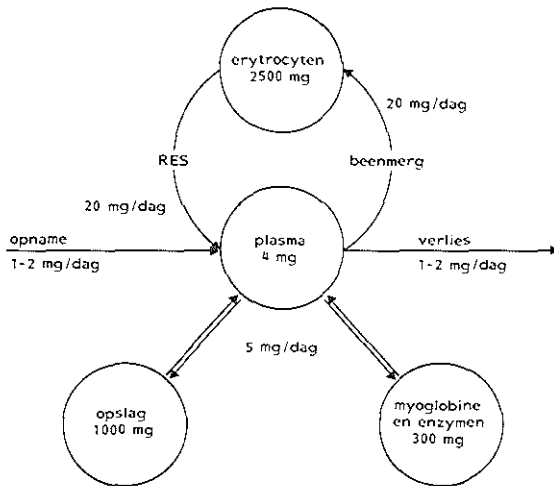


Fig. 1. De verdeling van ijzer in het lichaam over een aantal compartimenten en de onderlinge uitwisseling tussen deze compartimenten.

Om een stabiel ijzer-eiwitcomplex te vormen moet een geschikt anion, bij voorkeur HCO_3^- of CO_3^{2-} mede gebonden worden. Onder fysiologische omstandigheden is de ijzer-eiwit-carbonaat-binding zo hecht, dat er praktisch geen dissociatie optreedt ($K > 10^{23}$). Indien dit complex echter geïncubeerd wordt met voorlopers van de erythrocyt wordt het ijzer vrijgemaakt uit het complex en ontstaat apotransferrine (1, 2, 3). IJzer wordt door het lichaam ook in verschillende organen opgeslagen (o.a. in lever, milt, beenmerg en darmmucosa). Deze opslag dient, gezien de geringe oplosbaarheid van Fe(III) en de grote toxiciteit van vrij Fe(III) te geschieden in complexvorm.

De depotverbindingen, waarin het ijzer in het lichaam ligt opgeslagen, zijn ferritine en hemosiderine. Ferritine is een ijzerhoudend eiwit waarvan het eiwitgedeelte, apoferritine genoemd, een molecuulmassa van ongeveer 500.000 heeft. Apoferritine kan ijzer en fosfaat opnemen tot een molecuulmassa van circa 700.000 ontstaat. Door het fysiologische celverval komen geringe hoeveelheden ferritine in het serum voor. Bij een normaal celverval is deze serum-ferritineconcentratie direct gerelateerd aan de ijzervoorraad in het lichaam. Dit impliceert dat bij een ijzerstapeling in het lichaam (hemochromatose) het serumferritine verhoogd is, terwijl bij een ijzergebrek het serumferritine juist verlaagd is. Hemosiderine, wordt door velen beschouwd als een afbraakproduct van ferritine (4); anderen twijfelen aan deze herkomst en spreken van een niet-ferritine depotijzer eiwit (75). Hemosiderine, waarvan de samenstelling nog onbekend is, speelt een minder actieve rol in de ijzerstofwisseling dan ferritine.

Zoals uit figuur 1 en tabel I blijkt, komt het meeste ijzer in het menselijk lichaam voor in de erythrocyten. Het in de erythrocyten aanwezige ijzer is voor het overgrote deel ingebouwd in de heemgroep van het hemoglobinemolecuul. Het in hemoglobine aanwezige ijzer verricht één van de belangrijkste functies, welke aan het in het menselijk lichaam aanwezige ijzer kunnen worden toegeschreven; het stelt de

erythrocyt namelijk in staat zijn zuurstoftransporterende functie te verrichten, door dat ieder ijzeratoom dat in de heemgroep in tweewaardige vorm aanwezig is zuurstof in moleculaire vorm kan binden.

Hoewel door een aantal onderzoekers reeds was aangetoond dat zowel intacte voorlopers, als het hemolysaat van de voorlopers, ijzer voor de heemsynthese gebruiken (1), bestond er aanvankelijk verschil van mening over de herkomst van dit ijzer. Bessis en Breton-Gorius (4, 5) meenden op grond van elektronenmicroscopische studies van beenmergpreparaten dat de erytroblasten hun ijzer voor de hemoglobinesynthese verkregen door pinocytose van ijzerdeeltjes uit macrofagen, afkomstig uit het in het beenmerg aanwezige reticulo-endotheliale systeem. Walsh en medewerkers toonden in 1947 reeds aan dat, in vitro, humane reticulocyten in staat waren om plasma ijzer, zonder tussenkomst van de macrofagen, direct op te nemen (1). De voordelen van dit systeem boven het door Bessis beschreven mechanisme zijn duidelijk en na Walsh's waarneming zijn er steeds meer aanwijzingen gevonden dat voorlopers van de erythrocyt hun ijzer, ten behoeve van de hemoglobinesynthese, direct van transferrine ontvangen. Ter ondersteuning van deze hypothese dient o.a. de klinische waarneming dat bij patiënten met een congenitale atranferrinemie een ernstige hypochrome microcytaire anemie ontstaat. Na toediening van normaal plasma (6) of van zuiver humaan transferrine (7) stijgt het hemoglobinegehalte.

Ook het feit dat bij het herstel van een ijzergebreksanemie eerst de hemoglobineconcentratie stijgt alvorens er weer ijzer in het reticulo-endotheliale systeem van het beenmerg verschijnt, pleit voor een directe afgifte van ijzer door transferrine aan de beenmergcellen. Overigens blijft het door Bessis waargenomen contact tussen erytroblasten en macrofagen een opvallend verschijnsel en een andere functionele betekenis van dit contact voor de ontwikkeling van erytroblasten kan niet met zekerheid worden uitgesloten.

Lajtha en Sait (8) toonden met behulp van autoradiografie aan dat van de voorlopers van de erythrocyt de pronormoblast en de basofiele normoblast het meeste ijzer opnemen; bij het verder uitrijpen van de cellen van de erythroïde reeks neemt de ijzeropname steeds meer af. Jandl et al. (2) toonden aan dat van de serumeiwitten transferrine als belangrijkste ijzerbron voor de beenmergcellen van de erythroïde reeks fungeert. Indien zij erythrocyten en reticulocyten met FeCl_3 incubeerden, trad er een snelle absorptie van dit ijzer op, door zowel de erythrocyten als de reticulocyten. Echter, 95% van dit ijzer bleef in de membraan gelokaliseerd en in de reticulocyten trad slechts een zeer geringe inbouw van ijzer in het hemoglobine op. Ook indien ijzer is gebonden aan andere serumeiwitten bleek er slechts een minimale opname van ijzer in de cel plaats te vinden. Uit hun studie bleek bovendien dat er bij incubatie van erythrocyten met transferrine geen opname van ijzer in de cel optrad. Tenslotte bleek dat een ijzerchelator (EDTA), toegevoegd aan het incubatiemedium, niet in staat was de ijzeropname te remmen, waaruit geconcludeerd kan worden dat ijzer tijdens het opnameproces extracellulair niet als vrij ion voorkomt. Eldor et al. (9) toonden aan dat serum waaruit transferrine verwijderd was niet meer in staat was om een ijzeropname in reticulocyten te bewerkstelligen. Concluderend kan gesteld worden dat er een voor transferrine specifieke reactie met erytroblasten en reticulocyten dient op te treden, die deze cellen in staat stelt het ijzer van transferrine te verwijderen en op te nemen ten behoeve van hun hemoglobinesynthese; deze eigenschap verliest de ery-

troïde cel als zij is uitgerijpt tot erythrocyt. Tevens blijkt dat niet aan transferrine gebonden ijzer bijna niet door erythroblasten en reticulocyten kan worden opgenomen.

Verskillende onderzoekers toonden aan dat tijdens het proces van de ijzerafgifte aan de reticulocyt, transferrine zich aan de plasmamembraan van deze reticulocyt bindt (3, 10, 11, 12).

Bij dit proces kunnen een aantal fasen onderscheiden worden:

- a. Er treedt een zeer snelle initiële binding op van transferrine aan de celmembraan. Deze binding is onafhankelijk van de incubatietemperatuur en van het intracellulaire metabolisme. Het betreft hier de *adsorptiefase*, die niet gepaard gaat met ijzertransport naar het intracellulaire compartiment.
 - b. Na de initiële adsorptiefase volgt een lineair in de tijd verlopende bindingsfase, die na circa 5 minuten overgaat in een enigszins tragere fase, welke na circa 25-30 minuten zijn maximum bereikt. Dit gehele proces wordt aangeduid als *associatiefase*, waarvan het verloop afhankelijk is van de incubatietemperatuur en het intracellulaire metabolisme.
 - c. Na 30 minuten treedt er een *evenwichtsfase* op waarbij evenveel transferrine de cel verlaat als er opnieuw gebonden wordt en de transferrineconcentratie van de cel dus constant blijft.
- Vanaf de associatiefase treedt er een ijzeropname in de cel op, die lineair verloopt en ook in de evenwichtsfase aanhoudt.

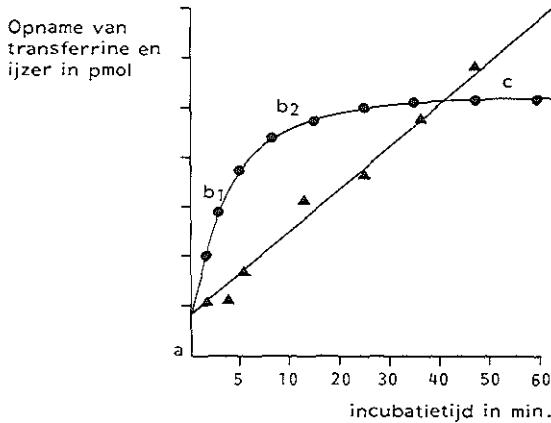


Fig. 2 De binding van transferrine aan en de opname van ijzer door reticulocyten in het verloop van de incubatietijd.
 a – adsorptiefase; b_1 en b_2 – associatiefase;
 c – evenwichtsfase (zie tekst)

●—●—● transferrine ▲—▲—▲ ijzer

Eén en ander is weergegeven in figuur 2.

Nadat was vastgesteld dat voor de afgifte van ijzer aan erythroïde beenmergcellen een binding tussen transferrine en deze cellen noodzakelijk was, zijn vele experimenten verricht om vast te stellen wat de meest ideale omstandigheden voor deze reactie tussen transferrine en de cel waren. De invloed van o.a. veranderingen

van de celmembranen door inwerking van proteolytische enzymen, van incubatietijd, van incubatietemperatuur, van de pH van het incubatiemedium, van aërobe en anaërobe incubatiemilieus en van de remmers van het intracellulaire metabolisme op de binding van transferrine aan en op de opname van ijzer door de reticulocyt werd door verschillende onderzoekers nagegaan (2, 3, 10, 11, 12, 13, 14, 15). Het zou ons te ver voeren om al deze factoren uitvoerig te bespreken; in het algemeen kan gesteld worden dat indien de genoemde invloeden de fysiologische omstandigheden in het menselijk lichaam het dichtst benaderen, de reactie tussen de erythroïde cel en transferrine het best verloopt. Tevens dient nog opgemerkt te worden dat de invloeden van de incubatietemperatuur en remming van het celmetabolisme groter zijn op de ijzeropname door de cel dan op de transferrinebinding aan de cel (11).

De reactie van transferrine met de voorlopers van erythrocyten werd door Baker en Morgan ook kinetisch nader gekarakteriseerd (11, 16). Uit waarden van de thermodynamische parameters, standaard vrije energie, entropie en enthalpie concludeerden zij dat de reactie tussen transferrine en de reticulocyt lijkt op een antigeen-antilichaambinding.

Naast genoemde factoren speelt mogelijk ook de ijzerverzadigingsgraad van het transferrinemolecuul een rol bij de reactie tussen transferrine en de hemoglobine synthetiserende erythroïde cel. Diferric transferrine zou, mogelijk door veranderde lading, of veranderde configuratie, procentueel een betere ijzerdonor zijn dan monoferric transferrine. Zo toonden Jandl en Katz aan dat bij toenemende ijzerverzadiging van een humane transferrine-oplossing de transferrinebinding aan de reticulocyt per tijdseenheid eveneens toenam (3). Morgan en Laurell konden dit resultaat echter met konijnentransferrine niet bevestigen; zij stelden vast dat bij toenemende ijzerverzadiging van transferrine het aantal aan de reticulocyt gebonden transferrinemoleculen gelijk bleef (10). Lane maakte waarschijnlijk dat ijzer door reticulocyten sneller dan diferric transferrine wordt verwijderd dan van monoferric transferrine (17); Princiotto en Zapolski konden dit voor humaan transferrine wel, doch voor konijnentransferrine niet bevestigen (18). Gezien deze tegenstrijdige resultaten moet gesteld worden dat de rol, welke de ijzerverzadigingsgraad van het transferrine in de reactie tussen transferrine en de erythroïde speelt, nog niet duidelijk is.

Een ander aspect van de reactie tussen transferrine en de voorlopers van de erythrocyt vormt de specificiteit. Jandl (2), Lane (19) en Verhoef (20) toonden aan dat de reactie tussen transferrine en de voorlopers van de erythrocyt vrij specifiek is; transferrine van een bepaalde diersoort bleek een lagere affiniteit te hebben voor de reticulocyten van een heterologe diersoort in vergelijking met de affiniteit voor homologe cellen, hetgeen ook resulteerde in een verminderde ijzeropname.

Eén van de belangrijkste factoren, die de afgifte van ijzer aan de voorlopers van de erythrocyt zou beïnvloeden, is een mogelijk functioneel verschil dat tussen beide ijzerbindingsplaatsen van het transferrinemolecuul zou bestaan. Volgens deze hypothese, die in 1967 door Fletcher en Huehns werd gepostuleerd, gedraagt aan transferrine gebonden ijzer zich in het lichaam niet als een homogene pool. IJzer gebonden aan wat vroeger de A-plaats, maar nu de plaats in het C-terminale domain genoemd wordt, zou voornamelijk worden afgegeven aan erythroïde voorlopers en, bij een zwangerschap, aan de foetus. IJzer gebonden aan de andere bindingsplaats van transferrine, vroeger de B-plaats, nu de plaats in het N-terminale domain genoemd,

zou juist bij voorkeur aan de ijzeropslagplaatsen in het lichaam worden afgegeven om in ferritine te worden ingebouwd (21, 22). Dit functionele verschil zou niet absoluut zijn, zodat na langer incuberen met erytroïde voorlopers ook ijzer gebonden aan de B-positie van transferrine beschikbaar komt voor de heemsynthese in voorlopers van de erythrocyt. Vele onderzoekers hebben deze hypothese getoetst waarbij wisselende resultaten werden verkregen (voor overzicht zie 23, 24, 25). Recente studies van Huebers et al. (26) en van Morgan et al. (27) doen twijfel rijzen aan het functionele verschil tussen de twee ijzerbindingsplaatsen van transferrine, hoewel een zeer recente studie van Aisen et al. (28) de hypothese weer lijkt te bevestigen. Een groot bezwaar van al deze studies is het feit dat het tot voor kort niet mogelijk was om de incubatie-studies uit te voeren met het zuivere TfFe(A) en met het zuivere TfFe(B). De incubaties werden uitgevoerd met transferrine-oplossingen waarin één van de vormen van monoferric transferrine weliswaar het meeste voorkwam, maar die gecontamineerd waren met wisselende hoeveelheden apotransferrine, het andere monoferric transferrine en diferric transferrine. Deze contaminaties kunnen debet zijn aan de verschillende resultaten. Hoewel er dus nog gereede twijfel bestaat over het wel of niet aanwezig zijn van een functioneel verschil tussen de twee ijzerbindingsplaatsen van transferrine, zijn er wel fysisch-chemische verschillen tussen de moleculen TfFe(A) en TfFe(B) aangetoond. Deze komen o.a. tot uiting in verschillen in EPR spectra (29, 30), in, door pH-veranderingen geïnduceerde, ijzerafgifte van beide bindingsplaatsen (31, 32) en in verschillen in isoelektrisch punt bij polyacrylamide gel elektroforese in een 6 mol/l ureum medium.

Ondanks veel onderzoek over de reactie tussen transferrine en de voorlopers van de erythrocyt, is het mechanisme van de ijzeroverdracht op moleculair niveau nog niet bekend. Over het algemeen wordt aangenomen dat transferrine met een receptor op de celmembraan reageert, doch de structuur van deze receptor is nog onbekend; evenmin is bekend of de opname van ijzer volledig afhankelijk is van een reactie van transferrine met deze receptor, of dat de voorlopers van de erythrocyt ook nog over een ander mechanisme beschikken om ijzer op te nemen. Over het aantal receptoren voor transferrine op de reticulocyt lopen de gegevens sterk uiteen zoals blijkt uit tabel II. Verhoef en Noordeloos (35) en Nunez et al. (36) toonden aan dat het aantal receptoren voor transferrine op kernhoudende erytroïde beenmergcellen groter is dan op reticulocyten, namelijk $500 \cdot 10^3$ – $700 \cdot 10^4$ per cel, hetgeen past bij de, door Kailis en Morgan aangetoonde grotere ijzeropname en hemoglobinesynthese door onrijpere erytroïde beenmergcellen (15).

De erythrocyt kan transferrine niet meer specifiek binden; het is echter niet

Tabel II. – Aantal receptoren voor transferrine per reticulocyt

Reticulocyten afkomstig uit	Aantal receptoren	Literatuurverwijzing	
Mens	$50 \cdot 10^3$	Jandl and Katz, 1963	(3)
Konijn	$26 \cdot 10^3$ – $45 \cdot 10^3$	Kornfield, 1969	(34)
Konijn	$200 \cdot 10^3$ – $560 \cdot 10^3$	Baker and Morgan, 1969	(12)
Rat	$85 \cdot 10^3$ – $343 \cdot 10^3$	Verhoef and Noordeloos, 1977	(35)
Muis	$600 \cdot 10^3$	Nunez et al., 1977	(36)

Tabel III. — De relatieve molecuulmassa van de transferrinereceptor op de membranen van voorlopers van de erythrocyt

Gebruikte cellen		Oplosmiddel	Chromatografie over	Relatieve molecuulmassa receptor zonder transferrine in daltons	Literatuur
a ₁	Reticulocyt konijn	Trixtion X-100 SDS*; DOC*	Sephadex G-200	>200.10 ³	Garret, 1973 (37)
a ₂	Void volume piek a ₁		Biogel A-15M	270.10 ³ –620.10 ³	–, – (37)
b	Reticulocyt mens	Triton X-100	Sepharose-2B en -6B	150.10 ³	Speyer, 1974 (38, 19)
c	Reticulocyt konijn	Teric 12 Ag	Sephadex G-200	145.10 ³	Bockxmeer, 1975 (40)
d	Reticulocyt konijn	Triton X-100	Sepharose-2B, -4B en -6B	120.10 ³	Sly, 1975 (41)
e	Reticulocyt konijn	Triton X-100	Ultragel AcA22	±350.10 ³	Aisen, 1977 (42)
f	Reticulocyt konijn	Triton X-100	Ultragel AcA22 en PAGE*	350.10 ³ –400.10 ³ subunits 176.10 ³ 95.10 ³	Leibman, 1977 (43)
g	Reticulocyt konijn	Teric 12 Ag	Ultragel AcA32	275.10 ³	Bockxmeer, 1977 (44)
h	Reticulocyt konijn	SDS na crosslinking transferrine aan cel	PAGE*	60.10 ³ en 145.10 ³	Nunez, 1977 (45)
i	Reticulocyt konijn	Triton X-100 (ghost niet volledig opgelost)	Affiniteitschromatografie Transferrine CNBr Sepharese-4B	30.10 ³ –35.10 ³ vormt dineer niet in 70.10 ³	Light, 1977 (46)
j	Erythroïde been- mergcellen konijn	–, –	–, –	18.10 ³	Light, 1978 (47)
k	Reticulocyt rat	Triton X-100	Affiniteitschromatografie Tf – Seph.-4B; PAGE*	145.10 ³ ; 95.10 ³	Sullivan, 1978 (48)
l	Reticulocyt konijn	SDS	PAGE*	190.10 ³	Witt, 1978 (49)
m	Reticulocyt konijn	Triton X-100	DEAE-Biogel A; Sepharose- 4B; Sepharose-6B; PAGE*	100.10 ³ subunits 48.10 ³ en 3 x 17.10 ³	Sly, 1978 (50)
n	Reticulocyt konijn	SDS	Biogel A-1.5; PAGE*	200.10 ³ subunit 78.10 ³	Glass, 1980 (51)
o	Reticulocyt konijn	Synperonic-A9	Immunoprecipitatie met antitransferrine; PAGE*	180.10 ³ subunit 93.10 ³	Ecarot-Charrier, 1980 (52)

* PAGE = polyacrylamidegelelektroforese
 DOC = sodiumdeoxycholate
 SDS = sodium(natrium)dodecylsulfaat

bekend of de receptor voor transferrine geheel van de celmembraan verdwijnt, dan wel inactief aanwezig blijft.

Reeds lange tijd heeft men geprobeerd de op de reticulocyt aanwezige receptor voor transferrine te isoleren en te karakteriseren. Hiertoe werd een ghostsuspensie geproduceerd van reticulocyten, die met een ^{125}I en ^{59}Fe gemerkte transferrine-oplossing waren geïncubeerd. Deze ghostsuspensie werd opgelost en chromatografisch gefractioneerd. Zoals uit tabel III blijkt verschilden de verkregen resultaten even sterk als de gebruikte methodes. Bovendien zijn de geïsoleerde transferrine-receptor-complexen meestal nog verontreinigd met andere membraaneiwitten.

De samenstelling en de relatieve molecuulmassa van de receptor, alsmede de relatie met andere bekende membraaneiwitten zijn dan ook nog steeds niet bekend. Het staat eveneens nog niet vast of transferrine, na de initiële reactie met de receptor, wel of niet naar het intracellulaire compartiment wordt getransporteerd. In het eerste geval zou transferrine, mogelijk met een deel van de receptor, door een proces als endocytose eerst naar het intracellulaire compartiment worden getransporteerd alvorens zijn ijzer af te geven. Door middel van exocytose zou het ontstane apo-transferrine als intact molecuul weer uit de cel worden verwijderd (Morgan en Appleton, 58). Indien transferrine niet naar het intracellulaire compartiment wordt getransporteerd, zou het zijn ijzer afgeven aan celmembraaneiwitten, welke dan als intermediairen in het ijzertransport naar het intracellulaire compartiment fungeren (Jandl and Katz, 3). Beide mogelijkheden worden ondersteund door experimentele gegevens.

A) Argumenten die de hypothese van Jandl en Katz steunen:

Afgifte van ijzer door transferrine, gebonden aan de receptorplaats.

- I De $^{59}\text{Fe}/^{125}\text{I}$ -verhouding in ghostsuspensies, verkregen van, met $^{59}\text{Fe}/^{125}\text{I}$ -transferrine geïncubeerde reticulocyten, is groter dan de $^{59}\text{Fe}/^{125}\text{I}$ -verhouding van de oorspronkelijke transferrine-oplossing. Dit wordt als een aanwijzing beschouwd dat ijzer in de ghost, behalve aan transferrine, voor een deel ook aan membraaneiwitten is gebonden (35, 37, 38, 39, 51, 53, 54). Speyer en Fielding waren in staat om uit zo'n met ^{59}Fe en ^{125}I gemerkte ghost d.m.v. kolomchromatografie 2 ghostcomponenten te isoleren, welke uitsluitend ^{59}Fe bevatten (38, 39). Kinetiekstudies toonden aan dat deze componenten, respectievelijk A en B1 genoemd, mogelijk als intermediairen fungeren bij het transport van ijzer uit het transferrine-receptorcomplex naar het intracellulaire compartiment (39, 55).
- II. De $^{59}\text{Fe}/^{125}\text{I}$ -verhouding van het geïsoleerde transferrine-receptorcomplex bleek soms groter (38, 39), soms kleiner (37) dan de $^{59}\text{Fe}/^{125}\text{I}$ -verhouding van het gebruikte met ^{59}Fe en ^{125}I gemerkte transferrine. Beide resultaten kunnen verklaard worden door een afgifte van ijzer door transferrine op het moment dat dit transferrine aan de receptor gebonden is; in het eerste geval kan de receptor naast transferrine ook ijzer binden.
- III. Het feit dat een uit reticulocyten verkregen cytosol in staat is ijzer te verwijderen

ren uit een eveneens uit reticulocyten verkregen ghost, terwijl hierbij nauwelijks transferrine vrijkomt, en het feit dat dit ijzer gebruikt kan worden voor de hemoglobinesynthese, zijn eveneens een steun voor de hypothese dat transferrine niet intracellulair hoeft te worden opgenomen om ijzer af te geven (56).

- IV. Eveneens ter ondersteuning van de hypothese van Jandl en Katz dient de waarneming dat ijzer van aan sepharosedeeftjes gekoppelde transferrine door intacte reticulocyten gebruikt kan worden voor de hemoglobinesynthese, aangezien aan sepharose gekoppeld transferrine niet door endocytose in het cytoplasma kan worden opgenomen (57).

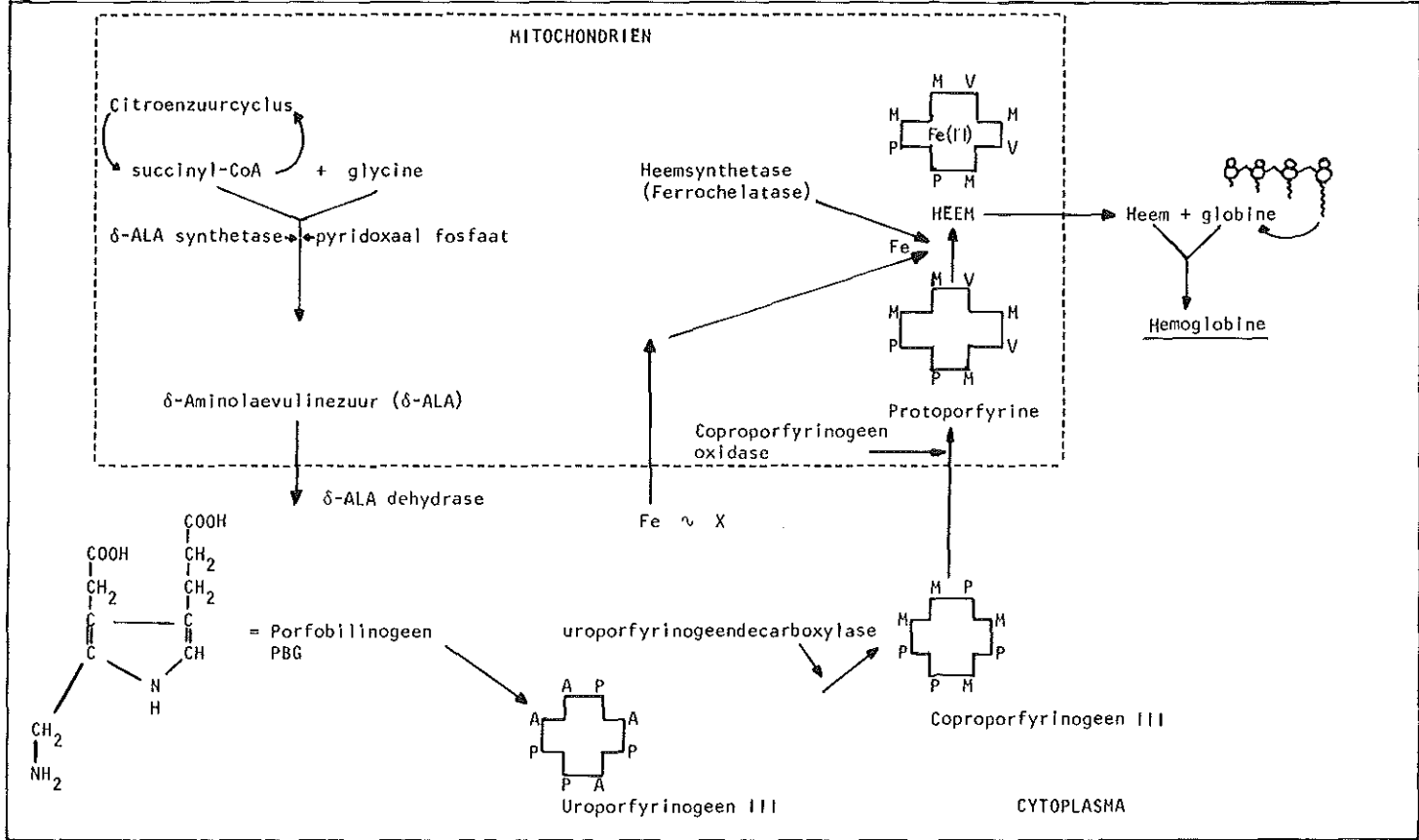
B) Argumenten die de hypothese van Morgan steunen:

Afgifte van ijzer door intracellulair opgenomen transferrine.

- I. Morgan en Appleton concludeerden op grond van autoradiografiestudies dat 40% van het cellulaire transferrine zich in het cytoplasma bevindt (58).
- II. Elektronenmicroscopisch onderzoek van reticulocyten, die geïncubeerd zijn met aan ferritine geconjugeerd transferrine, toont ferritine in het cytoplasma aan. Gezien de relatieve molecuulmassa van ferritine moet dit gepinocyteerd zijn (59).
- III. In diverse studies wordt in de cytosol van reticulocyten, geïncubeerd met $^{59}\text{Fe}/^{125}\text{I}$ gemerkt transferrine, een, overigens sterk verschillende hoeveelheid transferrine, gevonden (5-60%) (37, 41, 60). In geen van deze studies is het echter duidelijk of het in de cytosol aanwezige transferrine niet een contaminatie is, welke tijdens de bereiding van ghost en cytosol van de ghost afsplitst, zoals ook voor membraan-gebonden enzymen is aangetoond (61).

Op grond van onder A en B genoemde argumenten is een definitief antwoord op de vraag of transferrine tijdens het proces van de ijzeropname, naar het cytoplasma wordt getransporteerd, nog niet te geven.

IJzer dat naar het cytoplasma is getransporteerd, wordt voor een groot deel door de mitochondriën opgenomen, en vormt na inbouw in protoporfyrine de heemgroep. Dit heem verlaat de mitochondriën weer om in het cytoplasma te reageren met het, op de polyribosomen geproduceerde globine waarbij hemoglobine ontstaat. De productie van hemoglobine wordt schematisch weergegeven in schema I. Over de wijze waarop het in het cytoplasma aanwezige ijzer de mitochondriën bereikt, bestaan verschillende meningen. Aanvankelijk bleek uit verschillende experimenten dat zich in de cytosol van met ^{59}Fe -transferrine geïncubeerde reticulocyten naast hemoglobine nog een hoog-moleculaire ^{59}Fe -gemarkte eiwitfractie bevond. De veranderingen van de ^{59}Fe -activiteit van deze component in het verloop van de incubatietijd deed vermoeden dat dit eiwit als intermediair tussen transferrine en de mitochondriën fungeerde (62, 63, 64). In een onderzoek van Zail et al. (65) werd in de cytosol van met ^{59}Fe -transferrine geïncubeerde reticulocyten naast de radioactieve hoog-moleculaire eiwitcomponent ook ^{59}Fe -gemarkt ferritine gevonden. Dit ferritine werd een opslagfunctie toegedacht voor ijzer dat niet direct voor de hemoglobinesynthese



A = -CH₂ - COOH M = -CH₃ X - nog onbekend eiwit
 P = -CH₂ - CH₂ - COOH V = -CH = CH₂

Schema I

Literatuur

1. WALSH, R.J., THOMAS, E.D., CHOW, S.K., FLUHARTY, R.G. and FINCH, C.A. (1949). Iron metabolism. Heme synthesis in vitro by immature erythrocytes. *Science* *110*, 396-398.
2. JANDL, J.H., INMAN, J.K., SIMMONS, R.L. and ALLEN, D.W. (1959). Transfer of iron from serum iron-binding protein to human reticulocytes. *J. Clin. Invest.* *38*, 161-185.
3. JANDL, J.H. and KATZ, J.H. (1963). The plasma-to-cell cycle of transferrin. *J. Clin. Invest.* *42*, 314-326.
4. BESSIS, M.C. and BRETON-GORIUS, J. (1957). Iron particles in normal erythroblasts and normal and pathological erythrocytes. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* *3*, 503-508.
5. BESSIS, M.C. and BRETON-GORIUS, J. (1959). Ferritin and ferruginous micelles in normal erythroblasts and hypochromic hypersideremic anemias. *Blood* *14*, 423-428.
6. HEILMEYER, L., KELLER, W., VIVELL, O., KEIDERLING, W., BETKE, K., WÖHLER, F. and SCHULTZE, H.E. (1961). Kongenitale atransferrinämie bei einem sieben Jahre alten Kind. *Dtsch. Med. Wschr.* *86*, 1745-1751.
7. GOYA, N., MIYAZAKI, S., KODATE, S. and USHIO, B. (1972). A family of congenital atransferrinemia. *Blood* *40*, 239-245.
8. LAJTHA, L.G. and SUIT, H.D. (1955). Uptake of radioactive Iron (^{59}Fe) by nucleated red cells in vitro. *Brit. J. of Haematol.* *1*, 55-61.
9. ELDOR, A., MANNY, N. and IZAK, G. (1970). The effect of transferrin-free serum on the utilization of iron by rabbit reticulocytes. *Blood* *36*, 233-238.
10. MORGAN, E.H. and LAURELL, C.B. (1973). Studies of the exchange of iron between transferrin and reticulocytes. *Brit. J. of Haematol.* *7*, 471-483.
11. MORGAN, E.H. (1964). The interaction between rabbit, human and rat transferrin and reticulocytes. *Brit. J. of Haematol.* *10*, 442-452.
12. BAKER, E. and MORGAN, E.H. (1969). The kinetics of the interaction between rabbit transferrin and reticulocytes. *Biochemistry* *8*, 1133-1141.
13. KORNFIELD, S. (1968). The effects of structural modifications on the biologic activity of human transferrin. *Biochemistry* *7*, 945-954.
14. EDWARDS, S.A. and FIELDING, J. (1971). Studies of the effect of sulphhydryl and other inhibitors on reticulocyte uptake of doubly-labelled transferrin. *Brit. J. of Haematol.* *20*, 405-416.
15. KAILIS, S.G. and MORGAN, E.H. (1974). Transferrin and iron uptake by rabbit bone marrow cells in vitro. *Brit. J. of Haematol.* *28*, 37-52.
16. BAKER, E. and MORGAN, E.H. (1969). The role of iron in the reaction between rabbit transferrin and reticulocytes. *Biochemistry* *8*, 2954-2958.
17. LANE, R.S. (1973). Iron uptake by rabbit reticulocytes. *Brit. J. of Haematol.* *24*, 343-353.
18. ZAPOLSKI, E.J. and PRINCIOTTO, J.V. (1977). Preferential utilization in vitro of iron bound to diferric transferrin by rabbit reticulocytes. *Biochemistry Journal* *166*, 175-179.
19. LANE, R.S. (1972). Transferrin-reticulocyte binding: evidence for the functional importance of transferrin conformation. *Brit. J. of Haematol.* *22*, 309-317.
20. VERHOEF, N.J., KREMERS, J.H.W. and LEIJNSE, B. (1973). The effect of heterologous transferrin on the uptake of iron and haem synthesis by bone marrow cells. *Biochim. Biophys. Acta* *304*, 114-122.
21. FLETCHER, J. and HUEHNS, E.R. (1967). Significance of the binding of iron by transferrin. *Nature, Lond.* *215*, 584-586.
22. FLETCHER, J., and HUEHNS, E.R. (1968). Function of transferrin. *Nature, Lond.* *218*, 1211-1214.
23. AISEN, P. and BROWN, E.B. (1975). Structure on function of transferrin. In: *Progress in Haematology* *9*, 25-26 (Brown, E.B., ed.) Uitg. Grunc and Stratton, New York.
24. AISEN, P. and BROWN, E.B. (1977). The iron-binding function of transferrin in iron metabolism. *Semin. Haematol.* *14*, 31-53.
25. BROWN, E.B. (1977). Transferrin physiology and function in iron transport. *Ciba foundation symposium* *51* (new series), 125-143, Uitg.: Elsevier, Exc. Med., North-Holland.
26. HUEBERS, H., HUEBERS, E., CISBA, E. and FINCH, C.A. (1978). Iron uptake from rat plasma transferrin by rat reticulocytes. *J. Clin. Invest.* *62*, 944-951.
27. MORGAN, E.H., HUEBERS, H. and FINCH, C.A. (1978). Differences between the binding sites for iron-binding and release in human and rat transferrin. *Blood* *52*, 1219-1228.
28. VAN BAARLE, J., BROUWER, J.T., LEIBMAN, A. and AISEN, P. (1980). Evidence for the functional heterogeneity of the two sites of transferrin in vitro. *Brit. J. of Haematol.* *46*, 417-426.

29. CANNON, J.C. and CHASTEEN, N.D. (1975). Non-equivalence of the metal binding sites in vanadyl-labeled human serum transferrin. *Biochemistry* *14*, 4573-4577.
30. AISEN, P., LEIBMAN, A. and ZWEIER, J. (1978). Stoichiometric and site characteristics of the binding of iron to human transferrin. *J. Biol. Chem.* *253*, 1930-1937.
31. PRINCIOTTO, J.V. and ZAPOLSKI, E.J. (1976). Functional heterogeneity and pH-dependent dissociation properties of human transferrin. *Biochem. Biophys. Acta* *428*, 766-771.
32. HARRIS, D.C. (1977). Different metal-binding properties of the two sites of human transferrin. *Biochemistry* *3*, 560-564.
33. MAKEY, D.G. and SEAL, U.S. (1976). The detection of four molecular forms of human transferrin during the iron-binding process. *Biochem. Biophys. Acta* *453*, 250-256.
34. KORNFELD, S. (1969). The effect of metal attachment to human apotransferrin on its binding to reticulocytes. *Biochim. Biophys. Acta* *194*, 25-33.
35. VERHOEF, N.J. and NOORDELOOS, P.J. (1977). Binding of transferrin and uptake of iron by rat erythroid cells in vitro. *Clin. Science and Mol. Medicine* *52*, 87-96.
36. NUNEZ, M.T., GLASS, J., FISCHER, S., LAVIDOR, L.M., LENK, E.M. and ROBINSON, S.H. (1977). Transferrin receptors in developing murine erythroid cells. *Brit. J. of Haematol.* *36*, 519-526.
37. GARRET, N.E., BURRIS GARRET, R.J. and ARCHDEACON, J.W. (1973). Solubilization and chromatography of iron-binding compounds from reticulocyte stroma. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* *52*, 466-474.
38. SPEYER, B.E. and FIELDING, J. (1974). Chromatographic fractionation of human reticulocytes after uptake of doubly labelled ⁵⁹Fe, ¹²⁵I-transferrin. *Biochem. Biophys. Acta* *332*, 192-200.
39. FIELDING, J. and SPEYER, B.E. (1974). Iron transport intermediates in human reticulocytes and the membrane binding site of iron-transferrin. *Biochim. Biophys. Acta* *336*, 387-396.
40. VAN BOCKXMEER, F.M., HEMMAPLARDH, D. and MORGAN, E.H. (1975). Studies on the binding of transferrin to cell membrane receptors. In: *Protein of Iron Storage and Transport in Biochemistry and Medicine* (Ed.: Crichton, R.R.) Uitg.: North-Holland Publ. Company, pp. 111-119.
41. SLY, D.A., GROHLICH, D. and BEZKOROVAIHY, A. (1975). Transferrin receptors from reticulocyte membranes and cytosol. In: *Protein of Iron Storage and Transport in Biochemistry and Medicine* (Ed.: Crichton, R.R.) Uitg.: North-Holland Publ. Company, pp.
42. AISEN, P., LEIBMAN, A., YUN YANG HU, H. and SKOULTCHI, A.I. (1977). Studies on transferrin receptors of erythroid cells. In: *Protein of Iron Metabolism* (Eds.: Brown, E.B., Aisen, P., Fielding, J. and Crichton, R.R.) Uitg.: Grune & Stratton, pp. 281-309.
43. LEIBMAN, A. and AISEN, P. (1977). Transferrin receptor of the rabbit reticulocyte. *Biochemistry* *16*, 1268-1272.
44. VAN BOCKXMEER, F.M. and MORGAN, E.H. (1977). Identification of transferrin receptors in reticulocytes. *Biochim. Biophys. Acta* *468*, 437-450.
45. NUNEZ, M.T., FISCHER, S., GLASS, J. and LAVIDOR, L. (1977). The cross-linking of ¹²⁵I-labelled transferrin to rabbit reticulocytes. *Biochim. Biophys. Acta* *490*, 87-93.
46. LIGHT, N.D. (1977). The isolation and partial characterization of transferrin binding components of the rabbit reticulocyte plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta* *495*, 46-57.
47. LIGHT, N.D. (1978). Further studies on the rabbit erythroid cell plasma membrane transferrin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *81*, 261-267.
48. SULLIVAN, A.L. and WEINTRAUB, L.R. (1978). Identification of ¹²⁵I-labelled rat reticulocyte membrane proteins with affinity for transferrin. *Blood* *52*, 436-446.
49. WITT, D.P. and WOODWORTH, R.C. (1978). Identification of the transferrin receptor of the rabbit reticulocyte. *Biochemistry* *17*, 3913-3917.
50. SLY, D.A., GROHLICH, D. and BEZKOROVAIHY, A. (1979). Transferrin receptor from rabbit reticulocyte membranes. In: *Cell Surface Carbohydrate Chemistry*, Uitg.: Academic Press, Inc. New York-San Francisco-London, pp. 255-268.
51. GLASS, J., NUNEZ, M.T. and ROBINSON, S.H. (1980). Transferrin-binding and iron-binding proteins of rabbit reticulocyte plasma membranes. Three distinct moieties. *Biochim. Biophys. Acta* *598*, 293-304.
52. ECAROT-CHARRIER, B., GREY, V.L., WILCZYNSKA, A. and Schulman, H.M. (1980). Reticulocyte membrane transferrin receptors. *Can. J. Biochem.* *58*, 418-426.
53. FALBE-HANSEN, I. and LOTHE, K. (1962). In vivo incorporation of ⁵⁹Fe into non-heme iron and hemoglobin of red blood cells. *Acta Phys. Scand.* *54*, 97-104.
54. LOTHE, K. and FALBE-HANSEN, I. (1963). Incorporation of ⁵⁹Fe into erythrocyte non-

- haem iron and haemoglobin in anaemic and leadpoisoned rabbits. *Clin. Science*. *24*, 47-54.
55. SPEYER, B.E. and FIELDING, J. (1975). Iron transport intermediates in reticulocytes and the binding site of iron transferrin. In: *Proteins of Iron Storage and Transport in Biochemistry and Medicine* (Ed.: Crichton, R.R.) Uitg.: North-Holland Publ. Company, pp. 121-126.
 56. WORKMAN, E.F. and BATES, G.W. (1974). Mobilization of iron from reticulocyte ghosts by cytoplasmic agents. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *58*, 787-794.
 57. GLASS, J., NUNEZ, M.T. and ROBINSON, S.H. (1977). Iron transport from sepharose-bound transferrin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *75*, 226-232.
 58. MORGAN, E.H. and APPLETON, T.C. (1969). Autoradiographic localization of ¹²⁵I-labelled transferrin in rabbit reticulocytes. *Nature* *223*, 1371-1372.
 59. SULLIVAN, A.L., GRASSO, J.A. and WEINTRAUB, L.R. (1976). Micropinocytosis of transferrin by developing red cells: An electron microscopy study utilizing ferritin-conjugated transferrin and ferritin conjugated antibodies to transferrin. *Blood* *47*, 133-143.
 60. MARTINEZ-MEDELLIN, J. and SCHULMAN, H.M. (1972). The kinetics of iron and transferrin incorporation into rabbit erythroid cells and the nature of stromal-bound iron. *Biochim. Biophys. Acta* *264*, 272-284.
 - 61.
 62. FABER, M. and FALBE-HANSEN, I. (1959). Non-haem iron in erythrocytes as a precursor for haemoglobin. *Nature* *184*, 1043-1044.
 63. ALLEN, D.W. and JANDL, J.H. (1960). Kinetics of intracellular iron in rabbit reticulocytes. *Blood* *15*, 71-81.
 64. GREENOUGH, W.B., PETERS, T. and THOMAS, E.D. (1962). An intracellular protein intermediate for hemoglobin formation. *J. Clin. Invest.* *41*, 1116-1124.
 65. ZAIL, S.S., CHARLTON, R.W., TORRANCE, J.D. and BOTHWELL, T.H. (1964). Studies on the formation of ferritin in red cell precursors. *J. Clin. Invest.* *43*, 670-680.
 66. MAZUR, A. and CARLETON, A. (1963). Relation of ferritin iron to heme synthesis in marrow and reticulocytes. *J. Biol. Chem.* *238*, 1817-1824.
 67. FIELDING, J. and SPEYER, B.E. (1977). Ferritin as a cytosol transport protein: does transferrin enter reticulocytes? In: *Proteins of Iron Metabolism* (Eds.: Brown, E.B., Aisen, P., Fielding, J. and Crichton, R.R.) Uitg.: Grune & Stratton, pp. 311-318.
 68. SPEYER, B.E. and FIELDING, J. (1979). Ferritin as a cytosol iron transport intermediate in human reticulocytes. *Brit. J. Haematol.* *42*, 255-267.
 69. PRIMOSIGN, J.V. and THOMAS, E.D. (1968). Studies on the partition of iron in bone marrow cells. *J. Clin. Invest.* *47*, 1473-1482.
 70. BOROVA, J., PONKA, P. and NEUWIRT, J. (1973). Study of intracellular iron distribution in rabbit reticulocytes with normal and inhibited heme synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* *320*, 143-156.
 71. BLACKBURN, G.W. and MORGAN, E.H. (1977). Factors affecting iron and transferrin release from rabbit reticulocyte ghosts to cytosol. *Biochim. Biophys. Acta* *497*, 728-744.
 72. NUNEZ, M.T., GLASS, J. and ROBBINSON, S.H. (1978). Mobilization of iron from the plasma membrane of the murine reticulocyte. The role of ferritin. *Biochim. Biophys. Acta* *509*, 170-180.
 73. NUNEZ, M.T., CATE, E.S. and GLASS, J. (1980). Cytosol intermediates in the transport of iron. *Blood* *55*, 1051-1055.
 74. PONKA, P., NEUWIRT, J., BOROVA, J. and FUCHS, O. (1977). Control of iron delivery to haemoglobin in erythroid cells. In: *Iron Metabolism*, 167-200, Ciba foundation, Symposium 51, Elsevier Excerpta Medica, North-Holland.
 75. ZUYDERHOUDT, F.M.J. (1979). *Academisch Proefschrift: Some aspects of iron storage and storage iron in human and rat liver* (Amsterdam).

HOOFDSTUK II

Algemene methoden

Inleiding

In dit hoofdstuk volgt een bespreking van die methoden, welke regelmatig gebruikt worden voor de experimenten, beschreven in de volgende hoofdstukken. Methoden, welke alleen betrekking hebben op de experimenten van één bepaald hoofdstuk, worden in dat betreffende hoofdstuk besproken.

- A. Chemicaliën;
- B. Isotopen;
- C. De bereiding van transferrine;
 - I. Humaan transferrine;
 - II. Rattentransferrine: 1) isolatie transferrine door gelfiltratie;
2) zuivering door isoelektrische focussing;
3) bereiding CNBr-Sepharose-4B-antitransferrine;
4) isolatie transferrine d.m.v. affiniteitschromatografie.
- D. De bereiding van ijzervrije transferrine-oplossingen;
- E. Het radioactief merken van transferrine met ^{125}I ;
- F. Het opladen van transferrine met ^{59}Fe ;
- G. Het verkrijgen van reticulocyten en beenmergcellen van de rat;
- H. Algemene incubatieprocedures van rattenreticulocyten met transferrine;
- I. De bereiding van reticulocyten ghostsuspensies;
- J. Radioactiviteitsmetingen;
- K. De bereiding van antilichamen.

A. Chemicaliën

Alle gebruikte chemicaliën waren van pro-analyse kwaliteit.

Gebruikte media:

- 1) "phosphate-buffered saline" volgens Dulbecco, zoals gebruikelijk aangeduid als PBS (1).
- 2) Hanks' balanced salt solution (2).
- 3) Minimal essential medium (MEM), met Hanks' salts en 20 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-ethane sulphonic acid (HEPES).
- 4) foetaal kalfsserum.

Behalve PBS werden de gebruikte media en het foetale kalfsserum betrokken van Flow Laboratories, Irvine, Schotland. PBS werd van Oxford Lt (Engeland) betrokken.

B. Isotopen

^{59}Fe werd verkregen als Fe(III) citraat met een specifieke activiteit van 5-20 Ci/g ijzer.

^{125}I werd verkregen als natriumjodide, dragervrij en vrij van reducerende stoffen (IMS 30).

Beide isotopen waren afkomstig van Radiochemical Centre, Amersham, Bucks, Engeland.

C. Transferrine

C_I : *Humaan transferrine* werd verkregen van Kabi, Zweden

C_{II} : *Rattentransferrine*

$C_{II.1}$: *Rattentransferrine* werd eerst uit serum geïsoleerd door gelfiltratie over Sephadex G-150, waarna een zuivering door ionen uitwisselingschromatografie over DEAE-Sephadex-A-50 volgde (5).

$C_{II.2}$: *Zuivering van het verkregen transferrinepreparaat door isoelektrische focusering* (3, 4).

De isoelektrische focusering werd verricht in een ampholine kolom (nummer 8101) van 150 ml (LKB). Het medium was samengesteld uit een 1% ampholine-oplossing (Ampholine Carrier Ampholytes, LKB) in een pH-interval van circa 5,6-6,1, waaraan 0,1% ampholines (LKB) in het pH-interval van 3-10 was toegevoegd. Deze oplossing werd met behulp van een gradient mixer (LKB 8121) in een 5-45%-ige sucrosegradient in de kolom gebracht; 50-150 mg rattentransferrine werd opgelost in 2-6 ml ampholine-oplossing, die 250 mg sucrose/ml bevatte. Deze oplossing werd halverwege de sucrosegradient in de kolom gebracht. Isoelektrische focusering werd uitgevoerd gedurende 45-65 uur (15° ; 1-2,5 Watt). De geïsoleerde fractie van de kolom, die uitsluitend transferrine bevatte, werd geconcentreerd en vervolgens gedialyseerd tegen gedestilleerd water en daarna tegen een 1 mmol NaCl/l oplossing. Tegen dit gezuiverde transferrinepreparaat werden antilichamen opgewekt bij konijnen.

$C_{II.3}$: *Bereiding CNBr-Sephrose-4B antitransferrine kolom* (3,4). De geïsoleerde anti-rattentransferrine antilichamen werden gekoppeld aan met CNBr-geactiveerde Sephrose-4B (Pharmacia, Zweden).

Gebruikte buffers:

Koppelingsbuffer: boraat 0,1 mol/l pH 8,5 die 0,5 mol NaCl/l bevat.

Wasbuffers : boraat 0,1 mol/l pH 8,5 die 1,0 mol NaCl/l bevat.

: acetaat 0,1 mol/l pH 4,0 die 1,0 mol/l NaCl/l bevat.

De overgebleven vrije groepen aan de CNBr-Sepharose, nadat de koppeling met anti-rattentransferrine had plaatsgevonden, werden geblokkeerd met de koppelingsbuffer waaraan 1 mol ethanolamine/l was toegevoegd. De hoeveelheid aan Sepharose gebonden antitransferrine varieerde van 10-40 mg/g Sepharose.

C_{II}.4: Isolatie rattentransferrine met CNBr-Sepharose-4B antitransferrine.

Elutiebuffers voor Sepharose kolom:

startbuffer: 0,1 M fosfaat-citraat, pH 7,2, bevattende 0,25 mol NaCl/l buffer.

elutiebuffer: 0,1 M fosfaat-citraat, pH 2,8, bevattende 0,25 mol NaCl/l buffer.

Rattensera werden 1:1 verdund met 0,2 M fosfaat-citraat, pH 7,2 bevattende 0,5 mol NaCl/l buffer.

Na elutie werd de pH van de oplossing welke transferrine bevat op pH 7,8 gebracht en een overmaat ijzercitraat in 0,02 mol (NH₄)₂ CO₃/l toegevoegd om het transferrine in de oplossing te stabiliseren. (Tf.2Fe is stabiel dan elke andere vorm van transferrine.)

De verkregen transferrine-oplossing werd geconcentreerd en vervolgens tweemaal gedialyseerd tegen gedestilleerd water, waarna dialyse tegen 1 mmol NaCl/l volgde.

De eiwitoplossingen werden hierna lyophil gedroogd en opgeslagen bij -20°C. De dialyses werden uitgevoerd door de te dialyseren oplossing in dialysemembranen over te brengen.

D. Bereiding ijzervrije transferrine-oplossingen

Een ijzer-bevattende transferrine-oplossing (zie C) werd tweemaal gedialyseerd tegen 0,02 M dinatrium EDTA in een 0,05 molair azijnzuurnatriumacetaatbuffer (pH 5,0). De EDTA werd verwijderd door tegen aqua bidest te dialyseren. Vervolgens werd de transferrine-oplossing tweemaal tegen een 0,1 mol/l fosfaatbuffer pH 7,4 gedialyseerd.

E. Radioactief merken van transferrine met ¹²⁵I.

Voor het merken van transferrine met ¹²⁵I werd gebruik gemaakt van de methode van Katz (6). De joderingsoplossing bevatte I₂ en NaI in een molaire verhouding van 1:2 of in verhouding van 1:4 waaraan Na ¹²⁵I was toegevoegd. Een 10%-ige transferrine-oplossing werd gedialyseerd tegen een 0,1 M tris-HCl buffer van pH 8,5. De joderingsoplossing werd druppelsgewijs bij de op 0°C gekoelde transferrine-oplossing gevoegd (verhouding eiwit : ¹²⁵I = 1:1 op mol basis). Het verkregen mengsel werd gedurende 5 uur onder voortdurend roeren bij 4°C bewaard, waarna de over-

maat ^{125}I werd verwijderd door de oplossing over een anionenwisselaar (Amberlite IR Cl⁻) te scheiden. De eiwitfracties met de hoogste ^{125}I -activiteit werden samengevoegd en gedialyseerd tegen een 0,1 M fosfaatbuffer pH 7,4;

F. Het merken van ^{125}I -transferrine met ^{59}Fe

Tenzij anders vermeld werd aan 1 ml van een gezuiverde transferrine-oplossing (40 nmol/ml PBS) $^{59}\text{Fe(III)}$ -citraat toegevoegd, tot een verzadigingspercentage was bereikt van ongeveer 30% (1 mol Tf bindt maximaal 2 mol Fe(III)). De $^{59}\text{Fe(III)}$ -citraatoplossing bevatte 0,5-0,9 μg ijzer met een specifieke activiteit van circa 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ ijzer. Bij het opladen met ^{59}Fe werd tevens een 5%-ige natrium-bicarbonaat-oplossing toegevoegd, als donor van het anion HCO_3^- , wat bij de binding van Fe(III) aan transferrine een belangrijke rol speelt. (Verhouding Fe : NaHCO_3 = 1:20.) De oplossing werd voor gebruik een nacht bij 4°C bewaard.

G. Het verkrijgen van reticulocyten en beenmergcellen van de rat

1. Reticulocyten

In normale mannelijke Wistar ratten (200-250 g) werd een reticulocytose geïnduceerd door gedurende 5 dagen iedere dag 5-7 ml bloed af te nemen door middel van orbitapuncties. Tussen de derde en vierde orbitapunctie ligt een interval van drie dagen. Deze handelwijze resulteerde in een reticulocytenpercentage dat varieerde tussen de 25-65%. Indien het gewenste reticulocytenpercentage was verkregen, werden de ratten verbloed, waarbij het bloed werd opgevangen in 40 ml buizen die 500 E heparine bevatten. Preparaten werden gekleurd met een Brilliant Cresyl blue oplossing.

Na verwijdering van het plasma werden de cellen vijfmaal gewassen met koude 300 mosmol PBS, pH 7,4, waarbij tevens de "buffy coat" werd verwijderd; deze procedure veroorzaakte bijna geen verlies van reticulocyten. De verkregen celsuspensie wordt verder aangeduid als reticulocytensuspensie.

2. Beenmergcellen

De beenmergcellen werden verkregen uit femora en tibiae van de ratten (7). Deze botten werden doorgespoeld met een koude Hanks' balanced salt solution, waaraan foetaal kalfsserum was toegevoegd (5% v/v).

Nadat de celsuspensie voorzichtig met een Pasteurse pipet was opgezogen, werden overblijvende celaggregaten verwijderd door filtratie over nylon gaas. De cellen werden gesedimenteerd door middel van centrifugatie bij 200 g gedurende 7 minuten, bij 4°C. Het aantal kernhoudende cellen in de suspensie werd bepaald door middel van een Toa microcell counter.

De celsuspensie werd na een May-Grunwald Giemsa kleuring beoordeeld en bevatte 36% kernhoudende erythroïde cellen en minder dan 5% macrofagen.

Vervolgens werd de celsuspensie zodanig in MEM gesuspenseerd, dat het aantal kernhoudende cellen $15 \cdot 10^6$ /ml medium bedroeg. De celtellingen werden uitgevoerd met een Toa microcel counter.

H. Algemene incubatieprocedure van erythroïde cellen met transferrine

Tenzij anders vermeld, werden de incubaties uitgevoerd in plastic weefselcultuurschaaltjes (35 x 10 mm, Falcon Plastics, Los Angeles) bij een temperatuur van 37°C in een atmosfeer van lucht/ CO_2 (95:5) gedurende 30 minuten.

H₁. Ter verkrijging van de membraanreceptor voor transferrine (hoofdstuk VI t/m IX) bevatte een typisch incubatiemengsel $1 \cdot 10^7$ rattenreticulocyten/ml of 1.5×10^7 kernhoudende beenmergcellen/ml gesuspenseerd in een medium dat bestond uit MEM met Hanks' salts en HEPES buffer (20 mmol/l), waaraan tevens bicarbonaat (eindconcentratie 9 mmol/l) en foetaal kalfsserum (5% v/v) waren toegevoegd. De rattentransferrineconcentratie in het mengsel bedroeg circa 5 nmol/ml. De binding van transferrine uit foetaal kalfsserum aan rattenreticulocyten en aan kernhoudende erythroïde beenmergcellen bedraagt slechts 12% ten opzichte van rattentransferrine (7).

H₂. Bij de incubatie-experimenten beschreven in hoofdstuk V werd geen foetaal kalfsserum toegevoegd en bedroeg de humane transferrineconcentratie 1-2 nmol/ml. De incubaties werden beëindigd door de incubatieschaaltjes bij 0°C te brengen en er een overmaat ijskoude 300 miliosmolare PBS van pH 7,4 aan toe te voegen. De celsuspensies werden vervolgens vijfmaal gewassen met een ijskoude 300 miliosmolare PBS pH 7,4 centrifugatiesnelheid 200 g, tijd 7 minuten, temperatuur 4°C .

I. De bereiding van reticulocyten ghostsuspensie

Bij de bereiding van een ghostsuspensie werd gebruik gemaakt van de voor erythrocyten beschreven methode van Dodge (8). Voor de bereiding van ghostsuspensies werden celsuspensies gebruikt die 40-60% reticulocyten bevatten.

De geïncubeerde celsuspensie werd gesuspenseerd in een PBS-oplossing van pH 7,4 (1:1), waarvan de osmolariteit 300 mosmol bedroeg. Hemolyse werd bewerkstelligd door 2 ml van de verkregen celsuspensie te pipetteren in 40 ml polypropyleen centrifugebuizen, die 28 ml 20 miliosmolair PBS, pH 7,4 bevatten. Vervolgens werd 40 minuten gecentrifugeerd bij 20.000 g in een Beckman ultracentrifuge (model L5-65). Het supernatant werd voorzichtig verwijderd van de pellet (ghostsuspensie), waarna de ghostsuspensie nog driemaal werd gewassen met de 20 miliosmolair natriumfosfaatbuffer, pH 7,4. De verkregen ghostsuspensie werd meestal direct opgelost met het niet-ionaire detergens Triton X-100 (zie hoofdstuk VI).

J. Radioactiviteitsmetingen

Radioactiviteitsmetingen werden uitgevoerd in een Packard autogammascintillation spectrometer 5120.

K. De bereiding van antilichamen

Antilichamen werden in konijnen opgewekt door 2-5 mg van het preparaat waartegen geïmmuniseerd werd, in Freund adjuvans (compl.:incompl. = 1:1) intracutaan in te spuiten in de voetzolen. De eerste boosterinjectie werd op de 15e dag intramusculair toegediend. De boosterinjecties werden vervolgens om de 10 dagen herhaald tot een antilichaamtiter van 1/16 in een Ouchterlony techniek was verkregen.

De antilichamen (= gammaglobulinefractie uit het serum) werden geïsoleerd door gelfiltratie van het serum over Sephadex G-150, waarna een zuivering door ionenuitwisselingschromatografie over DEAE-Sephadex A-50 plaatsvond (9).

Literatuur

1. DULBECCO, R. and VOGT, M. (1954). Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J. Exp. Med.* **99**, 167-182.
2. HANKS, J.H. and WALLACE, R.E. (1949). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **71**, 196-200.
3. VAN EIJK, H.G. and VAN NOORT, W.L. (1976). Isolation of rat transferrine using CNBr-activated Sepharose-4B. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **14**, 475-478.
4. VAN NOORT, W.L. and VAN EIJK, H.G. (1977). Affiniteitschromatografie met behulp van CNBr-geactiveerde Sepharose. Mogelijkheden en moeilijkheden. *Tijdschr. v. Med. Anal.* **32**, 185-194.
5. VAN EIJK, H.G. and LEIJNSE, B. (1968). The iron transporting system in the body. I. Isolation and partial characterization of rabbit transferrin. *Biochim. Biophys. Acta* **160**, 126-128.
6. KATZ, J.H. (1961). Iron and protein kinetics studies by means of doubly labeled human crystallin transferrin. *J. Clin. Invest.* **40**, 2143-2152.
7. VERHOEF, N.J., KREMERS, J.H.W. and LEIJNSE, B. (1973). The effect of heterologous transferrin on the uptake of iron and haem synthesis by bone marrow cells. *Biochim. Biophys. Acta* **304**, 114-122.
8. DODGE, J.T., MITCHELL, C. and HANAHAN, D.J. (1963). The preparation and chemical characteristics of hemoglobin free ghosts of human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **100**, 119-130.
9. VAN EIJK, H.G. (1963). Academisch Proefschrift: Isolatie, Zuivering en Karakterisering van enkele Bence Jones Eiwitten (Utrecht).

HOOFDSTUK III

Analyse van de twee ijzerbindingsplaatsen van transferrine

Inleiding

Zoals reeds in hoofdstuk I werd vermeld, beschikt het ijzertransporterende eiwit transferrine over twee ijzerbindingsplaatsen, de zogenaamde A- en B-plaats, gelegen in de C-terminale en N-terminale domains van het eiwitmolecuul. Er bestaan een aantal aanwijzingen dat er fysisch-chemische verschillen bestaan tussen beide ijzerbindingsplaatsen, zoals tot uiting komt in EPR-spectra (1, 2, 3) en dissociatieconstanten (1). Bovendien blijkt de associatie en dissociatie van ijzer op de twee bindingsplaatsen pH afhankelijk te zijn. Beneden een pH van 6,0 dissocieert ijzer van de B-plaats, terwijl bij een pH van 5,2 ijzer nog steeds op de A-plaats gebonden is (4, 5, 6).

Ondanks deze fysisch-chemische verschillen was het tot 1976 niet mogelijk om alle voorkomende vormen van transferrine, te weten apo-Tf, TfFe(A), TfFe(B) en Tf₂Fe, van elkaar te scheiden. Makey et al. (7) beschreven in 1976 een methode, waarmee zij door middel van polyacrylamide gel electroforese in een medium met 6 molair ureum in staat waren de vier vormen van transferrine van elkaar te scheiden. Deze scheidingsmethode wordt echter uitgevoerd in een onfysiologisch en denaturerend milieu.

In dit hoofdstuk wordt de ontwikkeling van een scheidingstechniek voor de vier vormen van transferrine beschreven, waarbij gebruik wordt gemaakt van "isoelektrische focusering in flat bed gels", in een medium zonder het denaturerende ureum. Tevens zal worden ingegaan op de omstandigheden, welke van invloed zijn op de vorming van TfFe(A) en TfFe(B), zoals de voor het opladen van transferrine gebruikte ijzerverbindingen en de ionaire samenstelling en pH van de voor het opladen gebruikte buffers.

Materiaal en Methoden

Humaan transferrine en apotransferrine (zie hoofdstuk II)

PBS — 2 tabletten (Oxoid Ltd. Engeland) werden opgelost in 100 ml aqua bidest.

NTA — nitrilotriazijnzuur en het driewaardig natriumzout, Na₃NTA werden van Sigma verkregen.

Bereiding NTA-buffer:

0,1 molair Na₃NTA werd getitreerd met 0,1 molair NTA tot de pH welke verlangd werd.

Bereiding van ferri nitrilotriacetaat,

voortaan aangeduid als FeNTA; 80 mg Fe_2O_3 werd opgelost in 40 ml 0,1 mol NTA/l (30 minuten verwarmen tot 90°C). De afgekoelde oplossing werd gedurende 5 minuten gecentrifugeerd, waardoor het onopgeloste materiaal werd neergeslagen. Het supernatant werd met 0,1 molair Na_3NTA op $\text{pH} = 8,0$ gebracht en vervolgens verdund met 0,1 molair natrium NTA-buffer, $\text{pH} 8,0$, tot de ijzerconcentratie van de oplossing 3 mmol/l bedroeg.

Het opladen van transferrine bij verschillende pH's

Een apotransferrine-oplossing werd toegevoegd aan een NTA-buffer met de verlangde pH. De uiteindelijke transferrineconcentratie bedroeg 6 g/l. Indien nodig werd de pH bijgesteld met NTA of Na_3NTA . Tenslotte werd de FeNTA toegevoegd tot de gewenste saturatie van het transferrine was bereikt; meestal was dit een 50%-ige verzadiging.

Bereiding polyacrylamide gel

Hier toe werd in grote lijnen het voorschrift van LKB, Zweden gevolgd (Application Notes 75 en 306) waarbij echter een aantal veranderingen werden aangebracht:

- a) In plaats van acrylamide en bisacrylamide werd Cyanogum-41 (Fischer Sci. Co) in een concentratie van 60 g/l gebruikt.
- b) Tevens bevatte de gel 120 g sucrose/l en 20 g Ampholine, $\text{pH} 5-7$ (LKB 1809-121), alsmede de voorgeschreven hoeveelheid riboflavine.

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

"Isoelektrische focussing"

De "isoelektrische focussing" werd, volgens voorschrift van LKB, uitgevoerd op de Multiphor (LKB 2117, Zweden). De gel werd vooraf gedurende 60-90 minuten geëlektroforeerd. Vervolgens werd op 1 cm van de kathode $5 \mu\text{l}$ monster op de gel gebracht. Het voltage werd ingesteld op een maximum van 1200 V (DC power supply 2103, LKB). De stroom en het vermogen waren ingesteld op respectievelijk 50 mA en 30 Watt. De optimale tijd voor focussing bedroeg 3 uur.

Het kleuren van de gel

Na de focussing werd de gel direct gekleurd met een volgens Blakesley (8) bereide Coomassie Brilliant Blue G250 (Serva, Heidelberg, Duitsland). Met Nitrosa-R-salz (Merck) werd een, door Smith (9) beschreven specifieke kleuring op ijzer uitgevoerd.

Plaatsbepaling van apotransferrine en diferric transferrine op de gel

Om de plaats van apotransferrine en diferric transferrine op de gel te bepalen, werden monsters van deze eiwitten apart op een gel gebracht. De "isoelektrische focussing" werd op de boven beschreven wijze uitgevoerd.

Resultaten

1. Isoelektrische focuseringspatronen van een vijftig procent met ijzer verzadigde transferrine-oplossing.

1.A. In PBS

In figuur 1 worden de resultaten weergegeven van isoelektrische focussing van een transferrine-oplossing, welke voor 50% met FeNTA in PBS is opgeladen bij verschillende pH's (incubatielijd 20 uur; incubatietemperatuur 20°C). Indien de op-

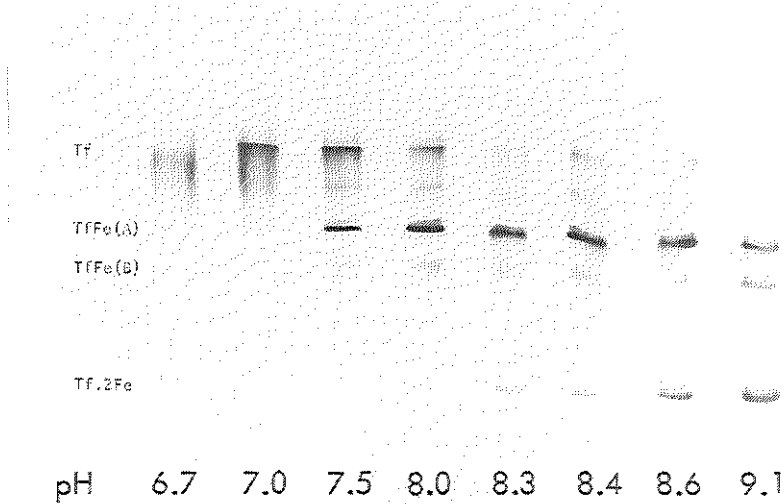


Fig. 1 Isoelektrische focussing van transferrinepreparaten, die in PBS met Fe zijn opgeladen tot een verzadiging van 50%. Er zijn vier "hoofd"-fracties te onderscheiden, apotransferrine, twee monoferric transferrinen en diferric transferrine. De benoeming van de dichtst bij de kathode gelegen monoferric transferrineband als A en de dichtst bij de anode gelegen monoferric band als B is overeenkomstig de literatuur (7).

lading bij pH 6,7 en 7,0 plaatsvindt, treedt blijkbaar, onder de beschreven omstandigheden (overmaat NTA^{3-} -ionen), geen binding van ijzer aan transferrine op. Bij pH 7,5-9,1 ontstaat een duidelijke transferrine-band met waarschijnlijk één ijzeratoom gebonden (TfFe(A)), gezien de plaats van deze band op de gel ten opzichte van apotransferrine en diferric transferrine. Er ontstaat ook een tweede zwakkere monoferric band (TfFe(B)); naarmate de pH hoger wordt, ontstaat er tevens steeds meer diferric

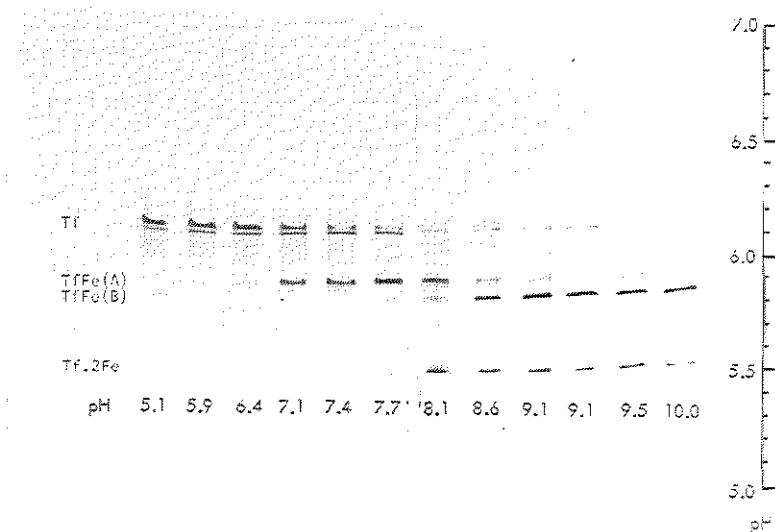


Fig. 2 Isoelektrische focussing van transferrinepreparaten, die in een NTA-buffer met Fe zijn opgeladen tot een verzadiging van 50%.

transferrine (Tf.2Fe). Indien transferrine met ijzer wordt opgeladen bij pH's, die liggen tussen 7,5 en 9, in aanwezigheid van fosfaationen, blijkt ijzer dus voornamelijk op de A-bindingsplaats gebonden te worden.

1.B. In een NTA-buffer

Indien het opladen van transferrine tot een 50%-ige verzadiging plaatsvond in een NTA-buffer in plaats van in PBS werden andere resultaten verkregen (figuur 2). De incubatietijd en incubatietemperatuur bedroegen respectievelijk 20 uur en 20°C. Bij een pH, lager dan 7,1 wordt voornamelijk apotransferrine gevonden. Bij een pH tussen 7,1 en 8,1 wordt voornamelijk TfFe(A) gevormd, terwijl bij een pH tussen 8,1 en 10 naast diferric transferrine vooral monoferric TfFe(B) ontstaat. Bij het opladen bij een pH tussen 8,1 en 10 neemt de intensiteit van de TfFe(A) band geleidelijk af. Indien de bij verschillende pH's opgeladen oplossingen gedurende verschillende tijden en bij verschillende temperaturen werden bewaard, bleek TfFe(A) de meest stabiele vorm. TfFe(B) ging voor een deel over in TfFe(A).

II. Isoelektrische focussing van een tot verschillende verzadigingspercentages opgeladen transferrine-oplossing

Transferrine werd opgeladen met Fe-NTA tot verzadigingspercentages welke gelegen waren tussen de 20 en 100% met een interval van telkens 20%. Het opladen vond plaats bij pH 7,4; 8,3 en 9,1; de incubatietemperatuur bedroeg 20°C; de incubatietijd 20 uur.

De resultaten van de isoelektrische focussing van de verschillende oplossingen

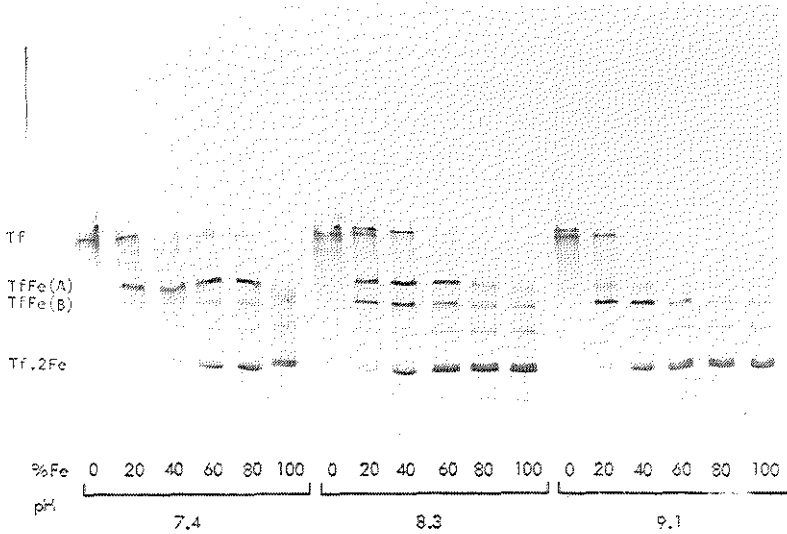


Fig. 3 Isoelektrische focussering van transferrinepreparaten, die met Fe tot verschillende verzadigingspercentages zijn opgeladen bij resp. pH 7,4; pH 8,3 en pH 9,1.

zijn weergegeven in figuur 3. Bij pH 7,4 wordt bij een verzadigingspercentage tussen de 20 en 60% voornamelijk de A-plaats van transferrine bezet. Bij verzadigingspercentages van 60 tot 80% vormen zich onder de beschreven omstandigheden vooral TfFe(A) en diferric transferrine. Bij pH 8,3 wordt reeds bij een verzadigingspercentage van 20% een toegenomen binding van Fe aan transferrine op de B-plaats waargenomen, terwijl bij pH 9,1 bij een verzadigingspercentage vanaf 20% voornamelijk TfFe(B) en diferric transferrine worden gevormd. Samenvattend kan gesteld worden dat bij pH 7,4 de A-plaats en bij pH 9,1 de B-plaats van transferrine de grootste affiniteit voor ijzer hebben.

III. De vorming van TfFe(A) en TfFe(B) bij pH = 9 en wisselende incubatietijd en incubatietemperatuur

De resultaten in figuur 4 laten zien dat bij het opladen van transferrine tot 50% verzadiging in een NTA-buffer met Fe-NTA en bij pH = 9 de vorming van TfFe(A) en TfFe(B) afhankelijk is van de incubatietijd en incubatietemperatuur. Bij een incuba-

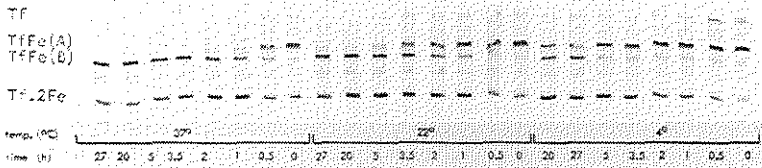


Fig. 4 Isoelektrische focussering van transferrinepreparaten, die in een NTA-buffer pH 9,0 met Fe zijn opgeladen tot een verzadiging van 50%. Variatie van de incubatietemperatuur (4, 22, 37°C) en incubatietijd (0-27 uur).

tietemperatuur van 4°C wordt ijzer tijdens de eerste 5 uur van de incubatie voornamelijk aan de A-plaats gebonden, na 20 en 27 uur wordt ijzer iets meer op de B-plaats aangetroffen. Bij 22°C is reeds na een incubatietijd van 2 uur meer ijzer op de B- dan de op de A-plaats gebonden, terwijl na 20 uur incuberen bijna uitsluitend TfFe(B) en Tf.2Fe voorkomen. Bij een incubatietemperatuur van 37°C wordt reeds na 30 minuten ijzer op de B-plaats gebonden en komen na een incubatietijd van 3½ uur uitsluitend TfFe(B) en Tf.2Fe voor. In de figuren zijn de resultaten van de Coomassie Brilliant Blue kleuringen weergegeven. De specifieke ijzerkleuringen kwamen hiermee, met betrekking tot TfFe(A), TfFe(B) en Tf.2Fe, overeen.

Discussie

Met FeNTA als ijzerdonor werd getracht om specifiek de A- en B-ijzerbindingsplaats op transferrine op te laden. Hierbij werd gebruik gemaakt van de mogelijk verschillende invloeden van de pH op de associatie van ijzer aan, en de dissociatie van ijzer van de A- en de B-ijzerbindingsplaats op transferrine.

Indien een NTA/Na₃NTA-buffer als incubatiemedium voor transferrine werd gebruikt, bleek het mogelijk om een specifiek met TfFe(A) of met TfFe(B) verrijkte oplossing te verkrijgen (figuur 2). Bij een pH lager dan 7,7 wordt ijzer voornamelijk op de A-plaats gebonden, terwijl bij een pH hoger dan 8,6 voornamelijk de B-plaats wordt opgeladen. Zoals uit de resultaten van figuur 2 blijkt, zijn de specifiek met TfFe(A) en TfFe(B) verrijkte oplossingen echter wel verontreinigd met apo-transferrine, de andere monoferric transferrine en met diferric transferrine. Het bleek dat de vier vormen van transferrine op flat bed gels, bij afwezigheid van het denaturerende ureum, door isoelektrische focussing goed van elkaar te scheiden zijn. Dit duidt op een verschil in isoelektrisch punt tussen apotransferrine, TfFe(A), TfFe(B) en Tf.2Fe.

Bij het specifiek opladen van transferrine blijken incubatietijd, incubatietemperatuur en incubatiemedium een belangrijke rol te spelen (figuur 3 en 4). Indien als incubatiemedium PBS in plaats van NTA/Na₃NTA-buffer werd gebruikt, bleek het tot pH 9,1 niet mogelijk om de B-ijzerbindingsplaats specifiek op te laden (figuur 1). Ondanks het feit dat bij een pH hoger dan 8,6, na 60 minuten incuberen bij 37°C, er voornamelijk TfFe(B) aanwezig is, doen de resultaten uit figuur 4 vermoeden dat de binding altijd eerst aan de A-plaats geschiedt, waarna een overgang naar de B-plaats plaatsvindt. Bij hogere incubatietemperaturen treedt de overgang van TfFe(A) in TfFe(B) sneller op.

De verkregen resultaten komen ten dele overeen met de conclusies welke Cannon et al. (2) trokken uit verkregen EPR spectra van TfFe(A) en TfFe(B) en waarbij bleek dat de binding van ijzer aan de B-plaats van transferrine afhankelijk was van de pH, terwijl de A-plaats deze pH-afhankelijkheid over een traject van pH 6-9 veel minder vertoonde. Tevens bleek uit hun resultaten dat bij pH 8-9 de B-plaats preferent ijzer bond.

Het feit dat bij de meest fysiologische in vitro omstandigheden (pH 7,4; aanwezigheid fosfaationen) TfFe(A) de meest stabiele monoferric transferrinevorm is, lijkt in tegenspraak met de bevindingen van Leibman en Aisen (10), dat in normaal

serum voornamelijk het labiele TfFe(B) voorkomt. Ook indien serum op de door ons beschreven isoelektrische focuseringsmethode werd onderzocht, bleek TfFe(B) in hogere concentratie aanwezig dan TfFe(A).

De verklaring hiervoor moet mogelijk gezocht worden in een in het serum aanwezige dialyseerbare fractie waardoor TfFe(B) de meest stabiele monoferric transferrinevorm wordt (11). Indien deze fractie niet aanwezig is, zoals bij experimenten met geïsoleerd transferrine als hier beschreven, blijkt TfFe(A) de meest stabiele monoferric vorm.

Literatuur

1. AISEN, P., LEIBMAN, A. and ZWEIER, J.L. (1978). Stoichiometric and site characteristics of the binding of iron to human transferrin. *J. Biol. Chem.* **253**, 1930-1937.
2. CANNON, J.C. and CHASTEEN, N.D. (1975). Nonequivalence of the metal binding sites in vanadyl-labeled human serum transferrin. *Biochemistry* **14**, 4573-4577.
3. ZWEIER, J.L. and AISEN, P. (1977). Studies of transferrin with the use of Cu^{2+} as an electron paramagnetic resonance spectroscopic probe. *J. Biol. Chem.* **252**, 6090-6096.
4. HARRIS, D.C. (1977). Different metal-binding properties of the two sites of human transferrin. *Biochemistry* **3**, 560-564.
5. PRINCIOTTO, J.V. and ZAPOLSKI, E.J. (1976). Functional heterogeneity and pH-dependent dissociation properties of human transferrin. *Biochim. Biophys. Acta* **428**, 766-771.
6. LESTAS, A.N. (1976). The effect of the pH transferrin: selective labelling of two iron-binding sites. *Brit. J. Haematol.* **32**, 341-349.
7. MAKEY, D.G. and SEAL, U.S. (1976). The detection of four molecular forms of human transferrin during the iron-binding process. *Biochim. Biophys. Acta* **453**, 250-256.
8. BLAKESLEY, R.W. and BOEZI, J.A. (1977). A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using Coomassie Brilliant Blue G250. *Anal. Biochem.* **82**, 580-582.
9. SMITH, I. (1968). *Chromatography and Electrofocussing*, Vol. II, p. 267. 2nd ed., William Heineman Ltd. (London).
10. LEIBMAN, A. and AISEN, P. (1979). Distribution of iron between the binding sites of transferrin in serum. *Blood* **53**, 1058-1065.
11. WILLIAMS, J. and MORETON, K. (1980). The distribution of iron between the metal-binding sites of transferrin in human serum. *Biochem. J.* **185**, 483-488.

HOOFDSTUK IV

Bereiding van zuiver humaan transferrine A en transferrine B met behulp van een preparatieve "isoelektrische focusserings"-techniek

Inleiding

Uit de resultaten van hoofdstuk III is gebleken dat de twee ijzerbindingsplaatsen van transferrine verschillende affiniteiten voor Fe(III) hebben bij verschillende pH en dat de twee "monoferric" transferrines 0,1 pH eenheid in isoelektrisch punt verschillen, op grond waarvan zij gescheiden kunnen worden. De vraag is echter of deze fysisch-chemische verschillen tussen beide bindingsplaatsen ook een functioneel verschil tussen deze vormen tot gevolg hebben, zoals de Fletcher en Huehns hypothese suggereert (1, 2). Volgens deze hypothese zou, zoals in hoofdstuk I is vermeld, ijzer gebonden op de A-plaats van transferrine voornamelijk worden afgegeven aan voorlopers van de erythrocyt, en ijzer gebonden op de B-plaats vooral aan de ijzeropslagplaatsen.

Bij het toetsen van deze hypothese zijn veel wisselende resultaten verkregen. Princiotto en Zapolski (3, 4) concludeerden op grond van incubatie-experimenten van humaan transferrine met konijnenreticulocyten dat slechts één van de aan humaan transferrine gebonden ijzeratomen aan reticulocyten kan worden afgegeven; later vonden zij dat beide ijzerbindingsplaatsen op konijntransferrine geen verschil vertoonden ten aanzien van de ijzerafgifte aan erythroïde cellen. Bij de incubatie-experimenten maakten deze onderzoekers gebruik van diferric transferrine of van transferrine-oplossingen die bij verschillende pH waren opgeladen. Huebers et al. (5) en Morgan et al. (6) vonden, gebruik makend van transferrine-oplossingen die bij neutrale pH met ijzer waren opgeladen en daarna tijdelijk in pH waren verlaagd, geen functionele verschillen tussen beide ijzerbindingsplaatsen van humaan, konijnen- en rattentransferrine. Gebruik makend van aanvankelijk met ^{59}Fe -NTA verzadigd humaan transferrine, dat met humane reticulocyten werd geïncubeerd tot 50% van het ^{59}Fe verwijderd was en vervolgens weer met ^{55}Fe -NTA werd verzadigd alvorens opnieuw met een humane reticulocytensuspensie geïncubeerd te worden, vonden Harris en Aisen geen verschil in ^{59}Fe en ^{55}Fe in een homolog systeem; indien zij echter bovengenoemde procedure, met humaan transferrine en konijnenreticulocyten uitvoerden, vonden zij een hogere opname van ^{55}Fe ten opzichte van ^{59}Fe (7).

Brown gebruikte de zojuist beschreven labelingstechniek voor rattentransferrine, dat hij vervolgens bij de ratten inspoort, waarna op gezette tijden de verhouding $^{55}\text{Fe}/^{59}\text{Fe}$ van erythroïde cellen en levercellen werd nagegaan.

Aanvankelijk werd op grond van de verkregen resultaten geconcludeerd dat er in vivo een functioneel verschil bestond tussen beide ijzerbindingsplaatsen van transferrine (8). Recent heeft Brown de verkregen voorkeursoptname van ^{55}Fe echter toe-

geschreven aan het feit dat bij de rat twee soorten transferrine voorkomen (zgn. slow- en fast-transferrine, 5, 9). Het ene type transferrine zou een voorkeur hebben voor erythroïde cellen, het andere type voor de ijzeropslagplaatsen; er zou geen functioneel verschil bestaan tussen beide ijzerbindingsplaatsen van transferrine (10). Anderen hebben het functionele verschil tussen het zgn. slow- en fast-transferrine niet kunnen bevestigen (5, 6).

De wisselende resultaten die bij het toetsen van de Fletcher en Huehns hypothese zijn verkregen, moeten waarschijnlijk voor een belangrijk deel worden toegeschreven aan het feit dat de experimenten niet met zuiver TfFe(A) en TfFe(B) konden worden uitgevoerd. De, door het opladen bij verschillende pH of door het verwijderen van ijzer van Tf₂Fe door preïncubatie met reticulocyten of door een tijdelijke verlaging van de pH, met één van de monoferric transferrinen verrijkte oplossingen bevatten, zoals ook uit de resultaten uit hoofdstuk III blijkt, een wisselende hoeveelheid apotransferrine, diferric transferrine en de andere monoferric transferrine (11, 12). Deze wisselende "verontreinigingen" kunnen debet zijn aan de wisselende resultaten, die werden verkregen bij het toetsen van de Fletcher en Huehns hypothese (11, 12).

Een oordeel over het Fletcher en Huehns model lijkt dan ook pas geveld te kunnen worden indien de incubaties met zuiver TfFe(A) en TfFe(B) worden uitgevoerd. In dit hoofdstuk wordt de bereiding van zuiver TfFe(A) en zuiver TfFe(B) beschreven, daarbij gebruik makend van het in hoofdstuk III aangetoonde verschil in isoelektrisch punt tussen beide "monoferric" transferrinen.

Materiaal en Methoden

Humaan transferrine en apotransferrine werden verkregen zoals in hoofdstuk II beschreven.

Nitrilotriacetaat (NTA) buffer; deze werd bereid door Na₃NTA te titreren met NTA tot de gewenste pH was verkregen.

Ampholines pH 5-7 en Ultrodex gel werden verkregen van LKB (Zweden).

Bereiding van "monoferric" transferrine Fe(A) en "monoferric" transferrine Fe(B)

Bij een oplossing van humaan apotransferrine (circa 60 g/l) werden 10 vol % van een 1 molair NTA buffer (1 mol/l) respectievelijk van pH 7,2 (voor TfFe(A)) en van pH 9,2 (voor TfFe(B)) gevoegd. De apotransferrine-oplossingen werden vervolgens met een gemengde ⁵⁶Fe/⁵⁹Fe citraatoplossing, welke circa 1 mMol Fe/l bevatte, tot een verzaadiging van 60% opgeladen. De ijzer-bevattende transferrine-oplossing werd een nacht bij kamertemperatuur bewaard en vervolgens gedurende 24 uur bij 4°C gedialyseerd tegen 1 liter 0,1 M Tris van respectievelijk pH 7 voor TfFe(A) en van pH 9 voor TfFe(B).

Na dialyse werden de transferrine-oplossingen gebruikt voor preparatieve isoelektrische focusering met een LKB 2117 Multiphor, welke werd uitgevoerd volgens

Application Note 198 (LKB), waarin een aantal wijzigingen werden aangegeven. In plaats van Sephadex G75, werd een "granulated" gel, Ultrodex, gebruikt. Vier gram van het lyophil gedroogde poeder werd gesuspenderd in 100 ml van een 2%-ige (w/v) ampholine pH 5-7 oplossing. De focussing werd uitgevoerd over een breed en kort gebied in plaats van over een lang en smal gebied. Tussen de glasplaat waarop de gel is gelegen en de glasplaat die voor koeling zorgt, werden twee velletjes vochtig filterpapier gelegd om na de focussing de transferrine-ijzer banden beter te kunnen onderscheiden.

Voordat het monster werd opgebracht werd gedurende 60-90 minuten voorfocussieerd. De voor-focussing werd begonnen met 500 V en 50 mA, welke waarden tijdens de focussing veranderden in 900 V en 35 mA. Maxima van 1200 V en 50 mA werden ingesteld voor de eigenlijke focussing. In verband met de betrekkelijk geringe stabiliteit van TffFe(B) in het onderhavige medium (zie resultaten) moest een snelle focussing met hoge spanning worden uitgevoerd.

In plaats van het monster met de gel te mengen, werd het monster opgebracht door het te laten absorberen in een droge elektrode strip (circa 70 μ l/cm strip) waarna de strip, evenwijdig met de elektrode strips en op 1 cm van de kathode, voorzichtig in de gel werd gedrukt. De focussing werd in 100-140 minuten verricht tot zich scherpe banden hadden gevormd, welke door hun rose kleur zichtbaar waren. Vervolgens werd met een glazen spatel dat gedeelte van de gel dat het eiwit bevatte in speciale elueerkolommen (LKB, 2117-502) overgebracht. TffFe(A) werd met 0,5 molair Tris pH 7, TffFe(B) met 0,5 molair Tris pH 8 van de kolom geëluëerd. De eluaten werden gedurende een nacht bij 4°C gedialyseerd tegen 1 liter van een 0,02 molair Tris buffer van pH 7 indien het TffFe(A) en van pH 8 indien het TffFe(B) betrof. De elutie- en dialysebuffer waren ijzer vrij gemaakt door de beide buffers over een kleine kolom met Chelex (Biorad) te elueren. Tenslotte werden de verkregen monsters op hun homogeniteit gecontroleerd met behulp van een "analytische isoelektrische focussing" op polyacrylamide gel zoals is beschreven in hoofdstuk III.

Resultaten

Figuur 1 toont de resultaten van een isoelektrische focussing op analytische schaal van een transferrinemonster (70 μ g). Het linker deel van deze figuur toont het patroon van een transferrine-oplossing, die werd opgeladen bij pH 7,2, waardoor voornamelijk TffFe(A) werd gevormd; het rechter deel toont het patroon van een oplossing opgeladen bij pH 9,2 waardoor voornamelijk TffFe(B) ontstond.

Figuren 2 en 3 tonen de preparatieve isoelektrische focussing resultaten in Ultrodex waarbij monsters van circa 70 mg werden opgebracht. Op de gels werd een ijzerkleuring toegepast, zodat apotransferrine niet zichtbaar is. Het linker gedeelte van figuur 2 toont TffFe(A), in het rechter deel de meest intens gekleurde TffFe(B). Figuur 3 vertoont de resultaten van een preparatieve isoelektrische focussing van een transferrinemonster dat specifiek op de B-plaats was opgeladen. Het linker deel van de figuur vertoont het resultaat, indien het monster voor focussing wél, het rechter deel, indien het monster voor focussing niet werd gedialyseerd.

Indien het monster met TffFe(B) werd gedialyseerd om chelatoren te verwijderen

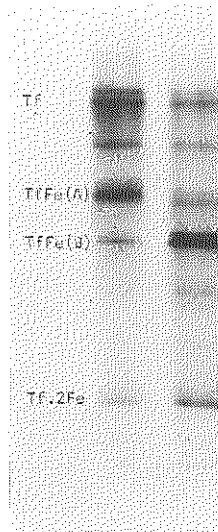


Fig. 1 Isoelektrische focussing van transferrine-preparaten, die bij pH 7.2 (links) en pH 9.2 (rechts) met Fe werden opgeladen.

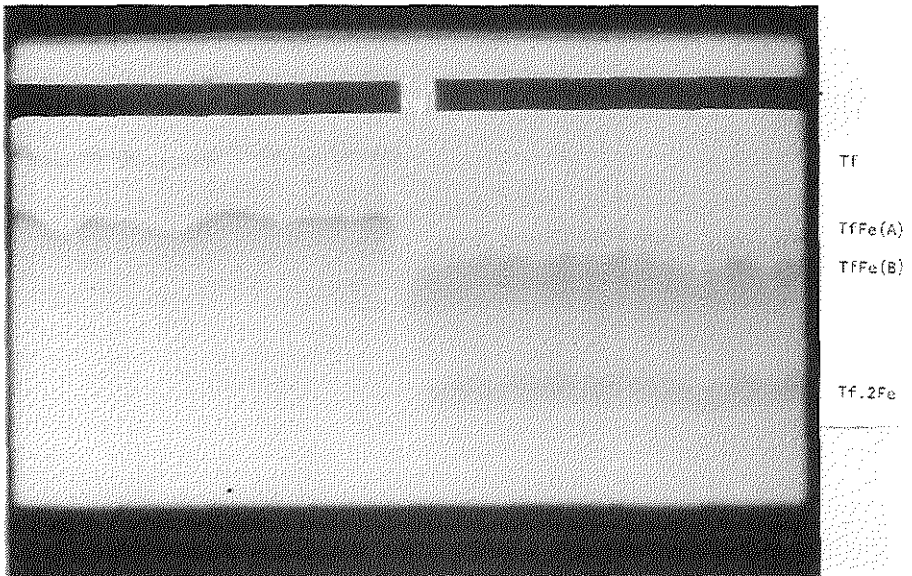


Fig. 2 Preparatieve isoelektrische focussing van specifiek opgeladen transferrine-preparaten. Links: transferrine Fe(A); rechts: transferrine Fe(B).

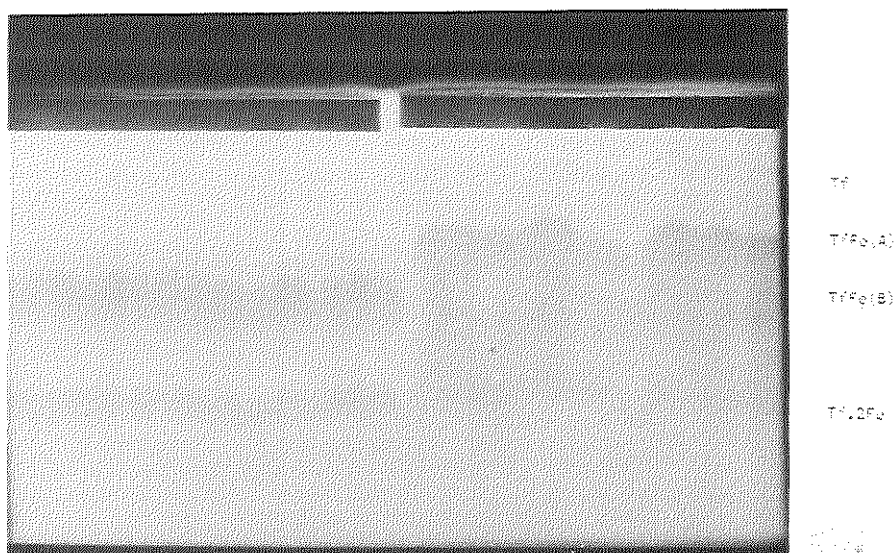


Fig. 3 Preparatieve isoelektrische focussing van een transferrine-preparaat dat specifiek op de B-plaats was opgeladen.
 Links: transferrine-preparaat wel gedialyseerd voor focussing
 Rechts: transferrine-preparaat niet gedialyseerd voor focussing

ren, resulteerde dit in een scherpe TffFe(B) band, (alsmede in de vorming van enig Tf.2Fe). Als het monster niet werd gedialyseerd en de chelatoren niet werden verwijderd, bleek tijdens de focussing het grootste gedeelte van TffFe(B) te worden omgezet in TffFe(A) (figuur 3, rechts). Deze omzetting werd niet gezien indien de focussing op analytische schaal werd uitgevoerd.

Figuur 4 vertoont de resultaten op analytische schaal van de op preparatieve gels verkregen TffFe(A) en TffFe(B) preparaten.

Discussie

Uit de resultaten in figuur 1 blijkt dat "specifiek" opgeladen transferrine-oplossingen nooit alleen zuiver TffFe(A) of TffFe(B) bevatten, maar gecontamineerd zijn met wisselende hoeveelheden apotransferrine, de andere vorm van monoferric transferrine en diferric transferrine. Met de beschreven preparatieve isoelektrische focussing methode blijkt het wel mogelijk om zuiver "monoferric" TffFe(A) en zuiver "monoferric" TffFe(B) van elkaar te scheiden en te isoleren. Onder gunstige omstandigheden bedraagt de opbrengst minstens 20%. Om optimale resultaten te verkrijgen bij preparatieve isoelektrische focussing moet tenminste aan onderstaande voorwaarden worden voldaan:

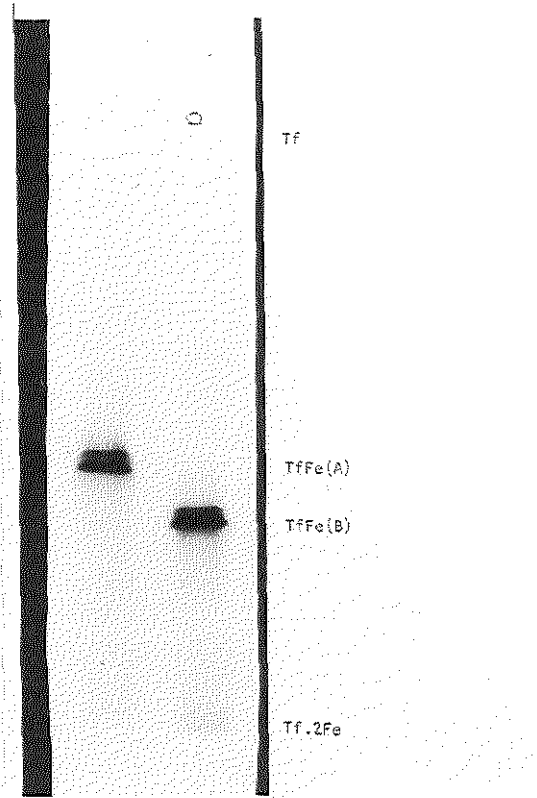


Fig. 4 Analytische isoelektrische focussering van transferrine-preparaten die met behulp van preparatieve isoelektrische focussering waren bereid.
 Links: transferrine Fe(A)
 Rechts: transferrine Fe(B)

- 1) Om zuiver TfFe(B) te verkrijgen is het noodzakelijk dat NTA en citraat door dialyse of gelfiltratie verwijderd worden, voordat de specifiek opgeladen oplossing TfFe(B) aan isoelektrische focussering wordt onderworpen. Indien deze stap achterwege wordt gelaten, blijkt tijdens de focussering een aanzienlijk deel van TfFe(B) in TfFe(A) te worden omgezet.
 Verwijdering van de chelatoren uit een TfFe(A) oplossing resulteert in een scherpere migratie van de TfFe(A) band in de gel.
- 2) De beste en meest reproduceerbare verhouding TfFe(A)/TfFe(B) verkrijgt men indien men apotransferrine oplaadt in een NTA buffer, in aanwezigheid van een overmaat HCO_3^- , als anion in plaats van NTA.
- 3) De concentratie van de transferrine-oplossing, die aan isoelektrische focussering wordt onderworpen, dient tenminste 30 g/l te bedragen om met op de gel te brengen monsters van 1,5-2 ml te kunnen werken en toch een redelijke hoeveelheid TfFe(A) en TfFe(B) te verkrijgen.

Literatuur

1. FLETCHER, J. and HUEHNS, E.R. (1967). Significance of the binding of iron by transferrin. *Nature* 215, 584-586.
2. FLETCHER, J. and HUEHNS, E.R. (1968). Function of transferrin. *Nature* 218, 1211-1214.
3. ZAPOLSKI, E.J. and PRINCIOTTO, J.V. (1977). Preferential utilization in vitro of iron bound to diferric transferrin by rabbit reticulocytes. *Biochem. J.* 166, 175-179.
4. PRINCIOTTO, J.V. and ZAPOLSKI, E.J. (1978). Differences between human and rabbit transferrins. *Biochim. Biophys. Acta* 539, 81-87.
5. HUEBERS, H., HUEBERS, E., CISBA, E. and FINCH, C.A. (1978). Iron uptake from rat plasma transferrin by rat reticulocytes. *J. Clin. Invest.* 62, 944-951.
6. MORGAN, E.H., HUEBERS, H. and FINCH, C.A. (1978). Differences between the binding sites for iron-binding and release in human and rat transferrin. *Blood* 52, no. 6, 1219-1228.
7. HARRIS, D.C. and AISEN, P. (1975). Functional equivalence of the two iron-binding sites of human transferrin. *Nature (London)* 257, 821-823.
8. BROWN, E.B. (1977). Transferrin, physiology and function in iron transport. In: *Iron Metabolism*, Ciba Foundation, Symposium 51, Amsterdam, Elsevier/North-Holland Inc., 125-138.
9. GORDON, A.H. and LOUIS, L.N. (1962). Preparation and properties of rat transferrin. *Biochem. J.* 88, 409-414.
10. OKADA, S., JARVIS, B. and BROWN, E.B. (1979). In vivo evidence for the functional heterogeneity of transferrin-bound iron. V. Isotransferrins: an explanation of the Fletcher-Huehns phenomenon in the rat. *J. Lab. Clin. Med.* 93, 189-198.
11. AISEN, P. and BROWN, E.B. (1975). Structure and function of transferrin. *Prog. Haematol.* 19, 25-56.
12. AISEN, P. and BROWN, E.B. (1977). The iron-binding of transferrin in iron metabolism. *Seminars in Hematology* 14, 31-53.

HOOFDSTUK V

Geen functioneel verschil tussen de twee ijzerbindingsplaatsen van humaan transferrine in vitro

Inleiding

Zoals reeds in hoofdstuk I en IV is vermeld, concludeerden Fletcher en Huehns op grond van resultaten, verkregen bij in vitro experimenten, dat TfFe(A) ijzer vooral aan voorlopers van de erythrocyt zou afgeven, terwijl TfFe(B) ijzer bij voorkeur aan de ijzeropslagplaatsen in het lichaam zou afstaan (1, 2). Door dit functionele verschil tussen beide ijzerbindingsplaatsen zou het serum-ijzer geen homogene pool vormen en zou transferrine naast een transporterende ook een belangrijke regulerende rol in de ijzerstofwisseling vervullen.

Tot op heden zijn de meningen over de juistheid van deze hypothese nog verdeeld door de tegenstrijdige resultaten die bij het toetsen van deze hypothese werden verkregen. Eén van de belangrijkste oorzaken van deze tegenstrijdige resultaten moet worden gezocht in het feit dat het tot voor kort niet mogelijk was de incubatie-experimenten uit te voeren met zuiver monoferric transferrine (zie hoofdstuk III en IV).

Een andere oorzaak voor de verschillende resultaten is mogelijk gelegen in het gebruik van reticulocyten voor deze experimenten. Reticulocyten vormen een inhomogene celpopulatie met betrekking tot hun rijpheid. Aangezien het aantal actieve receptoren afneemt naarmate de reticulocyt ouder wordt, is de mogelijkheid geopperd, dat ook het onderscheidend vermogen van de reticulocyt voor TfFe(A) en TfFe(B) bij rijping zou afnemen.

Zoals reeds in hoofdstuk I werd vermeld, speelt, behalve de localisatie van het ijzerion op de A- dan wel op de B-ijzerbindingsplaats van transferrine, mogelijk ook het feit of het transferrinemolecuul één dan wel twee ijzeratomen gebonden heeft, een rol bij de interactie met de voorlopers van de erythrocyt. Er zijn zowel in vivo als in vitro (10, 11) aanwijzingen gevonden dat voorlopers van erythrocyten procentueel meer ijzer opnemen van een transferrine-oplossing met een hogere ijzerverzadiging dan van een oplossing met evenveel transferrine, echter met een lagere ijzerverzadiging. Anderen (6, 12, 13) hebben deze bevindingen niet kunnen bevestigen. Ook deze tegenstrijdige resultaten worden zeer waarschijnlijk verklaard door de steeds verschillende samenstelling van de transferrine-oplossing, alsmede door de foutieve veronderstelling dat bij het opladen van een transferrine-oplossing met ijzer de verdeling van dit ijzer over de A- en B-plaats van transferrine at random geschiedt, wat blijkens gegevens vermeld in hoofdstuk III niet het geval is. In dit hoofdstuk wordt de Fletcher en Huehns hypothese getoetst met zuiver TfFe(A) en TfFe(B), geïncubeerd met erytroblasten uit het beenmerg. Tevens wordt nagegaan of diferric transferrine pro-

centueel meer ijzer aan de voorlopers van de erythrocyt afgeeft, dan monoferric transferrine.

Materiaal en Methoden

Humaan apotransferrine werd bereid volgens de in hoofdstuk II beschreven methode.

De bereiding van zuiver TfFe(A) en TfFe(B) vond plaats volgens de in hoofdstuk IV beschreven methode. Beide monoferric transferrines bleven stabiel indien zij gedurende meer dan 1 uur bij 37°C werden geïncubeerd in het medium waarin ook de incubaties met cellen plaatsvonden.

De bereiding van *zuiver diferric transferrine* vond ook met behulp van de isoelektrische focusering techniek plaats.

Van de geïncubeerde celsuspensies werden *de ghost en de cytosol* verkregen op de in hoofdstuk II beschreven wijze.

Rattenreticulocyten en beenmergcellen werden verkregen zoals in hoofdstuk II is beschreven.

Humane beenmergcellen werden verkregen van 8 vrijwilligers, 4 vrouwen en 4 mannen in de leeftijd van 17-63 jaar. Beenmerg (15-20 ml in 3 puncties) werd geaspireerd uit de crista spina iliaca posterior en snel overgebracht in 4 ml Hanks' balances salt solution waaraan 100 E heparine/ml was toegevoegd. De humane beenmergaspiraties werden met de May-Grunwald Giemsa kleuring en met een kleuring op ijzer als normaal beoordeeld (het percentage kernhoudende erythroïde cellen varieerde tussen de 26-38%, (het percentage cellen dat niet tot de erythroïde, myeloïde of lymfoïde reeks behoorde, was minder dan 5%).

Incubatie-experimenten werden uitgevoerd op de in hoofdstuk II onder H₂ beschreven wijze; bij de experimenten werd dus geen foetaal kalfsserum aan het incubatiemedium toegevoegd.

Resultaten

Mogelijke invloed van ampholine en de isoelektrische focuserings-techniek op de functie van transferrine

In deze experimenten werd nagegaan of ampholine en de isoelektrische focusering de kwaliteit van het natieve ijzer-transferrine met betrekking tot de ijzerafgifte aan de erythroïde cellen beïnvloeden.

Apotransferrine werd met ⁵⁹Fe specifiek op de A-plaats opgeladen, waarna de oplossing in twee gelijke delen (X en Y) werd gesplitst. Oplossing X, met voornam-

lijk TfFe(A), gecontamineerd met apotransferrine, TfFe(B) en Tf.2Fe, werd direct in een incubatie-experiment gebruikt. Oplossing Y werd aan preparatieve isoelektrische focussing onderworpen en gescheiden in vier fracties (Tf, TfFe(A), TfFe(B) en Tf.2Fe) (hoofdstuk IV). Deze fracties werden uit de gel geëluëerd en weer bij elkaar gevoegd. De op deze wijze verkregen oplossing had weer dezelfde samenstelling als de oorspronkelijke, specifiek opgeladen transferrine-oplossing. Het enige verschil tussen de oplossing X en Y is dat in oplossing Y alle componenten (Tf, TfFe(A), TfFe(B) en Tf.2Fe) blootgesteld zijn geweest aan de invloed van ampholine en isoelektrische focussing. Aangezien de resultaten van figuur 1 tonen dat er geen verschil in ijzeropname door erythroïde beenmergcellen optreedt, of deze erythroïde beenmergcellen nu met oplossing X dan wel met oplossing Y werden geïncubeerd, hebben ampholine en isoelektrische focussing blijkbaar geen schadelijke invloed op de transferrinebinding en ijzeropname door erythroïde cellen.

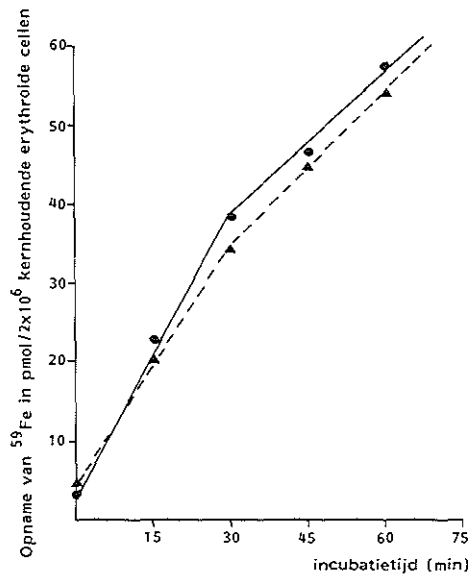


Fig. 1 De opname van ijzer door humane beenmergcellen geïncubeerd met een transferrine-oplossing die specifiek werd opgeladen (oplossing X, ▲-▲-▲-▲-▲) of met een transferrine-oplossing die werd bereid met behulp van preparatieve isoelektrische focussing (oplossing Y, ●-●-●-●-●).

Incubatie van humane beenmergcellen met humaan monoferric TfFe(A) en humaan monoferric TfFe(B)

Figuur 2 toont de resultaten van de incubatie-experimenten met humane beenmergcellen. Deze zijn weergegeven als de gemiddelde ijzeropname per 2×10^6 kernhoudende erythroïde beenmergcellen, die bepaald werd uit de resultaten van 8 experimenten met beenmergcellen van 8 verschillende personen. Het beenmerg van elke proefpersoon werd zowel met TfFe(A) als met TfFe(B) geïncubeerd. Er bestaan geen significante verschillen in de ijzeropname door celsuspensies geïncubeerd met TfFe(A) of wel met TfFe(B). De ghostsuspensie en cytosol van de, hetzij met TfFe(A), hetzij

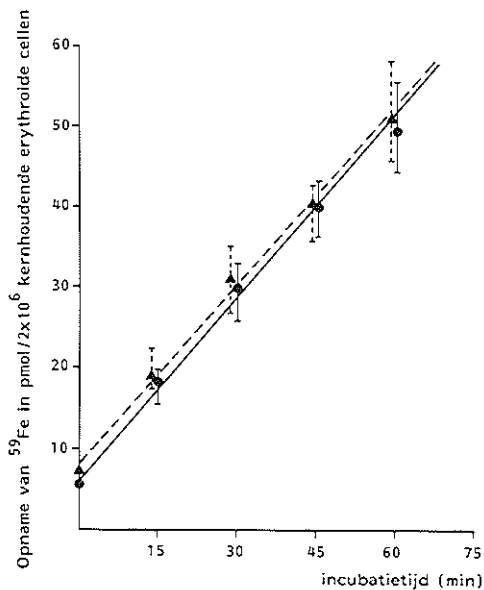


Fig. 2 De opname van ijzer door humane beenmergcellen geïncubeerd met humaan monoferric TfFe(A) ●-●-● en met humaan monoferric TfFe(B) ▲-▲-▲

● ▲ spreiding

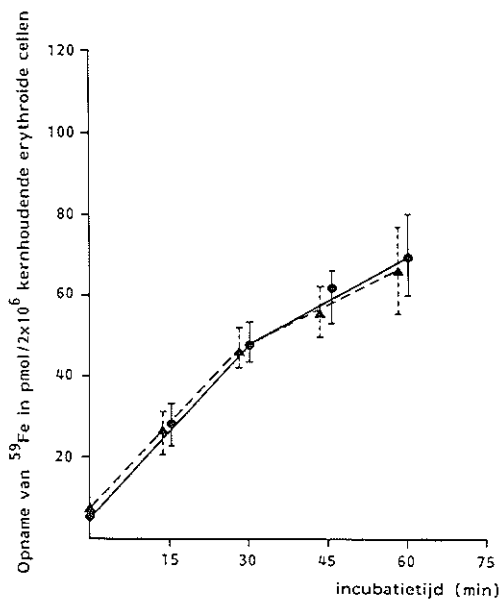


Fig. 3 De opname van ijzer door rattenbeenmergcellen geïncubeerd met humaan monoferric TfFe(A) ●-●-● en met humaan monoferric TfFe(B) ▲-▲-▲

● ▲ spreiding

met TfFe(B) geïncubeerde cellen vertoonden ook geen significante verschillen in ijzeractiviteit.

Isoelektrische focussing van de oplossingen na incubatie liet zien dat uitsluitend de oorspronkelijke monoferric transferrinevorm en het, door de incubatie ontstane apotransferrine, aanwezig waren.

Incubatie van rattenreticulocyten en rattenbeenmergcellen met humaan monoferric TfFe(A) en humaan monoferric TfFe(B)

Aangezien rattenreticulocyten en rattenbeenmergcellen *in vitro* actiever zijn in het opnemen van ijzer uit transferrine dan humane erythroïde cellen (5) werden ook rattenerythoïde cellen met beide humane monoferric transferrines geïncubeerd. De resultaten van deze experimenten zijn weergegeven in figuur 3. Zoals uit de resultaten blijkt, bestaat er ook geen significant functioneel verschil tussen beide ijzerbindingsplaatsen van humaan transferrine wat betreft de afgifte van ijzer aan rattenbeenmergcellen.

Incubatie van humane beenmergcellen met een oplossing die evenveel TfFe(A) als TfFe(B) bevat

Om de mogelijkheid uit te sluiten dat erythroïde voorlopers wel verschil tussen

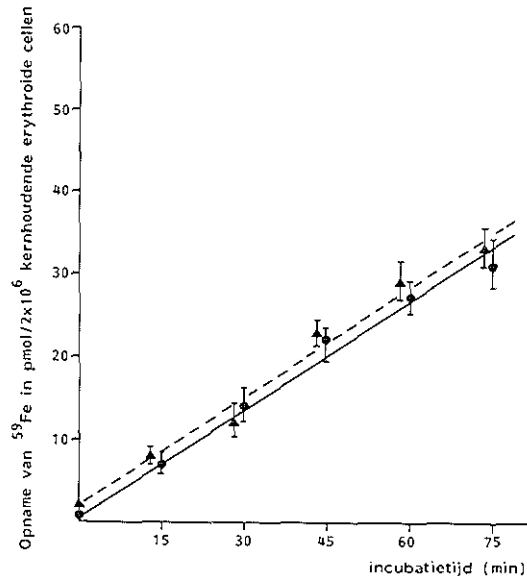


Fig. 4 De opname van ijzer door humane beenmergcellen geïncubeerd met een oplossing met gelijke hoeveelheden humaan TfFe(A) en TfFe(B)
 ●—●—●—● TfFe⁵⁹Fe(A) en TfFe(B)
 ▲—▲—▲—▲ TfFe(A) en Tf⁵⁹Fe(B)
 ● ▲ spreiding

TfFe(A) en TfFe(B) zouden maken als beide tegelijkertijd aanwezig waren, werden celsuspensies geïncubeerd met oplossingen die zowel TfFe(A) als TfFe(B) bevatten (beide in gelijke hoeveelheden).

In oplossing I was TfFe(A) bereid met ^{59}Fe en werd TfFe(B), bereid met ^{56}Fe , toegevoegd; in oplossing II was TfFe(A) met ^{56}Fe en TfFe(B) met ^{59}Fe bereid. Uit de resultaten van figuur 4 blijkt dat ook bij gelijktijdige aanwezigheid van TfFe(A) en TfFe(B) er geen verschil in ijzeropname door erythroïde beenmergcellen bestaat.

De incubatie met beide monoferric transferrinen en diferric transferrine

In figuur 5 en tabel I worden de resultaten weergegeven van een experiment waarbij delen van dezelfde celsuspensie werden geïncubeerd met respectievelijk een gelijke hoeveelheid monoferric transferrine en diferric transferrine. Uit de verkregen resultaten (figuur 5 en tabel I) blijkt dat de procentuele ijzeropnames voor monoferric transferrine en diferric transferrine bij een incubatietijd variërend van 5 tot 120 minuten gelijk zijn; op elk tijdstip heeft de celsuspensie welke met diferric transferrine was geïncubeerd tweemaal zoveel ijzer opgenomen als de celsuspensie welke met monoferric transferrine was geïncubeerd.

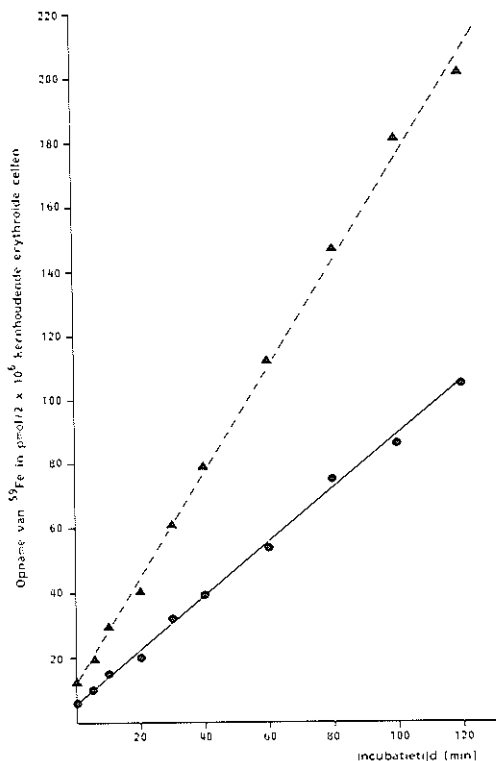


Fig. 5 De opname van ijzer door humane beenmergcellen geïncubeerd met monoferric TfFe(A) ●—●—● en diferric Tf.2Fe ▲—▲—▲

Tabel I. — De ^{59}Fe opname in picomolen/ 2×10^6 kernhoudende erytroïde beenmergcellen en in procenten van oorspronkelijke transferrine-oplossingen

Incubatie- tijd in min.	Opname van monoferric TfFe(A)		Opname van monoferric TfFe(B)		Opname van diferric transferrine	
	in picomol	in %	in picomol	in %	in picomol	in %
5	10	3,5	12	4,1	21	3,6
10	15	5,2	18	6,2	34	5,9
20	21	7,3	23	8	45	8
30	30	10,4	30	10,4	62	10,7
40	39	13,2	42	14,6	79	13,6
60	54	18,8	53	18,4	110	19
80	76	26,4	77	27	148	25,5
100	87	30,2	85	29,5	180	32
120	104	36	100	35,2	202	35

Discussie

Eén van de grootste problemen bij het toetsen van de Fletcher en Huehns hypothese is dat het tot voor kort niet mogelijk was om de ijzeropname door voorlopers van de erythrocyt na te gaan met zuiver TfFe(A) en zuiver TfFe(B) (3, 4). Hoewel er verschillende methoden beschreven zijn om een transferrine-oplossing specifiek op één van beide bindingsplaatsen op te laden, resulteerde dit nooit in een zuiver monoferric transferrine. In het gunstigste geval verkreeg men een met één van de beide monoferric transferrine specifiek verrijkte oplossing, die echter altijd gecontamineerd was met wisselende hoeveelheden apotransferrine, met de andere monoferric transferrine en met diferric transferrine (hoofdstuk III en IV van dit proefschrift). Door deze contaminaties zouden kleine functionele verschillen tussen beide ijzerbindingsplaatsen onvoldoende tot uiting kunnen komen.

De resultaten van de in dit hoofdstuk beschreven experimenten, uitgevoerd met zuiver monoferric TfFe(A) en TfFe(B) en met beenmergcellen in plaats van met reticulocyten, om een eventueel afgenomen onderscheidend vermogen voor TfFe(A) en TfFe(B) in de rijpere reticulocyt te vermijden, tonen aan dat er geen functioneel verschil bestaat tussen beide ijzerbindingsplaatsen met betrekking tot de ijzerafgifte aan erytroïde cellen *in vitro*. Harris en Aisen toonden in hun experimenten een functioneel verschil aan tussen beide ijzerbindingsplaatsen indien het humane transferrine in een heteroloog systeem met konijnenreticulocyten werd geïncubeerd; er bestond geen verschil indien het humane transferrine in het homologe systeem met humane reticulocyten werd geïncubeerd (14).

Aangezien erytroïde cellen van rat en konijn *in vitro* actiever zijn in het verwijderen van aan transferrine gebonden ijzer dan humane erytroïde cellen, zou het mogelijk zijn dat een functioneel verschil tussen de beide ijzerbindingsplaatsen op humaan transferrine niet tot uiting komt omdat humane erytroïde cellen *in vitro* onvoldoende actief zijn in het verwijderen van ijzer gebonden aan transferrine (5). Met het oog op deze mogelijkheid werden experimenten uitgevoerd waarin rattenerytroïde cellen werden geïncubeerd met zuiver humaan monoferric TfFe(A) en TfFe(B). Ook in dit heterogeen, doch meer actieve systeem werd geen functioneel

verschil tussen beide ijzerbindingsplaatsen van humaan transferrine aangetoond.

Ook indien meer fysiologische omstandigheden worden benaderd, namelijk het gelijktijdig aanwezig zijn van TfFe(A) en TfFe(B) in één incubatiemedium, konden geen verschillen tussen TfFe(A) en TfFe(B) worden aangetoond met betrekking tot de ijzerafgifte aan erythroïde voorlopercellen.

Tenslotte bleken er in vitro geen aanwijzingen voor een toegenomen affiniteit van reticulocyten voor diferric transferrine ten opzichte van monoferric transferrine.

Concluderend kan gesteld worden dat onder omstandigheden welke een voorwaarde vormen voor het toetsen van de Fletcher-Huehns hypothese, namelijk incubatie met zuiver monoferric TfFe(A) en TfFe(B), er in vitro geen steun voor deze hypothese wordt verkregen. Wel dient opgemerkt te worden dat wij bij een recent onderzoek naar het voorkomen van de verschillende transferrinevormen in normaal serum met behulp van de beschreven isoelektrische focusering techniek vastgesteld hebben dat in normaal serum TfFe(B) in hogere concentratie voorkomt dan TfFe(A). Deze bevinding is recent ook door Aisen beschreven (15) en wordt mogelijk verklaard door een verschil in bindingsaffiniteit tussen de A- en de B-plaats van transferrine voor ijzer afkomstig uit het voedsel, uit het RES, of uit de lichaamsvoorraden (16).

Literatuur

1. FLETCHER, J. and HUEHNS, E.R. (1967). Significance of the binding of iron by transferrin. *Nature (London)* 215, 584-586.
2. FLETCHER, J. and HUEHNS, E.R. (1968). Function of transferrin. *Nature (London)* 218, 1211-1214.
3. AISEN, P. and BROWN, E.B. (1975). Structure and function of transferrin. *Progress in Hematology* 9, 25-56.
4. AISEN, P. and BROWN, E.B. (1977). The iron-binding function of transferrin in iron metabolism. *Seminars in Hematology* 14, 31-53.
5. BROWN, E.B. (1977). Transferrin: physiology and function in iron transport. *Iron Metabolism, Ciba Foundation Symposium* 151, 125-138, Elsevier/North-Holland Inc., Amsterdam.
6. HUEBERS, H., HUEBERS, E., CISHA, E. and FINCH, C.A. (1978). Iron uptake from rat; plasma: transferrin by rat reticulocyte. *J. Clin. Invest.* 62, 944-951.
7. MORGAN, E.H., HUEBERS, H. and FINCH, C.A. (1978). Differences between the binding sites for iron-binding and release in human and rat transferrin. *Blood* 52, 1219-1228.
8. LEIBMAN, A. and AISEN, P. (1979). Distribution of iron between the binding sites of transferrin in serum. *Blood* 53, 1058-1065.
9. VAN BAARLEN, J., BROUWER, J.T., LEIBMAN, A. and AISEN, P. (1980). Evidence of the functional heterogeneity of the two sites of transferrin in vitro. *Brit. J. Haematol.* 46, 417-426.
10. HAHN, D., BAVIERA, B. and GANZONI, A.M. (1975). Functional heterogeneity of the transport iron compartment. *Acta Haematol. (Basel)* 53, 285-291.
11. FLETCHER, J. (1971). The plasma clearance and liver uptake of iron from transferrin of low and high iron saturation. *Clin. Sci.* 41, 395-402.
12. LANE, R.S. and FINCH, C.A. (1970). The in vivo plasma clearance of iron from transferrins of low and high iron saturation. *Clin. Sci.* 38, 783-793.
13. CHRISTENSEN, A.C., HUEBERS, H. and FINCH, C.A. (1978). Effect of transferrin saturation on iron delivery in rats. *Am. J. Phys.* 235, 18-22.
14. HARRIS, D.C. and AISEN, P. (1975). Functional equivalence of the two iron-binding sites of human transferrin. *Nature (London)* 257, 821-823.

15. LEIBMAN, A. and AISEN, P. (1979). Distribution of iron between the binding sites of transferrin in serum. *Blood* 53, 1058-1065.
16. ZAPOLSKI, E.J. and PRINCOTTO, J.V. (1980). Transferrin acquisition of catabolized erythrocyte iron in the rat. *Life Sciences* 27, 739-745.

HOOFDSTUK VI

De localisatie van de transferrine-receptor op de membraan van rattenreticulocyten

Inleiding

In hoofdstuk I is reeds uitvoerig ingegaan op het feit dat voor de opname van ijzer door de reticulocyt een binding tussen het ijzertransporterend eiwit transferrine en de reticulocytenmembraan dient plaats te vinden. Ook de factoren, die bij deze reactie een rol spelen, zijn in hoofdstuk I (tabel II en III) vermeld. In deze inleiding wordt dan ook volstaan met een korte samenvatting van een aantal essentiële gegevens, die een rol spelen bij het ijzeropname-proces door de reticulocyt.

De initiële stap in dit proces is de binding van transferrine aan een receptor op de celmembraan (1). De meeste receptoren voor transferrine, uitgedrukt per oppervlakte-eenheid, zijn aanwezig op de proerytoblast. Het aantal receptoren neemt bij celrijping af en de erytrocyt lijkt in het geheel niet meer over actieve transferrine-receptoren te beschikken, daar deze cel niet in staat is transferrine specifiek te binden (1, 2, 3). Aangezien de samenstelling en de localisatie van de transferrine-receptor ten opzichte van andere beschreven membraaneiwitten niet goed bekend is, is het nog onduidelijk of deze receptor tijdens de rijping van de cel geheel van de membraan verdwijnt of dat er alleen een verandering in de structuur optreedt, zodanig dat de receptor inactief wordt.

In de literatuur zijn verschillende transferrine-membraancomplexen beschreven, welke sterk verschillen in relatieve molecuulmassa's (tabel III, hoofdstuk I), hetgeen mogelijk ten dele aan de verschillende herkomst van de reticulocyten kan worden toegeschreven (4, 5). Bovendien dient vermeld te worden dat van geen van de geïsoleerde membraancomplexen de functie van transferrine-receptor is aangetoond.

In de ijzeropname door de cel speelt de transferrine-receptor een dermate belangrijke rol dat voor een goed inzicht in dit proces de localisatie, isolatie en nadere karakterisering van de transferrine-receptor een voorwaarde lijkt.

In dit hoofdstuk wordt de isolatie van een transferrine-membraancomplex van de rattenreticulocyten beschreven, waarbij gebruik wordt gemaakt van een door Speyer en Fielding, voor humane reticulocyten beschreven methode, die op bepaalde punten werd gewijzigd (6).

Materiaal en Methoden

- a) Erythrocyten, reticulocyten en beenmergcellen worden verkregen uit mannelijke Wistar ratten op de in hoofdstuk II beschreven wijze.

- b) Rattentransferrine en anti-rattentransferrine werden bereid op de in hoofdstuk II beschreven methode.
- c) *De bereiding van antilichamen tegen rattenserumeiwitten, waaruit voor de immunisatie transferrine en gammaglobulinen waren verwijderd.* Konijnen werden geïmmuniseerd met rattenserum, waaruit transferrine en gammaglobulinen waren verwijderd met behulp van affiniteitschromatografie. De immunoglobulinefractie uit het antiserum werd geïsoleerd met behulp van gelfiltratie over Sephadex G-150 en ionen uitwisselingschromatografie over DEAE-Sephadex A-50.
- d) *De bereiding van antilichamen tegen een geïsoleerde ghostsuspensie van rattenreticulocyten en tegen een ghostsuspensie van rattenbeenmergcellen.* Konijnen werden geïmmuniseerd met een geïsoleerde ghostsuspensie van rattenreticulocyten en van rattenbeenmergcellen. Uit de verkregen antisera werden weer de immunoglobulinefracties geïsoleerd (zie c).
- e) *De incubatie van rattenbeenmergcellen en -reticulocyten met transferrine.* Deze incubatie vond plaats op de in hoofdstuk II beschreven wijze.
- f) *De immunofluorescentie studies*
 Beenmergcellen van normale Wistar ratten- en beenmergcellen en reticulocyten van anemische Wistar ratten werden geïncubeerd met transferrine. Later werden voor deze experimenten ook beenmergcellen en reticulocyten gebruikt, welke niet vooraf met transferrine geïncubeerd werden. Nadat de celsuspensies een aantal malen gewassen waren in 300 miliosolair PBS, pH 7,4, werden deze cellen in afzonderlijke experimenten gedurende 30 minuten bij 0°C geïncubeerd met respectievelijk antilichamen tegen rattentransferrine, met antilichamen tegen de totale celmembraan en met antilichamen tegen rattenserumeiwitten, waaruit voor immunisatie transferrine en gammaglobuline waren verwijderd (zie c). Na deze incubatie werden de cellen zesmaal gewassen met 300 miliosmolair PBS van pH 7,4.
 Tenslotte werden de cellen geïncubeerd met uit geitenserum geïsoleerde immunoglobulinen gericht tegen konijnen-IgG, waaraan na isolatie fluoresceïne isothiocyanaat werd gekoppeld (GAR-FITC, Nordic). Na het wassen van de cellen werd het aantal fluorescerende cellen bepaald met behulp van een fluorescentie-microscop.
- g) *De bereiding van een ghostsuspensie van reticulocyten, met radioactief transferrine geïncubeerd* vond plaats volgens een methode van Dodge et al., die werd beschreven in hoofdstuk II.
- h) *Chromatografie van de opgeloste ghosts.*
 De verkregen ghostsuspensie werd gesuspenseerd in 4-8 ml van een 5 miliosmolare natriumfosfaatbuffer van pH 7,4 en opgelost door het toevoegen van een 5%-ige Triton X-100 oplossing in 25 miliosmolare natriumfosfaatbuffer,

zodat de uiteindelijke Triton X-100 concentratie in de oplossing 1% bedroeg. De oplossing werd gedurende 15 minuten tot 37°C verwarmd. De opgeloste ghostsuspensie werd afgekoeld tot 4°C en gechromatografeerd in opwaartse richting over een Sepharose-2B kolom (30 cm x 1,4 cm), die geëquilibreerd was met een 5 miliosmolaire natriumfosfaatbuffer van pH 7,4, bevattende 1% (v/v) Triton X-100. Dezelfde buffer werd ook als elutiebuffer gebruikt. Fracties van 2,5 ml werden verzameld bij een elutiesnelheid van 5 ml/uur. Een aantal van de fracties van de Sepharose-2B kolom werden samengevoegd en met behulp van vacuüm ultrafiltratie geconcentreerd.

De geconcentreerde fracties werden in opwaartse richting gechromatografeerd over een Sepharose-6B kolom (1 m x 1,4 cm), welke geëquilibreerd was met een 5 miliosmolaire natriumfosfaatbuffer van pH 7,4, bevattende 1% (v/v) Triton X-100, hetgeen eveneens de elutiebuffer was. De elutiesnelheid bedroeg 6 ml/uur waarbij fracties van 3 ml werden verzameld.

Van alle Sepharose-2B en Sepharose 6B fracties werden de E_{254} en het aantal ^{59}Fe en ^{125}I counts/minuut (cpm) bepaald.

i) *Incubatie van transferrine met erythrocyten, met "unsealed" reticulocyten ghosts, "resealed" reticulocyten ghosts en met opgeloste ghosts.*

1. De incubatie van radioactief transferrine en erythrocyten vond op dezelfde wijze plaats als beschreven voor de reticulocyten. Na de incubatie werd een ghostsuspensie bereid van de erythrocyten en werd de opgeloste ghostsuspensie vervolgens gechromatografeerd over Sepharose-2B en Sepharose-6B (zie h).
2. Van een reticulocytensuspensie, welke niet met transferrine was geïncubeerd, werd een ghostsuspensie bereid in een 5 miliosmolaire fosfaatbuffer, pH 8,0. Van een ander deel van dezelfde celsuspensie werden "resealed ghosts" gemaakt door de hemolyse uit te voeren in een 5 miliosmolaire fosfaatbuffer, waaraan 1 milimol MgSO_4 was toegevoegd. Bovendien werd, in plaats van 38 ml, 98 ml van de hemolyserende vloeistof aan 2 ml celsuspensie toegevoegd. De verkregen normale en resealed ghostsuspensie werden 1:1 verdund met Hanks' (300 mOsm) waaraan 1% (v/v) kalfs-serum was toegevoegd en vervolgens geïncubeerd met ^{125}I -transferrine- ^{59}Fe (concentratie, 1 nmol/ml). Na incubatie werden de ghostsuspensies viermaal gewassen met 20 miliosmolair PBS van pH 7,55 en vervolgens opgelost en gechromatografeerd op de voor een normale ghostsuspensie beschreven wijze.
3. Van niet geïncubeerde reticulocyten werd een ghostsuspensie bereid volgens de in hoofdstuk II beschreven methode. Deze ghosts werden opgelost in Triton X-100 en vervolgens geïncubeerd met ^{125}I -transferrine- ^{59}Fe , waarbij de uiteindelijke transferrineconcentratie in het incubatiemedium $2 \cdot 10^{-2}$ nmol/l bedroeg.

De incubatie werd gestopt door afkoeling tot 0°C waarna de gehele oplossing over Sepharose-2B en Sepharose-6B gechromatografeerd werd.

j. *De verwijdering van Triton X-100 uit de B₂-component.*

Voor de verwijdering van Triton X-100 uit de B₂-component werd gebruik gemaakt van een door Holloway beschreven methode (7). De B₂-component werd hierbij geëluëerd over een BioBeads SM-2 kolom (1,5 x 30 cm) welke geëquilibreerd was met een 0,01 molair Tris – 0,001 molair EDTA buffer pH 8,0, welke 0,1% natriumdodecylsulfaat bevatte (SDS).

Resultaten

Immunofluorescentiestudies (zie tabel I)

Rattenbeenmergcellen die geïncubeerd waren met transferrine, en daarna onderworpen waren aan een indirecte immunofluorescentietechniek, toonden een duidelijke aan de membraan gelocaliseerde fluorescentie. Na een aantal experimenten werden de beenmergcellen niet meer geïncubeerd met transferrine, doch na isolatie en wassen direct behandeld met een indirecte immunofluorescentietechniek. In beide experimenten vertoonden circa 34% van de cellen een aan de membraan gelocaliseerde fluorescentie. In de differentiatie van het normale rattenbeenmerg waren circa 36-39% kernhoudende erytroïde cellen aanwezig, waarvan het merendeel fluoresceerde, zoals uit een dubbelkleuring bleek. Tevens bleek dat reeds in het pro-erytroblasten-stadium membraan gelocaliseerde fluorescentie aanwezig was. Na het induceren van een anemie in de rat, via bloedafname door orbitapuncties, steeg het percentage cellen met een duidelijke membraanfluorescentie tot 50%, terwijl het percentage erytroïde cellen in de differentiatie toenam tot 53% (zie tabel I).

Zoals te verwachten, vertoonden alle cellen een membraanfluorescentie, indien zij in plaats van met antitransferrine met anti-totaal beenmerg immunoglobulinen werden geïncubeerd. Indien geen antitransferrine of anti-totaal beenmerg aan de celsuspensie werd toegevoegd, vertoonden de cellen zo goed als geen membraanfluorescentie (tabel I).

Concluderend kan gesteld worden dat, indien een suspensie van beenmergcellen werd onderworpen aan een indirecte immunofluorescentietechniek met antitransferrine er een goede correlatie bestaat tussen het aantal erytroïde cellen in het beenmerg en het aantal fluorescerende cellen. Bovendien tonen deze experimenten aan dat, in vivo, reeds vanaf de vroegst herkenbare erytroïde beenmergcel, transferrine aan de buitenzijde van de reticulocyten membraan gebonden wordt. Indien een reticulocytensuspensie aan de beschreven immunofluorescentietechniek werd onderworpen, kwam het percentage cellen, dat een aan de membraan gelocaliseerde fluorescentie vertoonde, bijna overeen met het percentage reticulocyten in de celsuspensie.

Gelfiltratie-experimenten

Gelfiltratie van opgeloste reticulocyten ghosts over Sepharose-2B resulteerde in twee gescheiden radioactieve ghostcomponenten, welke als A en B aangeduid zullen worden. Component A elueerde in het void volume van de kolom en bevatte naast eiwit uitsluitend radioactief ijzer. Component B bevatte alle ¹²⁵I-activiteit en de

TABEL I. — Fluorescentie van erytroïde cellen

	Experiment	Substanties toegevoegd aan beenmergcellen:				Waarnemingen		
		Anti-ratten-transferrine immuno-globuline	Anti-beenmerg-ghostsuspensie immuno-globuline	Anti-ratten-* serum immuno-globuline	HANKS' opl.	GAR-FITC [⊙]	Percentage erytroïde cellen	Percentage fluorescerende cellen
Beenmergcellen van normale rat	a	+	—	—	—	+	36	34
	b	—	+	—	—	+	39	100
	c	—	—	—	+	+	38	2
	d	—	—	+	—	+	36	1
	e	—	—	—	—	+	37	1
Beenmerg van anemische rat (door orbitapunctie)	a	+	—	—	—	+	53	50
	b	—	+	—	—	+	51	99
	c	—	—	—	+	+	49	3
	d	—	—	+	—	+	50	1
	e	—	—	—	—	+	51	1

* Antilichamen tegen rattenserum waaruit transferrine en gammaglobulinen verwijderd waren.

⊙ Geit anti-konijn — Fluoresceïse isothiocyanaat

+ is toegevoegd, — is afwezig

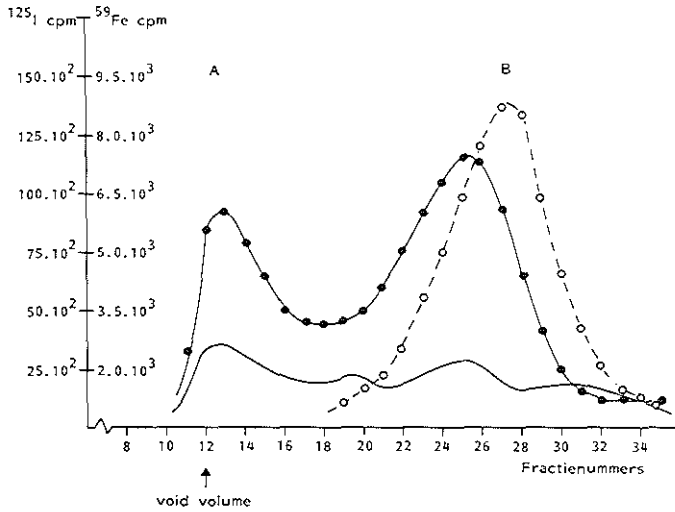


Fig. 1 Chromatografie van de opgeloste reticulocyten ghost op Sepharose-2B ●—●—● ^{59}Fe ○—○—○ ^{125}I ————— E_{254} nm.

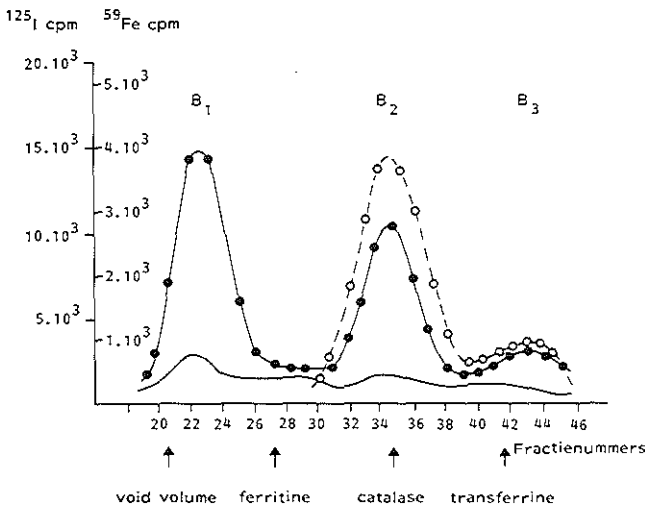


Fig. 2 Herchromatografie van de B-component van de Sepharose-2B kolom (fracties 21 t/m 33 uit fig. 1) op een Sepharose-6B kolom.

●—●—● ^{59}Fe ○—○—○ ^{125}I ————— E_{254} nm.

overige ^{59}Fe -activiteit. De ^{125}I - en de ^{59}Fe -activiteit in deze B-component overlappen elkaar niet volledig (fig. 1). Indien de B-component van de Sepharose-2B kolom werd gechromatografeerd over Sepharose-6B ontstonden drie radioactieve componenten, B₁, B₂ en B₃ (fig. 2).

Component B₁ bevat uitsluitend ^{59}Fe -activiteit, deze component elueert in het

void volume van de Sepharose-6B kolom en heeft een $M_r > 45.10^4$.

Het elutievolume van B_2 komt overeen met dat van de "marker" catalase, waarvan de $M_r \sim 23.10^4$ bedraagt. Aangezien deze B_2 -component praktisch alle ^{125}I -activiteit (= transferrine) bevat, zou de B_2 -component het transferrine-membraan-receptorcomplex kunnen bevatten. Experimenten met de analytische ultracentrifuge met de van Triton X-100 gezuiverde B_2 -component leverden een aantal fracties op met verschillende Svedberg-constanten, hetgeen impliceert dat B_2 nog heterogeen van samenstelling is.

Component B_3 (fig. 2) elueert in het bed volume van de kolom; de hoeveelheid ^{59}Fe - en ^{125}I -activiteit van deze component bedraagt minder dan 5% van de ^{59}Fe - en ^{125}I -activiteit van de B_1 - en B_2 -componenten.

Component B_3 representeert ten dele een andere, waarschijnlijk niet specifiek, transferrine bindende membraancomponent, aangezien een incubatie van deze component met antilichamen tegen de reticulocytenghosts resulteert in een ^{125}I en ^{59}Fe gemerkt precipitaat (hoeveelheid ^{125}I - en ^{59}Fe -activiteit in dit precipitaat circa 20% van totale ^{125}I - en ^{59}Fe -activiteit van de B_3 -component).

Na incubatie van component B_3 met het antilichaam tegen de reticulocytenghosts bevat het supernatant nog 80% van de in de oorspronkelijke component B_3 aanwezige ^{125}I - en ^{59}Fe -activiteit; deze activiteit wordt dus niet geprecipiteerd met antilichamen tegen de reticulocytenmembraan, maar wel met een antilichaam tegen transferrine en representeert vrij ^{125}I -transferrine- ^{59}Fe .

De verkregen resultaten worden in tabel II samengevat.

Tabel II. — Componenten van een reticulocyten ghostsuspensie na fractionering over Sepharose-2B en Sepharose-6B

A-component:	hoge relatieve molecuulmassa bevat uitsluitend ^{59}Fe -activiteit
B_1 -component:	relatieve molecuulmassa groter dan 450.10^3 bevat uitsluitend ^{59}Fe -activiteit
B_2 -component	relatieve molecuulmassa 200.10^3 - 300.10^3 bevat een deel van ^{59}Fe -activiteit en bijna alle ^{125}I -activiteit Receptor-transferrine-complex
B_3 -component:	deel vrij transferrine, een ander deel gebonden aan membraanfractie (waarschijnlijk aspecifiek)

De invloed van de incubatietijd op de "componenten" A, B_1 , B_2 .

De incubatie van transferrine met reticulocyten werd na respectievelijk 5, 10, 15, 20, 30, 40 en 60 minuten beëindigd. Van de desbetreffende celsuspensie werd een ghostsuspensie bereid, welke werd opgelost, waarna gelfiltratie over Sepharose-2B en Sepharose-6B plaats vond. Het bleek dat de ^{59}Fe -activiteit in piek A lineair toenam in de tijd (maximale incubatietijd 60 minuten).

De ^{59}Fe -activiteit van de B_1 -component bereikte na circa 30-40 minuten een maximum, waarna de ^{59}Fe -activiteit in deze component constant bleef.

De ^{59}Fe - en ^{125}I -activiteit van de B₂-component bereikten na circa 20 minuten een maximum; waarna de ^{59}Fe - en ^{125}I -activiteit in deze component voor de duur van het experiment constant bleven.

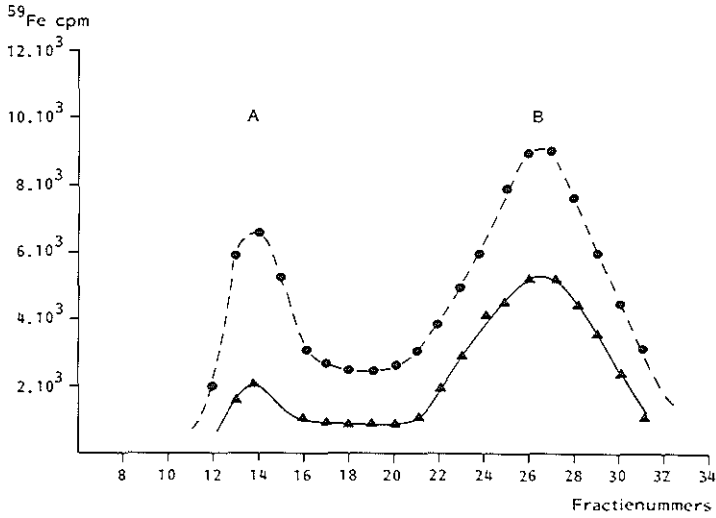


Fig. 3 Chromatografie van de opgeloste reticulocyten ghost op Sepharose-2B

- reticulocyten bij 37°C geïncubeerd.
- ▲-▲-▲ reticulocyten bij 20°C geïncubeerd.

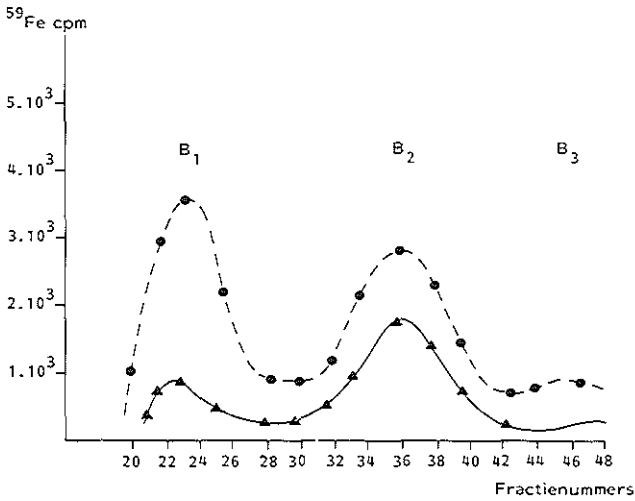


Fig. 4 Herchromatografie van de B-component van de sepharose-2B kolom op een Sepharose-6B kolom.

- reticulocyten bij 37°C geïncubeerd.
- ▲-▲-▲ reticulocyten bij 20°C geïncubeerd.

De invloed van de incubatietemperatuur op de ^{59}Fe - en ^{125}I -activiteit van de componenten A, B₁, B₂ en B₃.

Een reticulocytensuspensie werd met transferrine geïncubeerd bij 21°C en 37°C. Van iedere celsuspensie werd weer een ghostsuspensie bereid, die na oplossen,

Tabel III. — De invloed van de incubatietemperatuur op de ^{59}Fe en ^{125}I -verdeling in de via gelfiltratie verkregen fracties

	Incubatietemperatuur*		Tendens [●] 20°C t.o.v. 37°C
	20°C	37°C	
Percentage ^{59}Fe in component A	5%	12%	↓
$^{59}\text{Fe}/^{125}\text{I}$ -verhouding van de B-component van de Sepharosc-2B kolom	2,1	3,9	↓
Verhouding tussen ^{59}Fe -activiteit van de A- en B-component	0,3	0,6	↓
$^{59}\text{Fe}/^{125}\text{I}$ -verhouding van de B ₂ -component van de Sepharose-6B kolom	1,9	2,5	↓
Verhouding tussen ^{59}Fe -activiteit van de B ₁ en B ₂ -component	0,2	0,9	↓

* Resultaten van één experiment

● Patroon van de veranderingen in acht experimenten

Tabel IV. — De invloed van de incubatietemperatuur op de ^{59}Fe en ^{125}I -verdeling in de via gelfiltratie verkregen fracties

	20°C/37°C*	Tendens [●] 20°C t.o.v. 37°C
Verhouding tussen ^{59}Fe -activiteit van B ₁ -componenten afkomstig van de 20°C en 37°C ghostsuspensie	0,20	↓
Verhouding tussen ^{59}Fe -activiteit van B ₂ -componenten afkomstig van de 20°C en 37°C ghostsuspensie	0,60	↓
Verhouding tussen ^{125}I -activiteit van B-componenten afkomstig van de 20°C en 37°C ghostsuspensie	0,77	↓
Verhouding tussen ^{125}I -activiteit van B ₂ -componenten afkomstig van de 20°C en 37°C ghostsuspensie	0,74	↓

* Resultaat van één experiment

● Patroon van de veranderingen in acht experimenten

werd gefiltreerd over Sepharose-2B en Sepharose-6B.

De resultaten van dit experiment zijn weergegeven in figuren 3 en 4, en in de tabellen III en IV. In de eerste plaats blijkt uit tabel IV dat bij 20°C de hoeveelheid aan de cel gebonden transferrine lager is dan de hoeveelheid bij 37°C (¹²⁵I-verhouding). Uit tabellen III en IV, alsmede uit de figuren 3 en 4 blijkt verder dat de ijzeractiviteit in de componenten A en B₁ bij 20°C veel lager is, dan op grond van de verminderde hoeveelheid gebonden transferrine te verwachten was.

Ook in component B₂ is de ⁵⁹Fe-activiteit iets lager dan op grond van de verminderde hoeveelheid gebonden transferrine te verwachten was; wel is duidelijk dat de temperatuursinvloed groter is op veranderingen in de ⁵⁹Fe-activiteit van de componenten A en B₁ dan op de veranderingen in de ⁵⁹Fe-activiteit van component B₂. Het lijkt gerechtigd op grond van deze resultaten te concluderen dat de invloed van de incubatietemperatuur groter is op de ijzerafgifte door transferrine aan de cel dan op de transferrinebinding aan de cel.

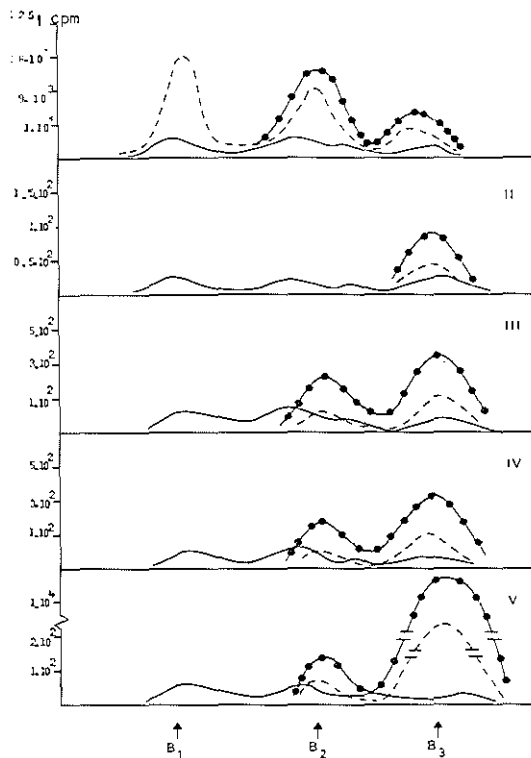


Fig. 5 Chromatografie van op verschillende wijzen verkregen met ¹²⁵I en ⁵⁹Fe gemerkte ghost-suspensie over Sepharose-6B.

I – reticulocyten; II – erythrocyten; III – unsealed ghosts; IV – resealed ghosts; V – opgeloste ghosts.

●—●—● ¹²⁵I; - - - ⁵⁹Fe; ————— E₂₅₄ nm.

De incubatie van een suspensie van "unsealed ghosts", "resealed ghosts", opgeloste ghosts en erythrocyten.

In figuur 5 worden de resultaten weergegeven van de incubatie van verschillende ghostsuspensies en een erythrocyten suspensie met ^{125}I , ^{59}Fe gemerkt transferrine. Hieruit blijkt dat erythrocyten niet in staat zijn om transferrine aan de B_2 -component te binden, of mogelijk geen B_2 -componenten bezitten.

Met een normale ghostsuspensie, een "resealed ghostsuspensie" en opgeloste ghosts werd echter wel enige specifieke binding aan de B_2 -component verkregen. De effectiviteit ten opzichte van intacte reticulocyten is echter duidelijk afgenomen tot circa 20-30% en bovendien wordt er geen ^{59}Fe -activiteit waargenomen in de componenten A en B_1 . Er bestaat geen significant verschil met betrekking tot de ^{59}Fe - en ^{125}I -activiteit in de B_2 -component van de "unsealed", "resealed" en opgeloste ghosts.

Discussie

Ondanks het feit dat er veel gegevens bekend zijn over het ijzeropnameproces door voorlopers van de erythrocyt blijven er nog veel vragen over de precieze wijze waarop dit proces plaatsvindt. Met name bij het onderzoek naar de localisatie en de samenstelling van de membraanreceptor voor transferrine zijn sterk wisselende resultaten verkregen, welke ten dele zijn toegeschreven aan soort-verschillen tussen de reticulocyten.

De immunofluorescentiestudies in dit hoofdstuk maken het waarschijnlijk dat in vivo reeds in het proerythroblastenstadium transferrine aan de membraan wordt gebonden.

Uit de gelfiltratie-experimenten kan geconcludeerd worden dat bij het ijzertransport naar het intracellulaire compartiment van de reticulocyt verschillende componenten betrokken zijn. Het feit dat aan één van deze componenten, B_2 , bijna alle op de cel aanwezige transferrine is gebonden, maakt het waarschijnlijk dat deze component de membraanreceptor voor transferrine bevat.

Centrifugatiestudies in de analytische ultracentrifuge toonden aan dat component B_2 nog heterogeen van samenstelling is; bovendien binden zich aan component B_2 een onbekend aantal moleculen Triton X-100 waardoor de relatieve molecuulmassa niet met zekerheid is vast te stellen.

Een opvallend verschijnsel is verder dat de $^{59}\text{Fe}/^{125}\text{I}$ -verhouding van de B_2 -component groter is dan de $^{59}\text{Fe}/^{125}\text{I}$ -verhouding van het oorspronkelijk gebruikte transferrine. Dit kan erop wijzen dat het receptoreiwit in staat is om ijzer dat van transferrine verwijderd wordt, te binden, terwijl het ontstane apotransferrine de receptor weer verlaat; echter ook een ander samenstellend deel van de heterogene B_2 -component zou deze functie kunnen vervullen.

Een onderdeel van de B_2 -component zou dan ook als membraan-intermediair in het ijzertransport kunnen fungeren. Anderen hebben de toegenomen $^{59}\text{Fe}/^{125}\text{I}$ -ratio van B_2 ten opzichte van de $^{59}\text{Fe}/^{125}\text{I}$ -ratio van het oorspronkelijke transferrine verklaard door een selectieve binding aan de receptor aan te nemen, van die trans-

ferrinemoleculen die het minst gemerkt zijn met ^{125}I (8). De experimenten bij verschillende incubatietemperaturen maken deze laatste verklaring echter niet waarschijnlijk.

De functie van de alleen met ^{59}Fe gemerkte component B_1 is nog onbekend; gezien het beloop in de tijd van de ^{59}Fe -activiteit van de B_1 -component, waarbij de hoogste activiteit na B_2 wordt bereikt, zou deze B_1 -component als intermediair kunnen fungeren tussen B_2 en het intracellulaire compartiment.

Component A gedraagt zich kinetisch gezien als eindproduct, waarvan de functie in de reticulocyt onduidelijk is. De incubatie-experimenten met "unsealed", "resealed" en opgeloste ghosts tonen aan dat het voor een specifieke reactie tussen transferrine en de receptor op de celmembraan, waarbij ijzer van transferrine verwijderd wordt, noodzakelijk is dat dit transferrine met intacte reticulocyten kan reageren. Het feit dat ook de binding tussen transferrine en de ghost veel minder effectief is dan tussen transferrine en de intacte reticulocyt maakt het waarschijnlijk dat de conformatie van de receptor beïnvloed wordt door de omgevende membraan-eiwitten. Bij verandering van deze conformatie gaat een groot deel van de specificiteit van de transferrinebinding verloren. Ook Morgan en Baker (9) hebben op het belang van een intacte cel voor de reactie met transferrine gewezen.

Uit de resultaten van de experimenten met de wisselende incubatietemperatuur blijkt dat het vrijmaken van ijzer uit de transferrine en het transport naar het intracellulaire compartiment temperatuurgevoeliger is dan de binding van transferrine aan de receptor, hetgeen zich uit in een grotere afname van de ^{59}Fe -activiteit in de cytosol en de componenten A, B_1 en B_2 , ten opzichte van de afname van de ^{125}I -activiteit in de B_2 -component.

Literatuur

1. JANDL, J.H., INMAN, J.K., SIMMONS, R.L. and ALLEN, D.W. (1959). Transfer of iron from serum iron-binding protein to human reticulocytes. *J. Clin. Invest.* **38**, 161-185.
2. VERHOEF, N.J. and NOORDELOOS, P.J. (1977). Binding of transferrin and uptake of iron by rat erythroid cells in vitro. *Clin. Science and Mol. Medicine* **52**, 87-96.
3. NUNEZ, M.T., GLASS, J., FISCHER, S., LAVIDOR, L.M., LENK, F.M. and ROBINSON, S.H. (1977). Transferrin receptors in developing murine erythroid cells. *Brit. J. Haematol.* **36**, 519-526.
4. BROWN, E.B. (1977). Transferrin physiology and function in iron transport. *Ciba foundation symposium 51* (new series), 125-143, Uitg. Elsevier Exc. Med., North-Holland.
5. LEIBMAN, A. and AISEN, P. (1977). Transferrin receptor of the rabbit reticulocyte. *Biochemistry* **16**, 1268-1272.
6. SPEYER, B.E. and FIELDING, J. (1974). Chromatographic fractionation of human reticulocytes after uptake of doubly labeled ^{59}Fe , ^{125}I -transferrin. *Biochim. Biophys. Acta* **332**, 192-200.
7. HOLLOWAY, P.W. (1973). A simple procedure for removal of Triton X-100 from protein samples. *Anal. Biochem.* **53**, 304-308.
8. MARTINEZ-MEDELIN, J. and BENAVIDES, L. (1979). The rate limiting step in the reticulocyte uptake of transferrin and transferrin iron. Effects of some incubation variables. *Biochim. Biophys. Acta* **584**, 84-93.
9. MORGAN, E.H. and BAKER, E. (1974). The interaction between transferrin and rabbit reticulocyte ghosts. *Biochim. Biophys. Acta* **263**, 240-248.

HOOFDSTUK VII

De rol van de geïsoleerde membraancomponent B_2 bij het ijzeropnameproces door de reticulocyt

Inleiding

In het vorige hoofdstuk is de isolatie van een membraancomponent – B_2 – beschreven, die op grond van het feit dat praktisch alle op de reticulocyt aanwezige ^{125}I -activiteit (d.w.z. transferrine) zich in deze B_2 -component bevindt, mogelijk het transferrine-receptorcomplex representeert.

Het functioneel belang van deze membraancomponent in het proces van de ijzeropname is echter geenszins aangetoond. Gezien de rol die de membraanreceptor voor transferrine vervult in het ijzeropnameproces van de reticulocyt, is te verwachten dat een blokkade van de receptor gepaard gaat met een verminderde binding van transferrine aan de cel en dientengevolge met een verminderde ijzeropname door de cel.

Indien B_2 werkelijk het transferrine-receptorcomplex vertegenwoordigt, zou een antilichaam gericht tegen het membraangedeelte van de B_2 -component dan ook een afname van de transferrinebinding en ijzeropname in reticulocyten moeten kunnen bewerkstelligen.

In dit hoofdstuk wordt de bereiding en zuivering van een tegen het membraangedeelte van de B_2 -component gericht antilichaam beschreven. Tevens wordt nagegaan welke invloed een afscherming van de B_2 -component door dit antilichaam uitoefent op de transferrinebinding aan en ijzeropname door de reticulocyt.

Materialen en Methoden

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

De niet-Fe membraaneiwwitten

Membraaneiwwitten van de reticulocyt welke niet behoren tot de fracties A, B_1 en/of B_2 (fig. 1 en 2, hoofdstuk VI) worden als niet-Fe membraaneiwwitten beschouwd.

De bereiding van antilichamen tegen het transferrine-receptorcomplex, B_2 en tegen niet-Fe membraaneiwwitten

Konijnen werden geïmmuniseerd met het transferrine-membraancomplex, B_2

en met niet-Fe membraaneiwwitten.

De immunoglobulinefracties werden uit de antisera geïsoleerd met behulp van gelfiltratie over Sephadex G-150 en ionen uitwisselingschromatografie over DEAE-Sephadex A50. De verkregen antilichamen werden met behulp van een Ouchterlony techniek getest.

De zuivering van de tegen het transferrine-membraancomplex B₂ gerichte antilichamen

De antitransferrine antilichamen, die deel uitmaakten van de tegen de B₂-component gerichte immunoglobulinefractie werden met behulp van affiniteitschromatografie over een CNBr-geactiveerde Sepharose-4B transferrinekolom verwijderd. (Zie voor elutiebuffers hoofdstuk II, onder bereiding transferrine).

De bereiding van Fab- en Fc-fragmenten van het tegen B₂ gerichte antilichaam

Voor de bereiding van Fab- en Fc-fragmenten van het tegen B₂ gerichte antilichaam en van het tegen de niet-Fe membraaneiwwitten gerichte antilichaam werd gebruik gemaakt van een door Van Eijk beschreven methode (1, 2). Hiertoe werd een 2%-ige oplossing van de immunoglobulinefractie in 1 molair Tris-buffer van pH 8,0 binnen 30 minuten bij kamertemperatuur gereduceerd door het toevoegen van 2-mercaptoethanol uit een uiteindelijke concentratie van 0,2 mol/l. De oplossing werd tot 0°C afgekoeld en de vrije SH-groepen werden geblokkeerd door een overmaat monoïodoacetaamide (uiteindelijke concentratie 0,4 mol/l; 45 minuten voortdurend roeren). Om de 7 S fractie te isoleren, werd met de verkregen oplossing een gelfiltratie uitgevoerd, over Sephadex G-150 met een 0,1 molair Tris – 0,5 molair NaCl – 0,002 molair EDTA buffer van pH 8,2 als eluens. De aldus verkregen oplossing van gereduceerd IgG werd gedurende 16 uur tegen 0,1 molair Tris van pH 8,0 gedialyseerd en vervolgens door trypsine gesplitst (eiwit/enzym ratio = 50/1). De splitsing werd beëindigd door de oplossing een aantal maal te bevriezen en te ontdooien, waarna de pH op 6,0 werd gebracht en de oplossing gedurende 1 nacht bij 4°C gedialyseerd werd tegen een groot volume 0,15 molair NaCl. De 3,5 S fragmenten (Fab en Fc) werden verkregen door middel van gelfiltratie van de gedialyseerde oplossing over Sephadex G-150. Via chromatografie van de geïsoleerde 3,5 S fragmenten over DEAE-cellulose was het mogelijk om deze 3,5 S fragmenten te scheiden in Fab- en Fc-fragmenten.

De verkregen fracties werden op immunactiviteit getest met behulp van een Ouchterlony techniek. De homogeniteit van de fracties werd nagegaan met behulp van een analytische ultracentrifuge (Beckman model E).

Het blokkeren van de transferrine-receptor op de celmembraan

Reticulocyten werden geïncubeerd met anti-B₂ en anti-niet-Fe membraanfractie IgG.

In een ander experiment werden de reticulocyten 30 minuten geïncubeerd met verschillende concentraties van Fab-fragmenten van het anti-B₂ IgG.

Controle-experimenten werden uitgevoerd met Fab-fragmenten van konijnen-

IgG gericht tegen ratten-IgG en met Fab-fragmenten van konijnen-IgG tegen de niet-Fe membraanfractie.

Met behulp van immunofluorescentiestudies werd nagegaan of de Fab-fragmenten met de reticulocyten reageerden. Hiertoe werd fluoresceïneisothiocyanaat gekoppeld aan antilichamen tegen Fab-fragmenten van konijnen-IgG volgens een door The beschreven procedure (3).

De incubatie van reticulocyten

Rattenreticulocyten werden direct of na preïncubatie met de diverse Fab-fragmenten geïncubeerd met ^{125}I en ^{59}Fe gemerkt transferrine op de in hoofdstuk II beschreven wijze.

Daarnaast werd een experiment uitgevoerd waarbij de incubatietijd niet de gebruikelijke 30 minuten bedroeg maar varieerde tussen de 5 en 60 minuten.

Resultaten

Zuivering van het anti-B₂ immunoglobuline

Met de Ouchterlony techniek gaf het anti-B₂ immunoglobuline vier precipitatielijnen te zien, indien het werd getest tegen het antigeen B₂. Dit bevestigt de door middel van analytische ultracentrifugatiestudies reeds aangetoonde heterogeniteit van B₂ (hoofdstuk VI). Eén van deze precipitatielijnen werd veroorzaakt door een tegen transferrine gericht antilichaam, dat deel uitmaakt van het anti-B₂ immunoglobuline.

Aangezien dit antitransferrine antilichaam van storende invloed zou kunnen zijn bij de incubatie tussen de met Fab-fragmenten van anti-B₂ gepreïncubeerde reticulocyten en transferrine werd met behulp van affiniteitschromatografie (CNBr-Sepharose-transferrinekolom) dit antitransferrinedeel verwijderd. Bij elutie van de anti-B₂ immunoglobulinen over een CNBr-geactiveerde Sepharose-4B kolom waaraan transferrine covalent was gebonden, ontstonden 2 eiwitpieken (fig. 1). De als A aangeduide piek reageerde niet meer met transferrine in een Ouchterlony techniek en representeert de overige anti-B₂ antilichamen. De als B aangeduide piek, welke van de kolom elueert, nadat de elutiebuffer is verandert (pH 7,2 → pH 2,8) reageerde alleen met transferrine en niet met de andere samenstellende eiwitten van de B₂-component.

Incubatie van "gezuiverd anti-B₂" met een reticulocytensuspensie

Indien het gezuiverde anti-B₂ immunoglobulinen werd geïncubeerd met een reticulocyten-rijke celsuspensie resulteerde dit in een agglutinatie van de reticulocyten en erythrocyten van deze celsuspensie. Deze waarneming houdt in dat het anti-B₂ immunoglobuline niet als intact molecuul gebruikt kan worden om de transferrine-receptor te blokkeren, omdat de veroorzaakte agglutinatie de celsuspensie ongeschikt maakt voor incubatie met transferrine.

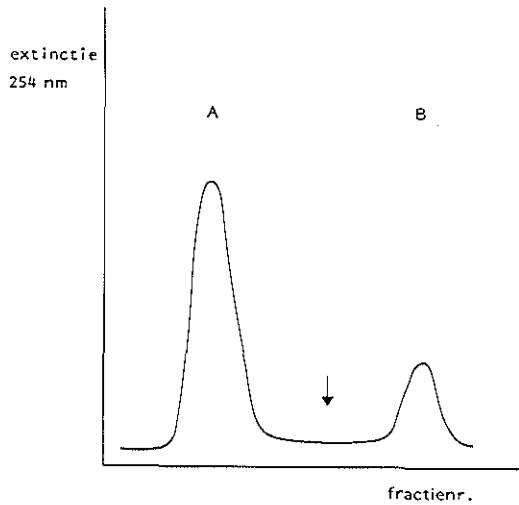


Fig. 1 Affiniteitschromatografie met een anti-B₂ antilichaam op een CNBr-Sepharose transferrinekolom.

De pijl geeft het moment aan waarop de elutiebuffer werd veranderd.

Het anti-B₂ immunoglobuline diende dan ook gesplitst te worden in Fab- en Fc-fragmenten, waarbij de Fab-fragmenten de componenten van het anti-lichaam vormen, welke met het antigeen, in dit geval de B₂ membraancomponent, reageren.

Splitsing van het gezuiverde anti-B₂ immunoglobuline in Fab- en Fc-fragmenten

Het gezuiverde anti-B₂ immunoglobuline werd gereduceerd en gesplitst via de in dit hoofdstuk beschreven methode. Het elutiediagram op Sephadex G-150 van de, na proteolyse van het gereduceerde gammaglobuline door trypsine, verkregen fracties is afgebeeld in fig. 2. De verkregen fracties werden geanalyseerd in de analytische ultracentrifuge; zij bestonden uit componenten met respectievelijk sedimentatiecoëfficiënten van 7 S (fractie A), 5,2 S (fractie B) en 3,5 S (fractie C). De 3,5 S fractie reageerde in een Ouchterlony immunodiffusieplaat met anti-Fab en anti-Fc immunoglobulinen. De Fab- en Fc-fragmenten konden op een DEAE-cellulose kolom van elkaar gescheiden worden.

Reticulocyten werden met verschillende concentraties Fab-fragmenten geïncubeerd. Na incubatie bleken de cellen onveranderd van vorm en osmotische resistentie (Reticulocytenpercentage in dit experiment 58%). Immunofluorescentiestudies toonden aan dat de Fab-fragmenten van gezuiverd anti-B₂ aan de reticulocyten- en erythrocytenmembraan gebonden waren. Identieke resultaten werden verkregen indien het hierboven beschreven experiment werd uitgevoerd met anti-niet-Fe immunoglobulinen.

De invloed van de preïncubatie met Fab-fragmenten op de transferrine-binding en ijzeropname door de reticulocyt

Een reticulocytensuspensie werd gepreïncubeerd met Fab-fragmenten van anti-

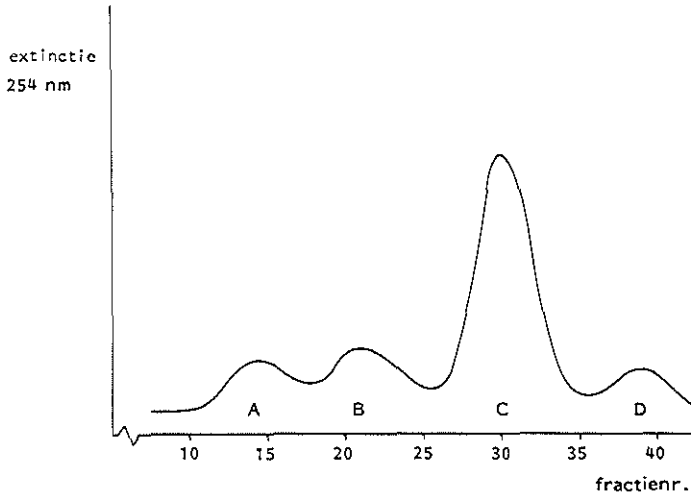


Fig. 2 Gelfiltratie op Sephadex G-150 van het door trypsine gesplitste anti-B₂ immunoglobuline.
 A - 7 S fractie; B - 5,2 S fractie; C - 3,5 S fractie; D - splitsingsproducten

B₂, van anti-niet-Fe en van antiratten-IgG in een concentratiebereik van 50 tot 400 µg Fab met een interval van 50 µg. Na de preïncubatie was geen vrij Fab meer aantoonbaar. Vervolgens werd de gepreïncubeerde celsuspensie op de gebruikelijke wijze geïncubeerd met, met ¹²⁵I en ⁵⁹Fe gemerkt transferrine. Een deel van de oorspronkelijke reticulocyten suspensie werd direct met transferrine geïncubeerd zonder met Fab-fragmenten gepreïncubeerd te zijn. Alle incubaties werden in duplo uitgevoerd.

De transferrinebinding en ijzeropname door de reticulocyt zijn weergegeven in fig. 3 en 4. Het is duidelijk dat er een van de concentratie Fab anti-B₂ in het preïncubatiemedium afhankelijke afname van de transferrinebinding en ijzeropname plaatsvindt. De afname van de ijzeropname is meer uitgesproken dan de afname van de transferrinebinding.

Fig. 5 en 6 tonen de gemiddelde resultaten van 6 experimenten, waarin reticulocyten gepreïncubeerd werden met Fab-fragmenten van anti-B₂ of met Fab-fragmenten van anti-niet-Fe membraanfragmenten, dit laatste om een eventuele aspecifieke afname van de transferrinebinding t.g.v. de preïncubatie op zich uit te sluiten. Fab-fragmenten van anti-niet-Fe membraanfragmenten blijken geen significante afname van de transferrinebinding en/of ijzeropname te bewerkstelligen en de remming door Fab-fragmenten van anti-B₂ is dan ook specifiek en significant.

Tenslotte werd nog nagegaan of het ijzeropnameproces, na preïncubatie met Fab-fragmenten van anti-B₂, op dezelfde wijze verliep als bij normale reticulocyten, die direct met transferrine worden geïncubeerd. Hiertoe werd de helft van een reticulocyten suspensie gepreïncubeerd met 200 µg Fab-fragmenten van anti-B₂. De andere helft van de reticulocyten suspensie werd identiek behandeld met betrekking tot preïncubatietijd en-temperatuur, echter zonder Fab-fragmenten in het medium. Gedeeltes van beide suspensies werden gedurende 5, 10, 20, 30 en 60 minuten ge-

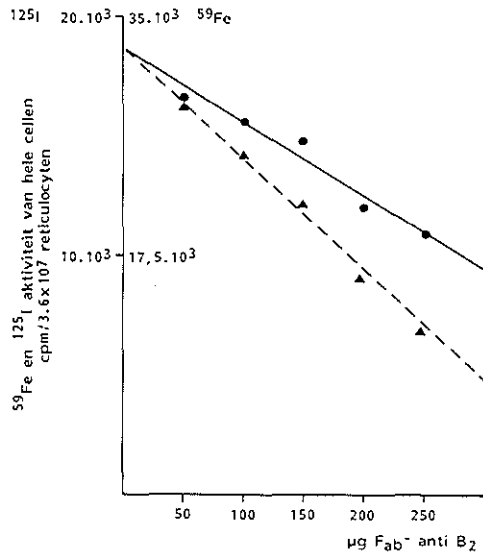


Fig. 3 De binding van transferrine aan reticulocyten en de opname van ijzer door reticulocyten na preincubatie met verschillende hoeveelheden Fab van anti- B_2 .

●—● ^{125}I
 ▲--▲ ^{59}Fe

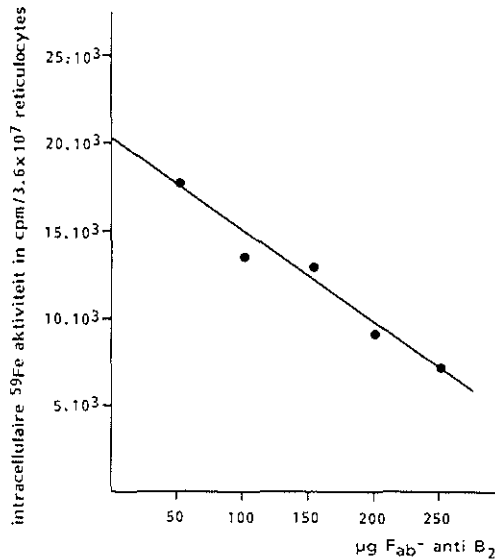


Fig. 4 De opname van ijzer in de cytosol van reticulocyten na preincubatie met verschillende hoeveelheden Fab van anti- B_2 .

incubeerd met, met ^{125}I en ^{59}Fe gemerkt, transferrine.

De resultaten in fig. 7 en 8 laten zien dat de aard van het proces, waarmee transferrine aan de cel gebonden wordt en het ijzer door de cel opgenomen wordt,

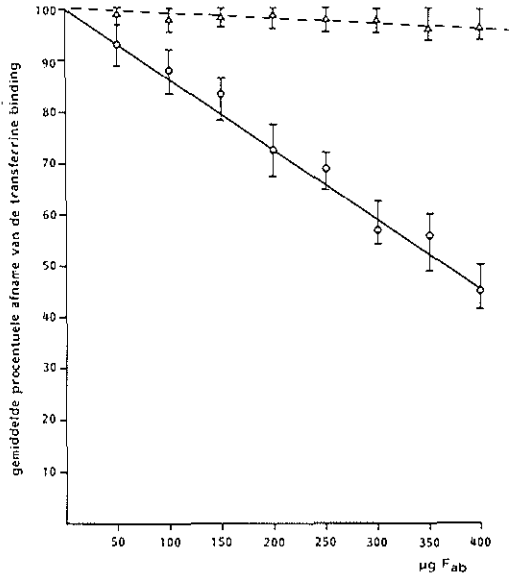


Fig. 5 De procentuele afname van de binding van transferrine aan de reticulocyt na preïncubatie met Fab-fragmenten van antilichamen tegen ratten-IgG, tegen rattenserum zonder transferrine en tegen niet-Fe membraanproteïnen (Δ - Δ - Δ) en met Fab-fragmenten van anti-B₂ (O-O-O).

Δ O spreiding

niet veranderd is door de preïncubatie met de Fab-fragmenten. Er blijft een snelle absorptiefase, een associatiefase en een evenwichtsfase bestaan; de evenwichtsfase is echter reeds na 10 minuten bereikt. De resultaten zijn verenigbaar met een afgenomen aantal vrije receptoren van transferrine, waardoor de evenwichtsfase eerder en op een lager niveau bereikt wordt en dientengevolge de snelheid, waarmee ijzer door de cel opgenomen wordt, afneemt.

Discussie

Op grond van het feit dat een van de reticulocyten membraan geïsoleerde component, B₂, praktisch alle aan de cel gebonden transferrine bevatte, werd aan deze component de rol van transferrine-receptor op de reticulocyten membraan toegedacht.

Alvorens echter te concluderen dat de geïsoleerde component B₂ een specifiek transferrine membraan-receptorcomplex representeert, diende ook de functie van deze membraancomponent in het ijzeropnameproces te worden aangetoond. Het feit dat een reactie tussen intacte reticulocyten en Fab-fragmenten van de tegen de geïsoleerde B₂ gerichte antilichamen een afname van de transferrinebinding en ijzeropname bewerkstelligt, steunt de hypothese dat de B₂-component o.a. als transferrine-receptor op de reticulocyten membraan fungeert. Dit te meer daar de afname van de transferrine-binding en van de ijzeropname een lineaire correlatie vertoont met

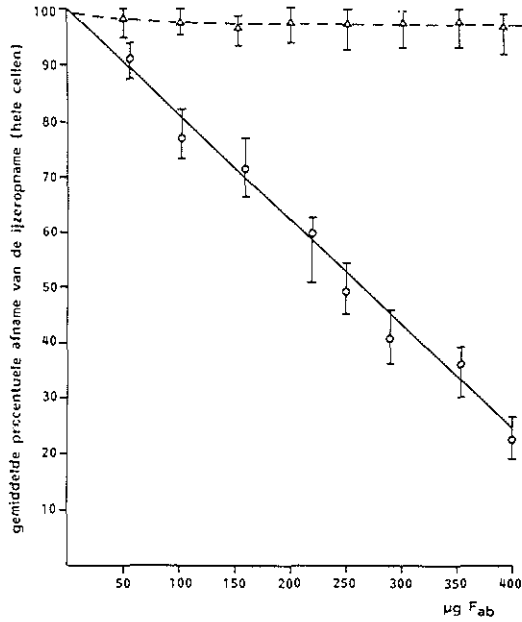


Fig. 6 De procentuele afname van de ijzeropname door de reticulocyt na preïncubatie met Fab-fragmenten van antilichamen tegen ratten-IgG, tegen rattenserum zonder transferrine en tegen niet-Fe membraanewitten (Δ - Δ - Δ) en met Fab-fragmenten van anti-B₂ (\circ - \circ - \circ).

Δ \circ spreiding
 $\bar{\Delta}$ $\bar{\circ}$

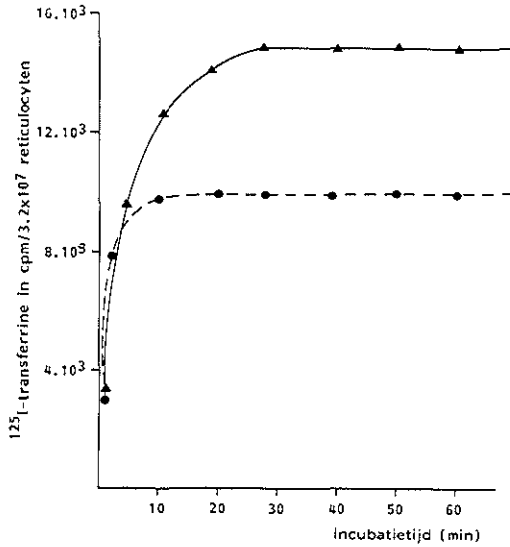


Fig. 7 De binding van transferrine aan de reticulocyt in het verloop van de incubatietijd.

- \blacktriangle - \blacktriangle - \blacktriangle normale reticulocyten.
- \bullet - \bullet - \bullet met 200 µg Fab van anti-B₂ gepreïncubeerde reticulocyten.

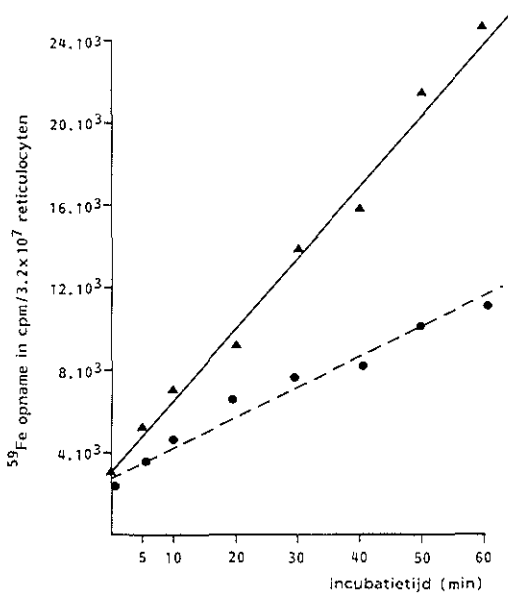


Fig. 8. De opname van ijzer door de reticulocyt in het verloop van de incubatietijd.
 ▲▲▲ normale reticulocyten.
 ●●● met 200 μg Fab van anti- B_2 gepreincubeerde reticulocyten.

de concentratie van aan de celsuspensie toegevoegde Fab-fragmenten.

Bovendien blijkt dat deze Fab-fragmenten van anti- B_2 een specifieke afname van de transferrinebinding en ijzeropname bewerkstelligen, daar Fab-fragmenten van antilichamen gericht tegen andere membraancomponenten dan B_2 geen inhibitie veroorzaken. Wel dient vermeld te worden dat B_2 nog heterogeen van samenstelling is en het niet duidelijk is of alle tot B_2 behorende componenten deel uitmaken van de transferrine-receptor.

Uit de resultaten van de experimenten met de wisselende incubatietijd (fig. 7 en 8) blijkt dat de aard van het ijzeropnameproces na blokkade van een aantal receptoren gelijk is gebleven. In het reactiepatroon van de transferrine-reticulocyt-interactie zijn nog steeds een initiële adsorptiefase, een associatiefase en een evenwichtsfase te onderscheiden; de opname van ijzer is na preincubatie met Fab-fragmenten van anti- B_2 nog steeds lineair in de tijd; de snelheid van het ijzeropnameproces is echter duidelijk afgenomen. De evenwichtsfase van de reactie tussen transferrine en reticulocyten wordt na preincubatie met Fab-fragmenten van anti- B_2 eerder bereikt hetgeen verenigbaar is met een afgenomen aantal vrije bindingsplaatsen. Uit de verminderde ijzeropname na blokkade van B_2 blijkt dat de reticulocyt bij een afname van een aantal vrije receptoren en gelijk blijven van het intracellulaire celmetabolisme, niet in staat is om de afname van het aantal vrije receptoren te compenseren door middel van een snellere uitwisseling tussen transferrine en reticulocyt. Voor het feit dat geen honderd procent remming van het ijzeropnameproces is te bewerkstelligen met de anti- B_2 antilichamen zijn een aantal verklaringen aan te voeren:

- a) het antilichaam is nog heterogeen van samenstelling en de werkelijk toegevoegde hoeveelheid antitransferrine-receptor antilichaam kan nog niet bepaald

worden.

- b) de Fab-fragmenten van de tegen B₂ gerichte antilichamen zijn niet alleen voor de reticulocyten beschikbaar, daar de immunofluorescentiestudies aantoonde dat ook erythrocyten met deze Fab-fragmenten reageerden.

Een ander nog niet verklaard fenomeen is de meer uitgesproken afname van de ijzeropname door de cel dan de afname van de transferrinebinding. Mede afhankelijk van het feit of transferrine bij de afgifte van ijzer wel of niet naar het intracellulaire compartiment wordt vervoerd, kan men voor dit fenomeen een aantal verklaringen geven. Indien men de hypothese van Morgan aanhangt, waarbij transferrine door de cel wordt opgenomen, zou de blokkade van een receptor de pinocytose van aangrenzende transferrine-receptoren kunnen belemmeren zonder de reactie tussen transferrine en deze aangrenzende receptor tegen te gaan (4 en hoofdstuk I, blz. 00).

Aan de andere kant zou een blokkade van B₂, mede gezien het heterogene karakter van B₂, ook de functie van andere, van B₂ deeluitmakende, membraanei-witten kunnen remmen. Gezien het feit dat de ⁵⁹Fe/¹²⁵I verhouding van B₂ groter is dan de ⁵⁹Fe/¹²⁵I verhouding van het oorspronkelijke transferrine zouden deze membraanei-witten als intermediair kunnen fungeren tussen aan transferrine gebonden ijzer op de receptorplaats en de intracellulaire ijzercomponenten.

Deze verklaring gaat uit van de hypothese van Jandl, waarbij ijzer reeds op de receptorplaats van transferrine wordt verwijderd (5, hoofdstuk I, blz. 00). Beide verklaringen zijn echter speculatief en het fenomeen van de sterkere inhibitie van de ijzeropname ten opzichte van de transferrinebinding door antilichamen tegen het receptorcomplex B₂ dient nog nader onderzocht te worden, voordat men er een goed gefundeerd oordeel over kan vellen.

Literatuur

1. VAN EIJK, H.G. (1966). Fragmentation of human globulin with papain. *Biochim. Biophys. Acta* 127, 241-243.
2. VAN EIJK, H.G., TERHORST, C. en DE VIJLDER, M.M.A. (1967). Fragmentation of human IgG globulin with papain, trypsin and pepsin. *Clin. Chim. Acta* 16, 429-431.
3. THE, T.H. (1967). Academisch Proefschrift: Conjugatie van fluoresceïne isothiocyanaat aan antistoffen (Amsterdam).
4. MORGAN, E.H. and APPLETON, T.C. (1969). Autoradiographic localisation of ¹²⁵I-labelled transferrin in rabbit reticulocytes. *Nature* 223, 1371-1372.
5. JANDL, J.H. and KATZ, J.H. (1963). The plasma-to-cell cycles of transferrin. *J. Clin. Invest.* 42, 314-326

HOOFDSTUK VIII

Nadere karakterisering van de transferrine-receptor op de reticulocytenmembranen van de rat

Inleiding

Op grond van de in hoofdstuk VI en VII beschreven resultaten werd geconcludeerd dat de receptor voor transferrine op de erythroïde cel waarschijnlijk deel uitmaakt van een membraaneiwit dat in ieder geval voor een deel aan de plasmazijde van de celmembraan gelocaliseerd is. De membraan van de erythroïde cel is voor circa 52% uit eiwit, voor circa 40% uit lipiden en voor circa 8% uit koolhydraten samengesteld (1). De membraanlipiden worden onderscheiden in fosfolipiden, glycolipiden en cholesterol; behalve sfingomyeline bestaan de fosfolipiden van de celmembraan uit fosfoglyceriden (2). De eiwitten van de membraan worden op grond van hun kwantiteit onderverdeeld in "major en minor" polypeptiden; deze indeling houdt niet in dat de minor polypeptiden ook functioneel minder belangrijk zijn (1).

Met behulp van polyacrylamide gel elektroforese met opgeloste erythrocytenmembranen is vastgesteld dat deze membraan ongeveer 25 polypeptiden bevat, hoewel er ook elektroforesemethoden beschreven zijn, waarmee wel 50-200 eiwitbanden te detecteren zijn (3, 4). De major polypeptiden worden meestal genummerd, 1 t/m 7, naar aanleiding van hun gedrag bij een polyacrylamide gel elektroforese, uitgevoerd volgens Fairbanks en Steck (3). De relatieve molecuulmassa's van deze major polypeptiden 1 t/m 7 liggen tussen de $29 \cdot 10^3$ en $240 \cdot 10^3$. Polypeptide 3 is kwantitatief het belangrijkste membraaneiwit en vertegenwoordigt 25-30% van het in de erythrocytenmembraan aanwezige eiwit (1).

De polypeptide patronen van erythroïde cellen van mens en verschillende diersoorten komen bijna geheel met elkaar overeen (4, 5, 6, 7).

De erythrocytenmembraan bevat tevens een aantal glycoproteïnen; die tezamen circa 10% van het totale eiwitgehalte van de membraan vormen (1). Met behulp van een extractie van de humane erythrocytenmembraan met een mengsel van chloroform en methanol kunnen 3 sialoglycoproteïnen geïsoleerd worden, die op grond van hun kwantiteit in de membraan onderverdeeld worden in 1 major en 2 minor sialoglycoproteïnen. Het major glycoproteïne is bekend onder de naam glycophorine (8, 9, 10). Hoewel de glycoproteïnepatronen van erythroïde cellen van mens en verschillende diersoorten duidelijke verschillen tonen, bestaat er functioneel wel een grote uniformiteit (7, 8). De glycoproteïnen bevatten o.a. A-, B- en MN-bloedgroepantigeen, alsmede verscheidene receptorplaatsen (o.a. voor het influenzavirus en voor de phytohemagglutininen) (11, 12).

Met behulp van cytochemisch en elektronenmicroscopisch onderzoek van intacte erythrocyten, alsmede van, uit erythrocytenmembranen bereide, "unsealed ghosts, resealed ghosts, right-side out vesicles en inside-out vesicles", is vastgesteld

dat er een asymmetrie van de eiwitverdeling tussen de plasma- en cytoplasmazijde van de membraan bestaat (1, 13, 14, 15, 16, 17, 18). Van de major polypeptiden lijken 1, 2, 4, 5, 6 en 7 uitsluitend aan de cytoplasmazijde van de membraan voor te komen, terwijl een aantal van de sialoglycoproteïnen waarschijnlijk alleen aan de plasmazijde van de membraan voorkomen. Polypeptide 3 en glycophorine door-klieven waarschijnlijk de gehele membraan, zodat een bepaald deel van deze eiwitten, de koolhydraatgroep, aan de plasmazijde gelocaliseerd is, terwijl een ander deel van hetzelfde eiwit aan de cytoplasmazijde van de membraan voorkomt.

Op grond van hun binding met de membraan worden de eiwitten tenslotte nog verdeeld in perifere en intrinsieke membraaneiwitten. Deze onderverdeling berust op het "fluid mosaic model" van Singer en Nicholson, waarbij de basale matrix van de membraan wordt gevormd door een visceuze, maar "fluid lipidenbilayer" (19). De perifere membraaneiwitten bevinden zich aan de rand van deze dubbellaag, terwijl de intrinsieke eiwitten met hun hydrofobe deel reageren met de vetzuurketens van de lipidendubbellaag.

In dit hoofdstuk wordt getracht om het geïsoleerde transferrine-receptorcomplex nader te karakteriseren en wordt tevens nagegaan of deze transferrine-receptor deel uitmaakt van, of een nauwe relatie vertoont met, één van de bekende polypeptiden of sialoglycoproteïnen.

Materiaal en Methoden

- a) Erythrocyten en reticulocyten werden verkregen uit mannelijke Wistar ratten op de in hoofdstuk II beschreven wijze.
- b) Met ^{59}Fe - en ^{125}I -gemerkt rattentransferrine werd bereid via de in hoofdstuk II beschreven methode.
- c) De incubatie van rattenreticulocyten met transferrine en de bereiding van een ghostsuspensie uit de reticulocytensuspensie vond plaats op de in hoofdstuk II beschreven wijze.
- d) *Zuivering van transferrine-receptor uit B_2 -component*
 1. *Verwijdering van Triton X-100 uit de B_2 -component*

Voor het verwijderen van Triton X-100 uit de B_2 -component werd een door Holloway beschreven methode, voor het verwijderen van Triton X-100 uit eiwitoplossingen, gebruikt (31). Aan een oplossing met de te zuiveren B_2 -component werd natriumdodecylsulfaat (SDS) toegevoegd tot een uiteindelijke concentratie van 0,1%. Vervolgens werd de oplossing geëluëerd over een BioBeads SM-2 kolom, welke geëquilibreerd was met 0,01 M Tris 0,001 M EDTA buffer (pH 8,0) welke SDS bevatte in een concentratie van 100 mg/100 ml.
 2. *Polyacrylamide gel elektroforese van de B_2 -component*

Met de geïsoleerde B_2 -component werd na verwijdering van Triton X-100

een polyacrylamide gel elektroforese uitgevoerd (zie e).

3. *Isolatie van de transferrine-receptor uit de B₂-component*

Met een Ouchterlony diffusie methode werd nagegaan welke verdunning van de uit 15 experimenten (10^9 reticulocyten) verzamelde B₂-componenten het beste met een tegen transferrine gericht antilichaam reageerde.

De B₂-component werd vervolgens gedurende 60 minuten bij 37°C geïncubeerd met antitransferrine. Het gevormde precipitaat werd gesedimenteerd door het incubatiemengsel gedurende 5 minuten te centrifugeren bij 800 g. Het precipitaat werd onderworpen aan een SDS-polyacrylamide gel elektroforese. Het supernatant werd gedurende 60 minuten bij 37°C geïncubeerd met antilichamen tegen B₂ gericht. Het verkregen precipitaat werd weer gesedimenteerd en onderworpen aan een SDS-polyacrylamide gel elektroforese.

e) *Polyacrylamide gel elektroforese in SDS*

De elektroforese van de verschillende fracties op polyacrylamide gels werd verricht volgens een door Fairbanks et al. beschreven methode (3), die iets veranderd werd. Hierbij wordt gebruik gemaakt van 5,9%-ige polyacrylamide gels bereid met SDS. De lengte van de gels bedraagt 10 cm; de elektroforese wordt uitgevoerd bij 7,8 V/cm gellengte en 8 mA/gel. De duur van de elektroforese is circa 60 minuten. Voor elektroforese werden de te onderzoeken monsters gedurende 3 minuten bij 100°C geïncubeerd in een gelijk volume van een oplossing van 100 ml welke 2 gram SDS, 10 gram sucrose, 0,24 gram Tris-HCl (pH 8), 0,074 gram EDTA en 0,62 gram DTT bevat. De gels werden op eiwit gekleurd met Coomassie Brilliant Blue-G250. De gels werden op koolhydraten gekleurd met een door Fairbanks en Steck gemodificeerde PAS-kleuring (3).

In een aantal gevallen werden de gekleurde gels doorgemeten met een tot densitometer omgebouwde Zeiss PQM3 spectrofotometer ($\lambda = 540$ nm).

f) *Fractionering van de membraaneiwitten met een door Rosenberg en Guidotti beschreven methode (zie ook schema I) (20, 21)*

De beschreven methode werd op verschillende punten gewijzigd en aangepast aan de betrekkelijk geringe hoeveelheid uitgangsmateriaal. Van een 20-25 ml packed reticulocytensuspensie, welke was geïncubeerd met ¹²⁵I-transferrine werd volgens de reeds beschreven methode van Dodge een ghostsuspensie bereid. De ghostsuspensie werd gesuspendeerd in 30 ml 15 miliosmolair natriumfosfaatbuffer, pH 7,6; de suspensie werd vervolgens 20 uur bij 4°C gedialyseerd tegen 300 ml 15 miliosmolair natriumfosfaatbuffer, welke 1 milimolair EDTA/l en 50 milimolair β -mercaptoethanol/l bevatte. Na dialyse werd de suspensie 1 uur bij 20.000 g gecentrifugeerd, waarbij supernatant I en pellet I ontstonden (zie schema I). Pellet I werd geresuspendeerd in 100 ml van een 0,8 molair NaCl-oplossing. De verkregen suspensie werd gedurende 12 uur bij 4°C bewaard, onder voortdurend roeren. Vervolgens werd de suspensie 1 uur

bij 13.000 g gecentrifugeerd, waarbij supernatant II en pellet II ontstonden. Pellet II werd vervolgens bij -10°C driemaal geëxtraheerd met een ethanol/ether mengsel (verhouding 3:1). Elke extractie duurde 2 uur waarna een residu werd verkregen door de suspensie gedurende 30 minuten bij 13.000 g te centrifugeren. Na drie maal extraheren werd het uiteindelijke residu (\equiv Pellet III) verkregen door filtratie over Whatman No. 52 filtreerpapier.

Pellet III werd in Whatman No. 52 filtreerpapier verpakt en gedurende 24 uur iedere 5-10 minuten met ether geëxtraheerd in een gewijzigd Soxhlet apparaat, waardoor de temperatuur van pellet III tijdens deze extractie op ongeveer 0°C werd gehouden.

Na de etherextractie werd het residu (\equiv Pellet IV) in een exsiccator gedroogd en opgelost met 3%-ige SDS waarbij de uiteindelijke eiwitconcentratie 10 mg/ml bedroeg. Het voor de extractie gebruikte ethanol/ether mengsel, alsmede de gebruikte ether werden samengevoegd en vormden Supernatant III.

Van de verkregen pellets en supernatanten werden de ^{125}I -activiteit, de hoeveelheid eiwit, koolhydraten en vetten bepaald (22 t/m 27). De opgeloste pellet IV werd gegelfiltreerd over Sephadex-G150; de hierbij verkregen void volume fracties werden vervolgens over Sephadex-6B gechromatografeerd.

In een later stadium werd de ethanol/ether en etherextractie vervangen door een butanolextractie (28, 29). Dit had geen invloed op de resultaten.

g) *Isolatie van glycoproteïnen*

Voor de isolatie van de sialoglycoproteïnen uit de reticulocytenmembraan werd gebruik gemaakt van een extractiemethode met organische oplosmiddelen (9, 10). Bij deze methode werd één volumedeel van een membraansuspensie geëxtraheerd met negen volumedelen van een mengsel bestaande uit chloroform en methanol (2:1). Na de extractie werd het mengsel gedurende 10 minuten gecentrifugeerd bij 1500 rpm en 20°C . Hierbij ontstonden een waterige, een tussen- en een organische fase, welke apart werden verzameld, waarna in elke fase de ^{59}Fe - en ^{125}I -activiteit werd bepaald.

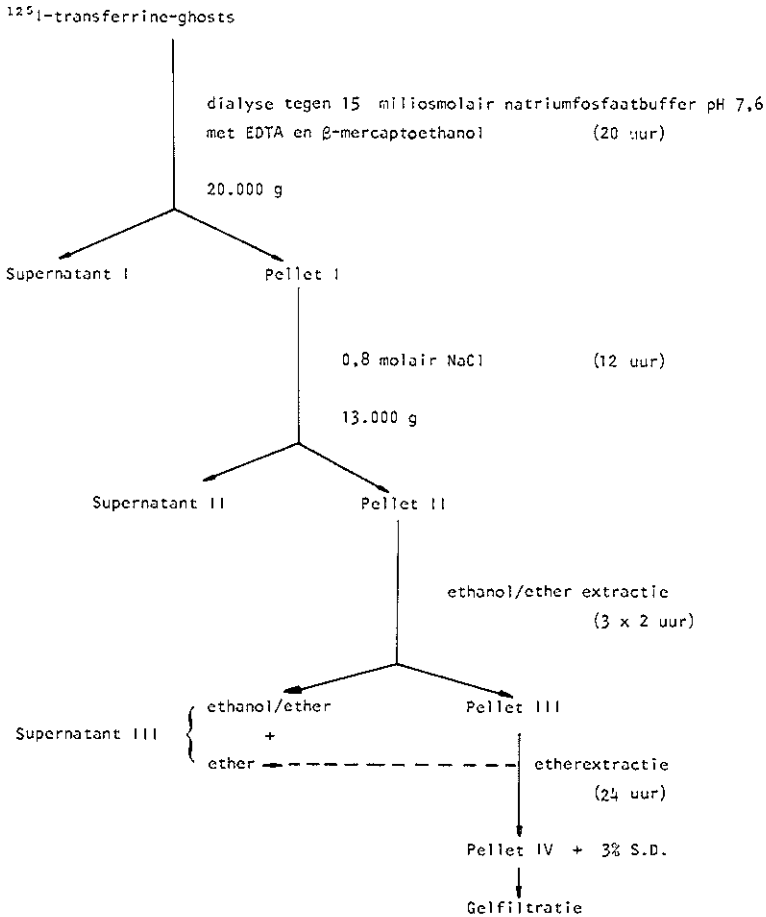
De waterige fase werd geconcentreerd en vervolgens gedurende 60 minuten bij 100.000 g en 4°C gecentrifugeerd. De supernatant, die de major glycoproteïnen bevat, werd aan een SDS-polyacrylamide gel elektroforese onderworpen. De gels werden gekleurd met een Coomassie brilliant Blue-G250 en een PAS-kleuring.

De tussenfase werd gedurende een nacht in een exsiccator gedroogd en vervolgens opgelost in een 3%-ige SDS-oplossing, waarin de uiteindelijke eiwitconcentratie ± 10 mg/ml bedroeg. De opgeloste tussenfase werd vervolgens gegelfiltreerd over Sephadex G-150; de hierbij verkregen void volume fracties werden gechromatografeerd over Sepharose-6B.

h) *Isolatie polypeptide 3 uit ghostsuspensie* (zie schema II blz. 86).

Voor de isolatie van polypeptide 3 uit een reticulocyten ghostsuspensie werd gebruik gemaakt van een door Kahlenberg beschreven methode (30); deze

Schema 1. De fractionering van membraaneiwwitten volgens Rosenberg en Guidotti

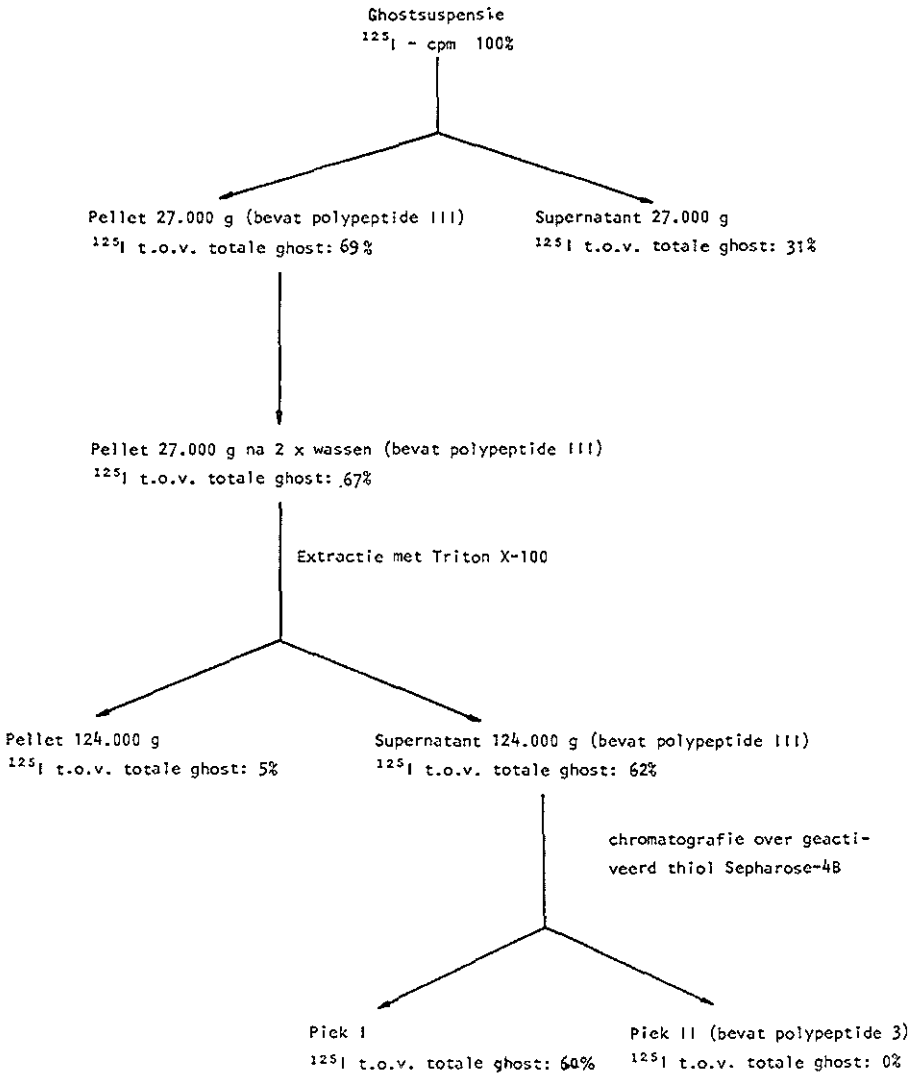


methode werd aangepast aan onze geringe hoeveelheid uitgangsmateriaal.

Een ghostsuspensie welke ± 15 mg eiwit bevatte, werd gesuspenderd in de 16 ml gedestilleerd water van 22°C. Onder voortdurend roeren werd 32 mg dimethylmaleïnezuur (DMMA) aan de suspensie toegevoegd, waarbij de pH op 7,5 werd gehouden onder toevoegen van NaOH (1 molair oplossing).

Nadat de pH verder stabiel bleef, werd de suspensie gecentrifugeerd bij 27.000 g. De verkregen pellet werd tweemaal gewassen met 32 ml van een 7,5 mM natriumfosfaatbuffer (pH 7,5) en vervolgens gesuspenderd in 3,5 ml van dezelfde buffer. Van deze suspensie werd 3 ml geëxtraheerd met 15 ml van een 56 mM natriumboraatbuffer (pH 8,0), welke 0,5 g Triton X-100 per 100 ml bevatte. Deze extractie werd uitgevoerd bij 4°C gedurende 20 minuten, waarna de suspensie 60 minuten bij 124.000 g werd gecentrifugeerd. Het verkregen supernatant (\equiv Triton X-100 extract) werd gedurende 1 nacht bij 4°C gedialy-

Schema 11.



seerd tegen de buffer, welke in de hierop volgende chromatografiestap als kolombuffer werd gebruikt en bestond uit 0,3 M NaCl, 1 mM EDTA en 0,5% Triton X-100 in 0,1 M Tris-HCl, pH 7,2.

Het gedialyseerde Triton X-100 extract werd vervolgens op een geactiveerde thiol Sepharose-4B kolom gebracht. De elutiesnelheid bedroeg 2,5 ml/uur. (Geactiveerde thiol Sepharose-4B werd verkregen van Pharmacia Fine Chemicals). De kolom werd daarna geëluëerd met 20 ml van de boven beschreven kolombuffer en vervolgens met 30 ml kolombuffer, die tevens 50 mM L-

cysteine bevatte. De bij deze procedure verkregen fracties werden geanalyseerd op polypeptidesamenstelling met behulp van SDS-polyacrylamide gel elektroforese en op ^{125}I -activiteit (\equiv transferrine).

Resultaten

1) *Bepaling van de relatieve molecuulmassa van de transferrine-receptor met behulp van polyacrylamide gel elektroforese*

In hoofdstuk V werd reeds waarschijnlijk gemaakt dat de transferrine-receptor deel uitmaakt van de B_2 -component. Aangezien bekend is dat het verwijderen van Triton X-100 uit eiwitoplossingen, bereid voor polyacrylamide gel elektroforese, resulteert in meer geprofileerde elektroforesepatronen, werd de Triton X-100 uit de van de Sepharose-6B verkregen B_2 -component verwijderd (7).

Na een SDS-polyacrylamide gel elektroforese met een van Triton X-100 gezuiverde B_2 component werden zowel met een Coomassie brilliant Blue-G250 kleuring als met een PAS-kleuring geen eiwitbanden waargenomen. Met autoradiografie werd op de plaats waar een transferrinestandaard zich in de gel bevindt wel een zwarting waargenomen. De meest voor de hand liggende verklaring voor het verkregen resultaat is, dat de eiwitconcentratie van een uit één experiment verkregen B_2 -component ($5 \cdot 10^7$ reticulocyten) zo laag is, dat met een eiwitkleuring niets te zien valt.

Gelet op deze feiten werden de B_2 -componenten uit 15 incubatie-experimenten (10^9 reticulocyten) samengevoegd en geconcentreerd. Controle-experimenten hebben aangetoond dat het oplossen van een met ^{125}I -transferrine gemerkte reticulocyten ghostsuspensie in oplossingen met een Triton X-100 concentratie van meer dan 15% resulteerde in een afsplitsen van ^{125}I -transferrine van de receptor. Aangezien door het concentreren van de verzamelde B_2 -componenten de Triton X-100 concentratie in de oplossing was toegenomen tot 23% viel te verwachten dat ook in deze oplossing van de B_2 -component transferrine van de receptor was afgesplitst. Dit vrije transferrine werd uit de B_2 -component verwijderd door precipitatie met antitransferrine.

Met het verkregen precipitaat werd een polyacrylamide gel elektroforese verricht, hetgeen resulteerde in drie eiwitbanden, die transferrine en de zware en lichte ketens van het gereduceerde antitransferrine representeerden. Uit gel elektroforesen met het niet gereduceerde precipitaat bleek dat het met antitransferrine geprecipiteerde complex een relatieve molecuulmassa had van circa 225.000 en dus uitsluitend uit transferrine-antitransferrine bestond.

Het, na de reactie met antitransferrine, verkregen supernatant van B_2 reageerde nog wel met anti- B_2 , maar niet meer met antitransferrine in een Ouchterlony diffusietechniek. De van transferrine gezuiverde B_2 -component werd geïncubeerd met anti- B_2 . Het hierbij verkregen precipitaat werd een aantal malen gewassen en vervolgens op een polyacrylamide gel geëlektroforeerd. Het resultaat van de Coomassie brilliant Blue-G250 kleuring van de gels is weergegeven in figuur 1. Uit deze resultaten blijkt dat de receptor voor transferrine op

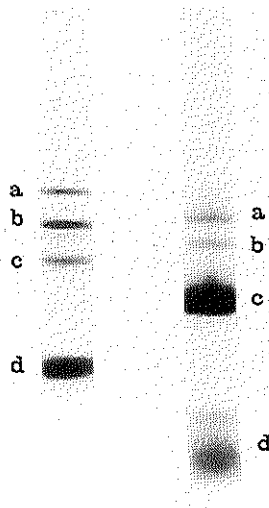


Fig. 1 Polyacrylamide gel elektroforese van de geïsoleerde B₂-component.
links – gel met standaardeiwitten – a. fosforylase a M_r 100.000; b. transferrine M_r 81.000; c. albumine M_r 68.000; d. adolase (subunit) M_r 40.000.
rechts – gel met geïsoleerde B₂-anti-B₂-complex – a. mogelijk receptoreiwit M_r 80.10³; b. mogelijk receptoreiwit M_r 70.10³; c. zwarte ketens anti-B₂; d. lichte ketens anti-B₂.

de celmembraan van de rattenreticulocyt gelegen is op een eiwit met een relatieve molecuulmassa van 80.10³ of op een eiwit met een relatieve molecuulmassa van 70.10³. Beide banden kleurden niet met de PAS-procedure.

2) Nadere localisatie van het transferrine-receptor eiwit in de membraan

Ten einde na te gaan of het receptoreiwit deel uitmaakt van major of minor polypeptide in de celmembraan of tot een van de sialoglycoproteïnen behoort, werden de membraaneiwitten selectief opgelost. Tevens werd hierbij bepaald, of het receptoreiwit tot de perifere dan wel tot de intrinsieke membraaneiwitten gerekend moest worden.

2a) Fractionering van de membraaneiwitten m.b.v. een gemodificeerde Rosenberg & Guidotti methode

De gevolgde fractioneringsmethode resulteerde in een uiteindelijke pellet (= IV schema I, onder methoden), die de meeste glycoproteïnen, de major polypeptiden, 3, 4, 2, 7 een gedeelte van de major polypeptiden 1 en 2 en een groot deel van de intrinsieke minor polypeptiden bevat. Uit tabel I blijkt dat de resultaten verkregen met de rattenreticulocytensuspensie in grote lijnen overeenkwamen met de uit de literatuur bekende gegevens voor humane erythrocyten, hoewel enige kleine verschillen waarneembaar waren.

Bij de eerste fractioneringsstap, de dialyse tegen β-mercaptoethanol en EDTA,

Tabel I. -- Procentuele samenstelling van verschillende ghostsuspensies

	Rattenreticulocyten ghost (\pm S.D.)	Humane erythrocyten ghost (\pm S.D.)	Pellet IV rat (\pm S.D.)	Pellet IV humaan (\pm S.D.)
Eiwit	49 \pm 4	49 \pm 2	90 \pm 3	91 \pm 3
Lipiden	42 \pm 4	43 \pm 1	3 \pm 1	2 \pm 1
Fosfolipiden	30 \pm 3	32 \pm 1	3 \pm 1	2 \pm 1
Cholesterol	12 \pm 1	11	—	—
Koolhydraten	9 \pm 1	8 \pm 1	7 \pm 2	7 \pm 2

\pm S.D. = \pm standaarddeviatie

Tabel II. -- De verwijdering van eiwitten en lipiden in de verschillende fractioneringsstappen (in procenten van oorspronkelijke hoeveelheid)

	Procentuele hoeveelheid eiwit		Procentuele hoeveelheid lipiden	
	reti rat (\pm S.D.)	ery humaan (\pm S.D.)	reti rat (\pm S.D.)	ery humaan (\pm S.D.)
Stap I (dialyse EDTA, β -mercaptoethanol)	20 \pm 4	11 \pm 4	—	—
Stap II (suspenderen in NaCl)	35 \pm 11	41 \pm 14	—	—
Stap III (lipidenextractie)	2 \pm 1	1 \pm 1	92 \pm 3	95 \pm 2

\pm S.D. = \pm standaarddeviatie

werd uit de rattenreticulocyten suspensie procentueel meer eiwit geïsoleerd dan uit een humane erythrocyten suspensie (tabel II).

Bij de tweede fractioneringsstap, het suspenderen in NaCl, is dit net andersom (tabel II). De totale hoeveelheid eiwit, die met beide fractioneringsstappen werd verwijderd, was voor de humane reticulocyten suspensie en de rattenreticulocyten suspensie ongeveer gelijk.

Tabel III geeft de invloed van de verschillende fractioneringsstappen op de 125 I-activiteit (= hoeveelheid transferrine) van de oorspronkelijke ghostsuspensie weer. Meer dan 80% van het oorspronkelijk aan de gehele celmembraan gebonden transferrine is nog na fractionering in de resterende membraansuspensie aanwezig. Op grond van dit resultaat kan geconcludeerd worden dat de membraanreceptor voor transferrine zich waarschijnlijk bevindt op één van de eiwitten die nog in pellet IV aanwezig zijn.

Gelfiltratie van de in SDS opgeloste pellet IV over Sepharose G-150 resulteerde in een elutiediagram zoals weergegeven in fig. 2. De in pellet IV aanwezige

Tabel III. — Verdeling van de ^{125}I -activiteit in de bij de fractioneringsprocedure verkregen pellets en supernanten.

	Procentuele ^{125}I -activiteit t.o.v. uitgangssuspensie (\pm S.D.)	Procentuele ^{125}I -activiteit t.o.v. Pellet I (\pm S.D.)	Procentuele ^{125}I -activiteit t.o.v. pellet II (\pm S.D.)	Procentuele ^{125}I -activiteit t.o.v. pellet III (\pm S.D.)
Pellet I	89 \pm 7			
Supernatant I	11 \pm 6			
Pellet II		89 \pm 4		
Supernatant II		11 \pm 4		
Pellet III			97 \pm 1	
Supernatant III			3 \pm 1	
Pellet IV				99

\pm S.D. = standaarddeviatie

^{125}I -transferrine bevindt zich in een fractie die vlak achter de void volume fractie van de Sepharose G-150 kolom elueert. Door pellet IV in SDS op te lossen, blijkt een gedeelte van het transferrine van de receptor af te splitsen. Herchromatografie van de void volume fracties over Sephadex G-150 resulteerde in een fractie waarin zich geen vrij transferrine meer bevond. Deze fractie werd geconcentreerd en daarna gechromatografeerd over Sepharose-6B, hetgeen resulteerde in het in fig. 3a weergegeven studiediagram.

De fracties 18 t/m 26 uit fig. 3b werden, na verzameld en geconcentreerd te zijn, gefiltreerd over Sephadex G-150, waarbij de eiwitfractie en ^{125}I -activiteitsfractie weer vlak achter de void volume fracties van de kolom elueerden (fig. 3c). Het tegen de receptorfractie B_2 gerichte antilichaam (anti- B_2), waaruit het antitransferrine deel was verwijderd (zie hoofdstuk VII, methoden) reageerde het sterkst met component II uit fig. 3. Mede gezien de verdeling van ^{125}I -transferrine in het elutediagram (fig. 3a) concludeerden wij dat de transferrine-receptor zich in de fracties, die component II vormen, bevindt.

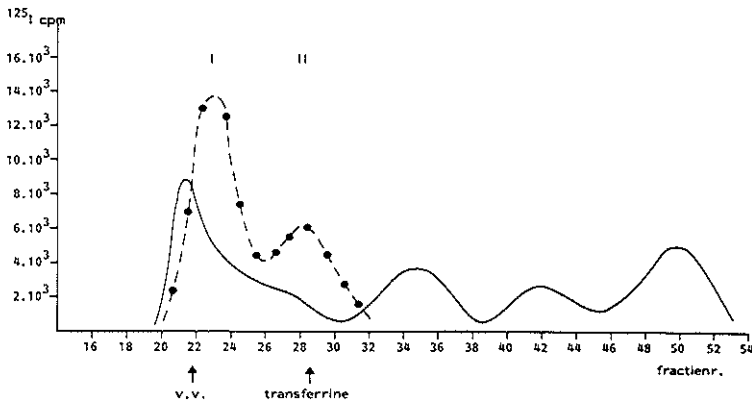


Fig. 2 Gel-filtratie van opgeloste pellet IV op Sephadex G-150.

— E_{254} nm ●—●—● ^{125}I .

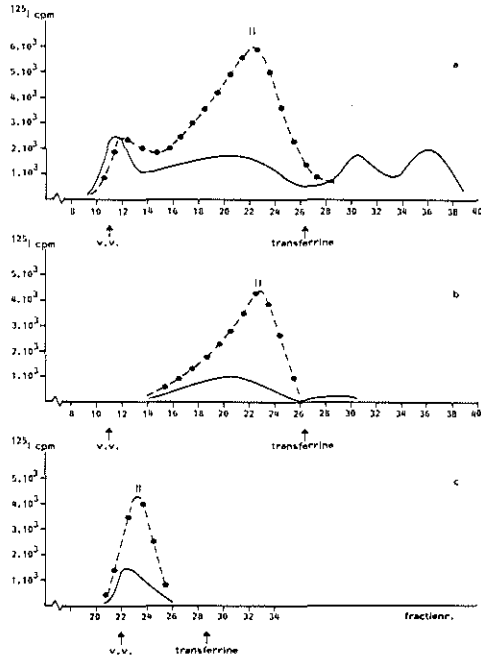


Fig. 3 a. Chromatografie van de void volume fracties van Sephadex G-150 op Sepharose 6B.
 b. Herchromatografie van de fracties 15 t/m 26 uit fig. 3a op Sepharose 6B.;
 c. Gelfiltratie van de fracties 18 t/m 26 uit fig. 3b op Sephadex G-150.;

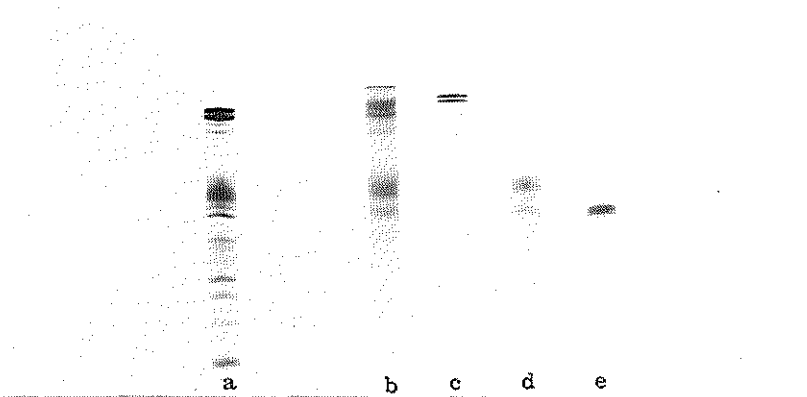


Fig. 4 Polyacrylamide gel elektroforese van de verschillende bij chromatografie verkregen fracties.
 a) gehele ghostsuspensie;
 b) void volume fracties Sephadex G-150; (fig. 2)
 c) void volume fracties Sepharose 6B (I fig. 3a)
 d) receptorfracties Sepharose 6B (II fig. 3a)
 e) transferrine.

In fig. 4 zijn de resultaten van de polyacrylamide gel elektroforeses met de verschillende bij chromatografie over Sephadex G-150 en Sepharose-6B verkregen fracties, weergegeven. Fig. 4d vertoont de resultaten van de polyacrylamide gel elektroforese met de transferrine-receptorfractie (II-piek, fig. 3).

Evenals bij de uit één experiment bereide B₂-component (paragraaf 1) blijkt ook bij de nu beschreven isolatieprocedure van het transferrine-receptorcomplex dat de concentratie van transferrine en het receptoreiwit uit één experiment te laag is om deze eiwitten op de gel zichtbaar te maken. Wel worden twee andere eiwitten zichtbaar die met het receptoreiwit worden meegeïsoleerd en op grond van de R_f-waarden polypeptide 3 (M = 95.000) en het hiermee verbonden polypeptide 4.2 representeren.

Concluderend kunnen wij op grond van bovenstaande experimenten stellen dat de transferrine-receptor op de rattenreticulocytenmembraan deel uitmaakt van, óf de intrinsieke minor polypeptiden, óf de glycoproteïnen, terwijl ook de mogelijkheid dat het major polypeptide 3 een rol speelt bij de transferrine-receptor niet volledig is uitgesloten.

2b. *Isolatie glycoproteïnen*

De resultaten in figuur 5 laten zien dat met de gevolgde methode drie uit de literatuur bekende sialoglycoproteïnebanden uit de humane reticulocytenmembraan geïsoleerd kunnen worden. Met reticulocyten-rijk rattenbloed werd een iets ander resultaat verkregen: de polyacrylamide gel elektroforese verricht op de geconcentreerde waterige fase, die werd verkregen na de chloroform/methanol extractie van de membraansuspensie, liet twee PAS-positieve eiwitbanden zien (fig. 5b).



Fig. 5 Polyacrylamide gel elektroforese van de geïsoleerde sialoglycoproteïnen.
a) humane crytrocysten;
b) ratten reticulocyten.

De plasmamembraan van rattenreticulocyt/erytrocyt bevat waarschijnlijk twee in plaats van drie met chloroform/methanol te extraheren sialoglycoproteïnen. De verdeling van ^{125}I -transferrine over de waterige, de tussen- en de organische fasen na de chloroform/methanol extractie van een met ^{125}I -transferrine gemerkte ghostsuspensie is weergegeven in tabel IV. Uit de resultaten blijkt dat het meeste van de aan de membraan gebonden transferrine zich in de tussen-fase bevindt.

Tabel IV. — De verdeling van de ^{125}I -activiteit over de waterige, tussen- en organische fasen na extractie van een met ^{125}I -transferrine gemerkte ghostsuspensie met chloroform/methanol

	^{125}I -percentage van het totaal (\pm S.D.)
Waterige fase	5 \pm 4
Tussenfase	93 \pm 5
Organische fase	2 \pm 1

De gelfiltratie van deze in SDS opgeloste tussenfase over Sephadex G-150 resulteerde in een elutiepatroon, zoals weergegeven in figuur 6. Een groot deel van het in de tussenfase aanwezige transferrine elueerde als complex vlak na het void volume van de Sephadex G-150 kolom, hetgeen aantoont dat ^{125}I -transferrine aan de membraan gebonden blijft tijdens de isolatie van de glycoproteïnen. Evenals bij het experiment uit paragraaf 2a bleek een deel van het transferrine tijdens het oplossen van de tussenfase zich in SDS van de receptor af te splitsen en als vrij transferrine van de kolom te elueren. Na herchromatografie van de void volume fracties op Sephadex G-150 werd een zuivere fractie verkregen, waarin zich geen vrij transferrine meer bevond. Deze fractie werd gechromatografeerd over Sepharose-6B, hetgeen resulteerde in het in figuur 7

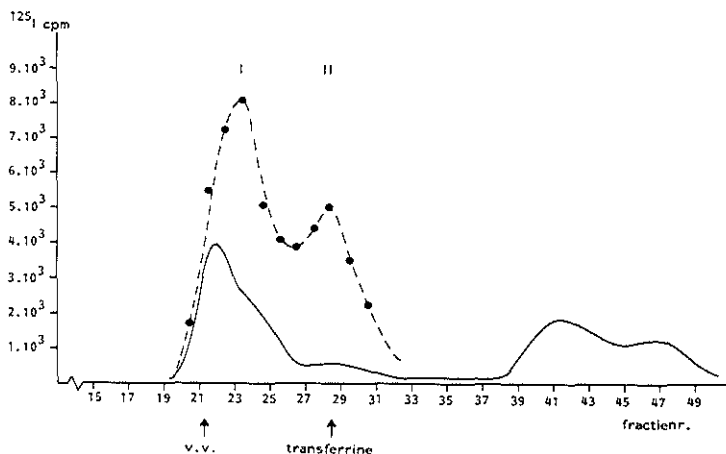


Fig. 6 Gelfiltratie van de opgeloste tussenfase (zie tabel IV) op Sephadex G-150.
 ————— E₂₅₄ nm ●—●—●—● 125I.

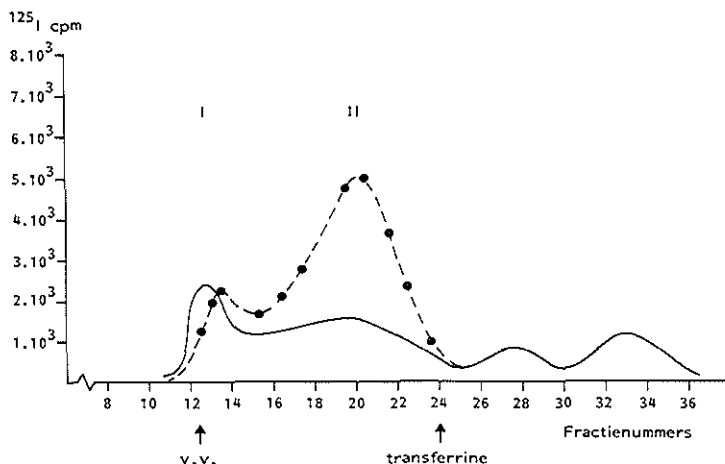


Fig. 7 Chromatografie van de void volume fracties van Sephadex G-150 op Sepharose 6B.:
 ————— $E_{254\text{ nm}}$ ●—●—● ^{125}I .

weergegeven elutediagram. Indien de fracties, die component II (fig. 7), vormen opnieuw over Sephadex G-150 werden gechromatografeerd, elueerde meer dan 80% van het ^{125}I -transferrine weer vlak na het void volume van de kolom. Het tegen de receptorfractie B_2 gerichte antilichaam (anti- B_2), waaruit het anti-transferrinemateriaal was verwijderd (zie hoofdstuk VII), reageerde het sterkst met component II uit figuur 7. Mede gezien de verdeling van ^{125}I -transferrine in het elutediagram (fig. 7) werd geconcludeerd dat de transferrine-receptor zich in de fracties, die component II vormen, bevindt.

Met de verschillende, bij chromatografie over Sephadex G-150 en Sepharose 6B, verkregen fracties werden polyacrylamide gel elektroforese verricht, waarbij evenals in paragraaf 2a bleek dat uitgaande van een incubatie-experiment met circa $5 \cdot 10^7$ reticulocyten geen eiwitten met een molecuulmassa van $70 \cdot 10^3$ of $80 \cdot 10^3$ zichtbaar zijn, terwijl de kleuring op eiwit ook geen transferrineband laat zien. Dit bevestigt het in de paragrafen 1 en 2a geconstateerde feit dat de concentraties van de transferrine en het receptoreiwit geïsoleerd uit één experiment ($1 \cdot 5 \cdot 10^7$ reticulocyten) te laag zijn om deze eiwitten op de gel zichtbaar te maken. Wel bleken polypeptide 3 en 4.2 weer met de receptor mee te worden geïsoleerd.

Concluderend kunnen wij op grond van deze experimenten en de experimenten uit paragraaf 1, 2a en 2b stellen dat de transferrine-receptor op de ratten-reticulocytenmembraan zeer waarschijnlijk gevormd wordt door een intrinsiek minor polypeptide. Mede gezien de resultaten van de polyacrylamide gel elektroforeses kan echter ook na deze experimenten nog niet met zekerheid worden uitgesloten dat major polypeptide 3 een rol speelt bij de vorming van de transferrine-receptor.

- 2c) *Isolatie van polypeptide 3 uit een met ^{125}I -transferrine gemerkte ghostsuspensie*
 Het is bekend dat de major membraan polypeptiden 4.2 en 6 in de celmembraan verbonden zijn met polypeptide 3 en onder bepaalde omstandigheden

met polypeptide 3 worden meegeïsoleerd. Gezien de resultaten van paragraaf 2a en 2b zou ook de transferrine-receptor met polypeptide 3 verbonden kunnen zijn. Om deze mogelijkheid te onderzoeken werd polypeptide 3 in zuivere vorm geïsoleerd, gebruik makend van de perturbierende stof, DMMA.

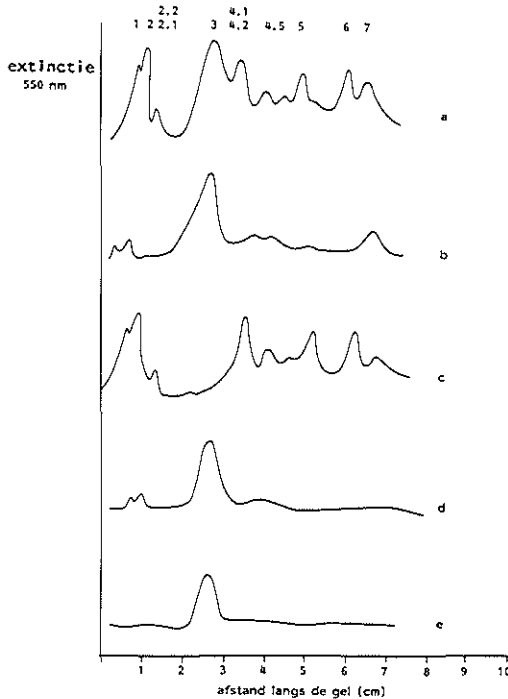


Fig. 8 Scandigram van polyacrylamide gels geëlektroforeerd met de verschillende, bij de isolatie van polypeptide 3 verkregen fracties.
a) gehele ghostsuspensie;
b) 27.000 g pellet;
c) 27.000 g supernatant;
d) 124.000 g supernatant;
e) 2e eluaat van thiol Sepharose kolom (piek II, schema II, blz. 86).

Fig. 8a toont een densitometrische opname (scandigram) van SDS polyacrylamide gel elektroforese van een gehele reticulocyten ghostsuspensie, waarbij de nummering volgens Fairbanks en Steck is gehanteerd.

Fig. 8b en 8c vertoont een dergelijk diagram van de pellet en het supernatant verkregen na de DMMA stap (zie Methodes en schema II). Bij de DMMA stap blijkt het merendeel van de polypeptiden uit de membraan verwijderd te worden met inbegrip van die polypeptiden welke aan polypeptide 3 gebonden zijn. Slechts een gering deel van de banden 1, 2, 4.5 en 7 blijven naast praktisch de gehele band 3 in de pellet aanwezig. Dit resultaat verschilt enigszins van de experimenten met humane erythrocyten, waarbij de banden 1, 2, 4.5 en 7 in een hogere concentratie in de pellet achterblijven (30).

De extractie van de met DMMA behandelde pellet met 0,5%-ige Triton X-100

resulteerde in een extract dat van de major polypeptiden bijna uitsluitend polypeptide 3 bevat (fig. 8d). Dit extract werd geëluëerd over een geactiveerde thiol Sepharose-4B kolom, hetgeen resulteerde in een scheiding tussen polypeptide 3 en de overige nog aanwezige membraaneiwitten. In de eerste piek elueren de eiwitten van de kolom die geen thiolgroepen bevatten.

Een SDS polyacrylamide gel elektroforese van de 2e piek liet met een Coomassie brilliant Blue-G250 kleuring slechts 1 eiwitband zien, polypeptide 3 (fig. 8e). Indien de 2e piek na elutie van de kolom één nacht bij 4°C bewaard werd, bleek er een aggregatie van polypeptide 3 op te treden; dit fenomeen werd ook door Yu en Steck waargenomen (32).

De verdeling van de ^{125}I -activiteit over de verschillende fracties die, bij de isolatie van polypeptide 3 uit een met ^{125}I -transferrine geïncubeerde reticulocytensuspensie worden verkregen, is weergegeven in schema II. Uit de resultaten in dit schema blijkt dat de behandeling van de ghostsuspensie met DMMA circa 31% van ^{125}I van ghostsuspensie afsplitst en aanwezig is in de 27.000 g supernatant. Incubatie van een deel van de supernatant met antitransferrine resulteerde in een precipitatie van 98% van de aanwezige ^{125}I -activiteit, hetgeen erop wijst dat DMMA ^{125}I niet van transferrine heeft afgesplitst (zie blz. 86).

Chromatografie van een ander deel van de 27.000 g supernatant over Sephadex G-150 resulteerde in een elutie van 93% van de ^{125}I -activiteit op de transferrineplaats in het elutievolume, hetgeen inhoudt dat DMMA zuiver transferrine van de ghostsuspensie verwijdert. Uit het schema blijkt verder dat de na de DMMA behandeling verkregen 27.000 g pellet, die polypeptide 3 bevat, bij verdere zuiveringsstappen bijna geen ^{125}I -activiteit meer verliest. Tevens blijkt dat zuiver polypeptide 3 geen ^{125}I -transferrine bevat; meer dan 95% van de op de thiol Sepharose-4B kolom gebrachte ^{125}I -activiteit elueerde met eiwitten, die geen reactie met de geactiveerde thiol Sepharose aangingen, van de kolom. Bij chromatografie van deze eiwitten (piek I uit schema II) over Sephadex G-150 elueerde meer dan 80% van de ^{125}I -transferrine direct na het void volume van de kolom, hetgeen inhoudt dat dit transferrine gebonden was aan een ander eiwit.

Discussie

In dit hoofdstuk is getracht de transferrine-receptor op de rattenreticulocytenmembraan nader te karakteriseren en te localiseren. Aangezien in hoofdstuk VII was aangetoond dat een van de reticulocytenmembranen geïsoleerd transferrine-eiwit complex, B_2 , functioneel van belang was bij de binding van transferrine aan en de opname van ijzer in de reticulocyt, werd getracht de receptor nader te karakteriseren, o.a. de molecuulmassa vast te stellen met behulp van polyacrylamide gel elektroforese. Dit resulteerde in twee eiwitten met een relatieve molecuulmassa van $70 \cdot 10^3$ en $80 \cdot 10^3$, waarvan er één als transferrine-receptor fungeert.

Op grond van de resultaten van de immunofluorescentie studies aan reticulocyten werd in hoofdstuk VI geconcludeerd dat de receptor voor transferrine waarschijnlijk aan de buitenzijde van de plasmamembraan gelocaliseerd is. Met behulp van

het selectief oplossen van de membraaneiwitten werd getracht het aan de buitenzijde van de membraan gelegen eiwit nader te localiseren.

Door membranen in een milieu met geringe ionsterkte te brengen, waarin zich tevens β -mercaptoethanol en EDTA bevinden, worden selectief de polypeptiden 1, 2 en 5 (tesamen spectrine vormend) voor een groot deel verwijderd. Indien de membranen vervolgens in een milieu met grotere ionsterkte worden gebracht, worden polypeptide 6 en ander zgn. perifere eiwitten uit de celmembraan verwijderd. De verwijdering van de polypeptiden 1, 2, 5 en 6, alsmede van de perifere eiwitten uit de celmembraan, resulteerde in een membraanresidu waarin zich meer dan 85% van de oorspronkelijke aanwezige hoeveelheid ^{125}I -transferrine bevond. Genoemde eiwitten zijn waarschijnlijk dan ook geen direct onderdeel van de transferrine-receptor.

Gezien het feit dat het verwijderen van praktisch alle membraanlipiden niet gepaard ging met een verlies van ^{125}I -transferrine uit de celmembraan, lijken ook proteolipide complexen en glycolipiden geen directe rol te spelen bij de samenstelling van de transferrine-receptor.

Gezien de resterende ^{125}I -transferrine-activiteit in het membraanresidu, dat voornamelijk uit de major polypeptiden 3, 4.2, 7, de sialoglycoproteïnen en de intrinsieke minor polypeptiden bestaat, werd geconcludeerd dat de transferrine-receptor deel moest uitmaken van een dezer eiwitgroepen.

Omdat de sialoglycoproteïnen in de erythrocytenmembraan verschillende receptorfuncties vervullen, werd vervolgens nagegaan of de transferrine-receptor deel zou uitmaken van deze sialoglycoproteïnen. Uit de experimenten bleek dat 2 sialoglycoproteïnen uit de membraan van de rattenreticulocyt geïsoleerd konden worden. De sialoglycoproteïnen bevatten echter niet de receptoren voor transferrine, daar na isolatie ^{125}I -transferrine aan de resterende membraaneiwitten gebonden blijft.

Deze resultaten impliceerden dat alleen de intrinsieke minor polypeptiden of major polypeptide 3 nog als transferrine-receptor in aanmerking komen.

Op grond van de relatieve molecuulmassa van de vermoedelijke transferrine-receptor ($M_r \sim 70\text{-}80 \cdot 10^3$) lijkt het onwaarschijnlijk dat de transferrine-receptor gevormd wordt door polypeptide 3 ($M_r = 95 \cdot 10^3$) zelf. Light, die op grond van de resultaten van zijn experimenten het bestaan van polypeptide 3 in de voorstadia van de reticulocyt in twijfel trekt, toonde bovendien aan dat antilichamen tegen polypeptide 3 geen invloed hadden op de transferrinebinding aan en de ijzeropname in de reticulocyt (33, 34).

Light toonde tevens aan dat *in vitro* in Triton X-100 de transferrine-receptor zich kan binden aan polypeptide 3. Anderen hebben echter de aanwezigheid van polypeptide 3 in de membraan van voorlopers van de reticulocyt wel aannemelijk gemaakt (35, 36). Mede gezien de resultaten van het selectief oplossen van de membraan, waarbij met de receptorfracties tevens polypeptide 3 werd geïsoleerd en het feit dat de membraanpolypeptide 4.2 en 6 in de intacte celmembraan aan polypeptide 3 gebonden zijn, werd nagegaan of de transferrine-receptor mogelijk ook in de intacte membraan aan polypeptide 3 gebonden was.

Bij de isolatie van dit polypeptide 3 werd gebruik gemaakt van een pertuberende stof (DMMA), die eiwitten uit de celmembraan verwijdert, die niet hydrofoob gebonden zijn met de lipidenlaag, dus ook die aan polypeptide 3 gebonden zijn (van de major membraaneiwitten werden o.a. verwijderd polypeptide 1, 2, 2.1, 2.2, 2.3, 4,

4.2, 5 en 6). Hoewel bij de behandeling met de perturberende stof wel 31% van de oorspronkelijk aanwezige hoeveelheid ^{125}I -transferrine uit de membraan werd verwijderd, lijkt de transferrine-receptor niet tot de groep van eiwitten te behoren die door perturberende stoffen uit de membraan kunnen worden verwijderd, omdat het verwijderde transferrine niet gebonden bleek aan een membraaneiwit. Waarschijnlijk werkt de perturberende stof direct in op de binding tussen receptor en transferrine en splitst het een deel van dit transferrine van zijn receptor af. De nog aan de residu membraaneiwitten gebonden ^{125}I -transferrine werd verwijderd na inwerking van Triton X-100 op het membraanresidu waarbij de hydrofobe binding van het eiwit door micelvorming werd verbroken. Na chromatografie over de thiol Sepharose-4B kolom bleek echter dat dit ^{125}I -transferrine aan een ander membraaneiwit dan polypeptide 3 is gebonden.

De beschreven resultaten tonen bovendien aan dat men na identificering van een membraaneiwit als transferrine-receptor de functionele rol van dit geïsoleerde eiwit in het ijzeropnameproces door intacte cellen dient na te gaan, zoals voor de B_2 -component is verricht (hoofdstuk VII).

Concluderend kan gesteld worden dat de transferrine-receptor op de celmembraan van de rattenreticulocyt gelocaliseerd is op één van de minor polypeptiden en een relatieve molecuulmassa heeft van circa $70 \cdot 10^3$ - $80 \cdot 10^3$. Dit minor polypeptide is ten dele gelocaliseerd aan de buitenzijde van de celmembraan, het behoort niet tot de sialoglycoproteïnen en is een intrinsiek membraaneiwit dat een hydrofobe binding heeft met de lipiden dubbellaag van de celmembraan.

Literatuur

1. STECK, T.L. (1974). The organization of proteins in the human blood cell membrane. *J. Cell Biol.* **62**, 1-19.
2. STRYER, L. (1981). Introduction to biological membranes. In: *Biochemistry*, Chapter 10, pp. 205-231.
3. FAIRBANKS, G., STECK, T.L. and WALLACH, D.F.H. (1971). Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* **10**, 2606-2617.
4. TILLACK, T.W.S.L., MARCHESI, V.T. and STEERS, E. (1970). A comparative study of spectrin: a protein isolated from red blood cell membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **200**, 125-131.
5. CARRAWAY, K.L. and KOBYLKA, D. (1970). Comparative studies of erythrocyte membranes by gel electrophoresis. *Biochim. Biophys. Acta* **219**, 238-241.
6. LENARD, J. (1970). Protein components of erythrocyte membranes from different animal species. *Biochemistry* **9**, 5037-5040.
7. KOBYLKA, D., KHETTRY, A., SHIN, B.C. and CARRAWAY, K.L. (1972). Proteins and glycoproteins of the erythrocyte membrane. *Archiv. Biochem. Biophys.* **148**, 475-487.
8. HAMAGUCHI, H. and CLEVE, H. (1972). Solubilization and comparative analysis of mammalian erythrocyte membrane glycoproteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **47**, 459-464.
9. HAMAGUCHI, H. and CLEVE, H. (1972). Isolation of the glycoproteins from erythrocyte membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **406**, 206-213.
10. FUJITA, S. and CLEVE, H. (1975). Isolation and partial characterization of two minor glycoproteins from human erythrocyte membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **382**, 172-180.
11. WINZLER, R.J. (1969). A glycoprotein in human erythrocyte membranes. In: *Red Cell Membranes*. Ed.: G.A. Jamieson and T.J. Greenwalt, p. 157-171.
12. MARCHESI, V.T. and ANDREWS, E.P. (1971). Glycoproteins: isolation from cell mem-

- branes with lithium didosalicylate. *Science* 174, 1247-1248.
13. STECK, T.L. (1974). Preparation of impermeable inside-out and right-side-out vesicles. In: *Methods in Membrane Biology* Vol. 2, Ed.: E. Korn, p. 245-282.
 14. KANT, J.A. and STECK, T.L. (1972). Cation-impermeable inside-out and right-side-out vesicles from human erythrocyte membranes. *Nat. New Biol.* 240, 26-32.
 15. STECK, T.L. and KANT, J.A. (1974). Preparation of impermeable ghosts and inside-out vesicles from human erythrocyte membranes. *Methods Enzymol.* 31, 172-180.
 16. MARCHESI, V.T. and PALADE, G.E. (1967). The localization of Mg-Na-K activated adenosinetriphosphatase activity on red cell ghost membrane. *J. Cell Biol.* 35, 385-404.
 17. NICHOLSON, G.L., MARCHESI, V.T. and SINGER, S.J. (1971). The localization of spectrin on the inner surface of human red blood cell membranes by ferritin-conjugated antibodies. *J. Cell Biol.* 51, 265-272.
 18. NICHOLSON, G.L. and SINGER, S.J. (1974). The distribution and asymmetry of mammalian cell surface saccharides utilizing ferritin-conjugated plant agglutinins as specific saccharide strains. *J. Cell Biol.* 60, 236-248.
 19. SINGER, S.J. and NICHOLSON, G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 723-731.
 20. ROSENBERG, S.A. and GUIDOTTI, G. (1968). The protein of human erythrocyte membranes. *J. Biol. Chem.* 243, 1985-1992.
 21. ROSENBERG, S.A. and GUIDOTTI, G. (1969). Fractionation of the protein components of human erythrocyte membranes. *J. Biol. Chem.* 244, 5118-5124.
 22. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDAL, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-278.
 23. CHEN, P.S., TORIBARA, T.Y. and WARNER, H. (1956). Microdetermination of phosphorus. *Anal. Chemistry* 28, 1756-1759.
 24. ABELL, L.L., LEVY, B.B., BRODIE, B.B. and KENDALL, F.E. (1952). A simplified method for the estimation of total cholesterol in serum. *J. Biol. Chem.* 195, 357-365.
 25. DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A. and SMITH, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350-356.
 26. WARREN, L. (1959). The thiobarbituric acid assay of sialic acids. *J. Biol. Chem.* 234, 1971-1981.
 27. BOAS, N.F. (1953). Method for the determination of hexosamines in tissues. *J. Biol. Chem.* 204, 553-563.
 28. RUITENBEEK, W. (1978). The fatty acid composition of various lipid fractions isolated from erythrocytes and blood plasma of patients with Duchenne and congenital myotonic muscular dystrophy. *Clin. Chem. Acta* 89, 99-110.
 29. BJERVE, K.S., DAAE, L.N.W. and BREMER, J. (1974). The selective loss of lysophospholipids in some commonly used lipid extraction procedures. *Anal. Biochem.* 58, 238-245.
 30. KAHLENBERG, A. (1976). Preparative isolation of band 3, the predominant polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Anal. Biochem.* 74, 337-342.
 31. HOLLOWAY, P.W. (1973). A simple procedure for removal of Triton X-100 from protein samples. *Anal. Biochem.* 53, 304-308.
 32. YU, J. and STECK, T.L. (1975). Isolation and characterization of band 3, the predominant polypeptide of the human erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.* 250, 9170-9175.
 33. LIGHT, N.D. (1977). The isolation and partial characterization of transferrin binding components of the rabbit reticulocyte plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 495, 46-57.
 34. LIGHT, N.D. (1978). Further studies on the rabbit erythroid cell plasma membrane transferrin receptor. *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 81, 261-267.
 35. LODISH, H.F. (1973). Synthesis of reticulocyte membrane proteins by membrane-free polyribosomes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70, 1526-1530.
 36. LODISCH, H.F. and SMALL, B. (1975). Membrane proteins synthesized by rabbit reticulocytes. *J. Cell. Biol.* 65, 51-64.

HOOFDSTUK IX

Over de invloed van de bereidingswijze en zuivering van de ghosts op de ijzer-bevattende componenten in de ghostsuspensie

Inleiding

Na binding van transferrine aan de receptor op de plasmamembraan is het verdere verloop van het ijzeropnameproces in de reticulocyten nog niet duidelijk. Zoals al eerder gesteld is, vormt de vraag of transferrine wel of niet in het intracellulaire compartiment wordt opgenomen één van de belangrijkste onbekende aspecten van dit proces. De hypothese dat, na de binding aan de receptor, transferrine door pinocytose naar het intracellulaire compartiment wordt vervoerd, wordt door een aantal onderzoekers gesteund (1, 2, 3, 4, 5). Echter, het oorspronkelijke idee dat ijzer reeds van transferrine wordt verwijderd op de receptorplaats en wordt afgegeven aan membraaneiwitten is daarmee niet verworpen (6, 7, 8, 9).

Deze laatste hypothese is gedeeltelijk gebaseerd op het feit dat de $^{59}\text{Fe}/^{125}\text{I}$ -verhouding van een geïsoleerde ghostsuspensie of membraanreceptoren, beide bereid uit, met $^{59}\text{Fe}/^{125}\text{I}$ -gemarkt transferrine, geïncubeerde reticulocyten, is toegenomen ten opzichte van de $^{59}\text{Fe}/^{125}\text{I}$ -ratio van het oorspronkelijke transferrine (6, 7, 8, 10). Bovendien werden bij gelfiltratie van de opgeloste ghostsuspensies van humane en rattenreticulocyten over Sepharose-2B en Sepharose-6B twee componenten, A en B_1 , verkregen welke uitsluitend ^{59}Fe -activiteit bevatten (zie hoofdstuk VI, fig. 1 en 2). Recent zijn deze bevindingen gedeeltelijk bevestigd door Glass et al. (11). De componenten A en B_1 werden beschouwd als membraancomponenten, welke als intermediairen in het ijzertransport tussen transferrine, gebonden aan de receptor en cytoplasmatische ijzercomponenten, zouden kunnen functioneren.

Echter, aangezien de volgens Dodge geïsoleerde ghostsuspensie gecontamineerd kan zijn met mitochondriën en lysosomen, is het mogelijk dat de componenten A en B_1 ijzer-bevattende mitochondriale en/of lysosomale bestanddelen vertegenwoordigen. In dit hoofdstuk wordt de invloed van de verwijdering van intracellulaire bestanddelen uit de ghost op de componenten A en B_1 van de ghostsuspensie beschreven.

Materiaal en Methoden

Voor de bereiding van rattenreticulocyten en van met ^{125}I en ^{59}Fe gemerkt ratten-transferrine, alsmede voor de incubatieprocedure tussen reticulocyten en transferrine wordt verwezen naar de in hoofdstuk II beschreven methode.

Zuivering van de ghostsuspensie

Een reticulocyten ghostsuspensie werd bereid op de in hoofdstuk II beschreven wijze. De verkregen ghostsuspensie werd gezuiverd met behulp van een, door Lodish en Small beschreven, sucrose gradient centrifugatie (12). Hiertoe werd een discontinue sucrose gradient bereid door 6 ml van een 60%-ige sucrose-oplossing (w/v) te brengen in centrifugeerbuisen, welke passen in een Beckman SW 27 rotor. Op de 60%-ige sucrose-oplossing werden achtereenvolgens de volgende sucrose-oplossingen gebracht: 6 ml 50%-ige, 6 ml 45%-ige, 6 ml 40%-ige en 6 ml 30%-ige. Alle oplossingen werden bereid in 5 milimolair PBS van pH 8,0. Vervolgens werd 0,3-0,4 ml van een geïsoleerde ghostsuspensie toegevoegd aan 7 ml van een 15%-ige sucrose-oplossing en goed gemengd. De verkregen suspensie werd op de discontinue gradient gebracht. De gradiënten werden vervolgens gedurende 18 uur bij 4°C gecentrifugeerd in een Beckman SW 27 rotor met een snelheid van 25.000 omwentelingen/ minuut.

De diverse sucroselagen, waarin zich zichtbare banden bevonden, werden geïsoleerd en tienmaal verdund met 5 milimolair PBS van pH 8,0. De aanwezige banden werden geprecipiteerd door de suspensies gedurende 1 uur te centrifugeren in een Beckman rotor 34 met een snelheid van 27.000 omwentelingen/ minuut en werden vervolgens geanalyseerd op de aanwezigheid van de volgende enzymen:

- | | | |
|---|---------------------------------|------|
| 1) acetylcholinesterase | — plasmamembraan gebonden enzym | (13) |
| 2) succinaat-cytochroom C-reductase | — mitochondriaal enzym | (14) |
| 3) succinaat dehydrogenase | — mitochondriaal enzym | (15) |
| 4) α -glycerofosfaat dehydrogenase | — mitochondriaal enzym | (15) |
| 5) zure fosfatase | — lysosomaal enzym | (16) |

De hoeveelheid eiwit werd bepaald met behulp van een gemodificeerde Lowry methode (17). De banden werden evenals de niet gezuiverde ghostsuspensie opgelost en gefractioneerd door gelfiltratie over Sepharose-2B en 6B kolommen zoals is beschreven in hoofdstuk VI.

De invloed van centrifugatiesnelheid op de samenstelling van de ghostsuspensie

Een met transferrine geïncubeerde reticulocyten suspensie werd in drie delen gesplitst, waarna de cellen op de gebruikelijke wijze werden gelyseerd met 20 milimolair PBS van pH 7,4, zoals beschreven is in hoofdstuk II. Voor de bereiding van de gebruikelijke ghostsuspensie werd de gelyseerde celsuspensie bij 20.000 g gecentrifugeerd. De twee andere gelyseerde celsuspensies werden bij respectievelijk 500 g en 10.000 g gecentrifugeerd.

Bij de 10.000 g en 20.000 g ghostsuspensie werd veel zorg besteed aan het verwijderen van een kleine groen/bruine pellet, die zich bij deze centrifugatiesnelheden op de bodem van de centrifugatiebuisen bevindt onder de eveneens geprecipiteerde ghostsuspensie.

De van deze groen/bruine pellet ontdane ghostsuspensies werden voor de gelfiltratie-experimenten gebruikt. De bij 500, 10.000 en 20.000 g verkregen ghostsuspensies, alsmede de kleine groen/bruine pellet werden geanalyseerd op de aan-

wezigheid van

- 1) acetylcholinesterase — plasmamembraan gebonden enzym
- 2) succinaat-cytochroom C-reductase — mitochondriaal enzym
- 3) zure fosfatase — lysosomaal enzym

De hoeveelheid eiwit werd volgens de methode van Lowry bepaald (18). Enzymactiviteiten werden als procenten weergegeven om het onderling vergelijken te vergemakkelijken. De weergegeven resultaten zijn de gemiddelden van 10 experimenten.

Extractie van heemijzer

De extractie van heemijzer uit de ghost werd verricht met behulp van de door Thunell beschreven methode (19).

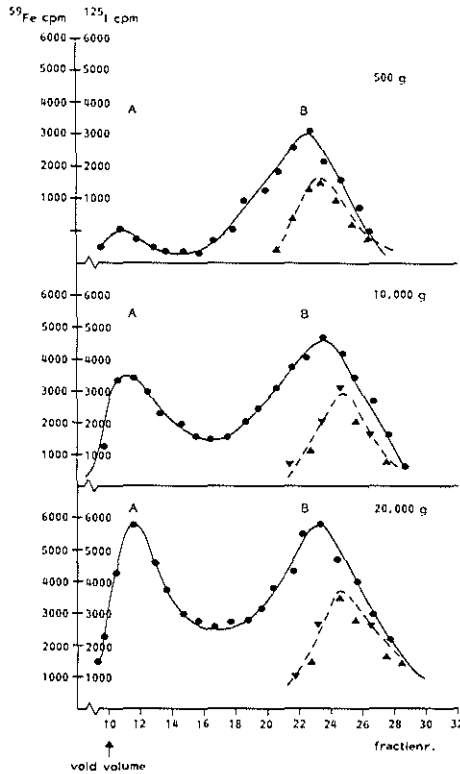


Fig. 1 Chromatografie van opgeloste reticulocyten ghosts op Sepharose-2B. De ghosts werden verkregen bij centrifugatiesnelheden van 500 g, 10.000 g en 20.000 g.

●—●—● ^{59}Fe ▲—▲—▲ ^{125}I .

Resultaten

De bij verschillende centrifugatiesnelheden verkregen ghostsuspensies

De bij centrifugatiesnelheden van 500, 10.000 en 20.000 g verkregen ghost-suspensies werden gefractioneerd door gelfiltratie over Sepharose-2B en -6B. De resultaten van deze experimenten zijn weergegeven in fig. 1 en 2. Uit de resultaten van fig. 1 blijkt dat de procentuele ^{59}Fe -activiteit van de eerste piek (A-component) toenam naarmate de ghostsuspensie bij een hogere centrifugatiesnelheid werd verkregen. De $^{59}\text{Fe}/^{125}\text{I}$ -verhouding van de B-component veranderde echter niet onder invloed van de centrifugatiesnelheid.

Fig. 2 vertoont de resultaten van de gelfiltratie van de B-component op Sepharose-6B, hetgeen resulteerde in drie reeds in hoofdstuk VI beschreven (fig. 2) componenten, B_1 , B_2 en B_3 . De resultaten uit fig. 2, gevoegd bij de gegevens uit tabel I en II, lijken de conclusie te rechtvaardigen dat de procentuele ^{59}Fe -activiteit van de B_1 -component en de $^{59}\text{Fe}/^{125}\text{I}$ -verhouding in de B_2 -component onafhankelijk zijn van de centrifugatiesnelheid, waarbij de ghostsuspensie bereid wordt. Slechts de ^{59}Fe -activiteit van de eerste fractie van de Sepharose-2B kolom, component A, werd beïnvloed

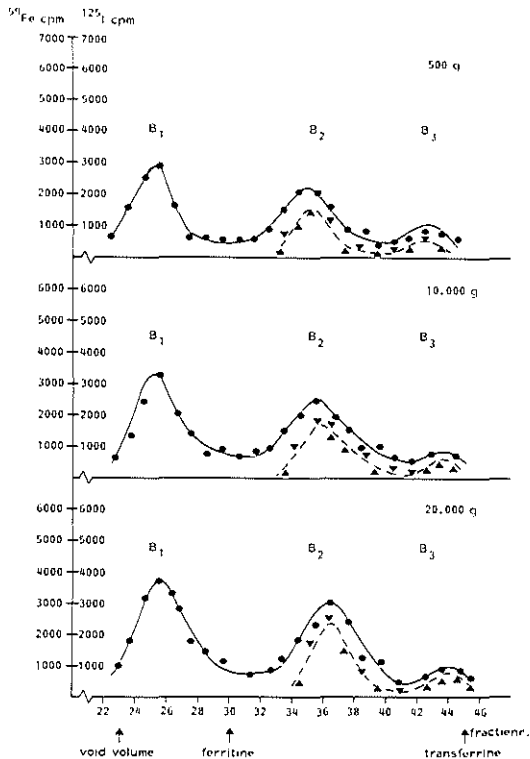


Fig. 2 Rechromatografie van de B-componenten van de Sepharose-2B kolom op een Sepharose-6B kolom.

●—●—● ^{59}Fe ▲—▲—▲ ^{125}I .

Tabel I. — De invloed van de centrifugatiesnelheid, waarbij de ghostsuspensie verkregen wordt op de ^{59}Fe en ^{125}I -verdeling in de via gelfiltratie over Sepharose-2B verkregen fracties

	Centrifugatiesnelheden		
	500 g	10.000 g	20.000 g
● Gemiddelde procentuele ^{59}Fe activiteit van de A-component t.o.v. de totale ^{59}Fe -recovery van de Sepharose-2B kolom	5%	13%	15%
* $^{59}\text{Fe}/^{125}\text{I}$ -verhouding van de B-component van de Sepharose-2B kolom	1.9	1.8	2.0
* Verhouding tussen de ^{59}Fe -activiteit van de A- en de B-component	0.1	0.6	0.7
● Gemiddelde van tien experimenten. Het verschil tussen 500 g en 10.000 g of 20.000 g is significant; het verschil tussen 10.000 g en 20.000 g is niet significant.			
* Resultaten van één experiment. Patroon van andere experimenten was identiek.			

Tabel II. — De resultaten van gelfiltratie van de 500, 10.000 en 20.000 g verkregen B-componenten van Sepharose-2B, op Sepharose-6B gescheiden

	Centrifugatiesnelheid		
	500 g	10.000 g	20.000 g
● Gemiddelde procentuele ^{59}Fe -activiteit van de vijf piekfracties van de B ₁ -component t.o.v. de totale ^{59}Fe -recovery van de Sepharose-6B kolom	30%	33%	32%
● Gemiddelde procentuele ^{59}Fe en ^{125}I -activiteit van de vijf piekfracties van de B ₂ -component t.o.v. de totale activiteitsrecovery van de Sepharose-6B kolom	^{59}Fe 29% ^{125}I 90%	30% 89%	30% 91%
●* $^{59}\text{Fe}/^{125}\text{I}$ -verhouding van de B ₂ -component van de Sepharose-6B kolom	1.1	1.2	1.1
●* Verhouding van de ^{59}Fe -activiteit van de B ₁ - en de B ₂ -component van de Sepharose-6B kolom	1.0	1.1	1.1
● Geen significante verschillen tussen 500, 10.000 en 20.000 g ghostsuspensies			
* Resultaten van één experiment. Patroon van andere experimenten identiek.			

door de centrifugatiesnelheid waarbij de ghostsuspensie bereid werd.

De verschillende ghostsuspensies (500-20.000 g) werden niet alleen geanalyseerd met behulp van gelfiltratie, maar werden eveneens gekarakteriseerd naar eiwitconcentratie en enzymactiviteit. De hoeveelheid eiwit in een bij 20.000 g verkregen ghostsuspensie werd op 100% gesteld en de andere ghostsuspensies werden met het 20.000 g preparaat vergeleken. Voor de verschillende enzymactiviteiten werd van

dezelfde procedure gebruik gemaakt.

Aangezien de bij 10.000 g en 20.000 g gesedimenteerde ghostsuspensies gescheiden kunnen worden in een harde groen/bruine pellet en een daarop liggende witte pellet, werden naast de enzymactiviteiten van de gehele pellet ook de enzymactiviteiten en eiwitconcentraties van de harde bruin/groene pellet en van de witte pellet afzonderlijk bepaald. De witte pellet wordt verder aangeduid als gedeeltelijk gezuiverde membraanfractie (g.g.m.f.). De resultaten van de enzym- en eiwitbepalingen zijn weergegeven in tabel III.

TABEL III. — De gemiddelde procentuele enzymactiviteit en hoeveelheid eiwit van de bij de verschillende centrifugatiesnelheden verkregen ghostsuspensies. De resultaten worden weergegeven als percentages van de enzymactiviteit en van de hoeveelheid eiwit van de 20.000 g ghostsuspensie welke op 100% wordt gesteld.

	500 g	Centrifugatiesnelheden			
		*g.g.m.f.	10.000 g harde bruine pellet	20.000 g g.g.m.f.	20.000 g harde bruine pellet
Gemiddelde procentuele succinaat cytochroom C reductase activiteit	31	●24	96 76	100 ●28	72
Gemiddelde procentuele acetylcholinesterase activiteit	59	●90	100 10	100 ●88	12
Gemiddelde procentuele zure fosfatase activiteit	18	●53	46 47	100 ●59	41
Gemiddelde procentuele hoeveelheid eiwit	61	●86	100 14	100 ●80	20

* g.g.m.f. — gedeeltelijk gezuiverde membraanfractie (zie tekst)

● De procentuele verdeling van de enzymactiviteit en de hoeveelheid eiwit tussen de g.g.m.f. en de harde groen/bruine pellet t.o.v. de activiteit in de gehele pellet.

Tussen de 10.000 en 20.000 g ghostsuspensies kan nauwelijks enig verschil worden waargenomen. Zoals uit tabel III blijkt, bevat de bruin/groene pellet de meeste mitochondriale activiteit, de helft van de lysosomale activiteit, een laag percentage plasmamembraanactiviteit en een geringe hoeveelheid eiwit van de gehele bij 10.000 en 20.000 g geïsoleerde ghostsuspensies. Tevens blijkt dat de totale lysosomale enzymactiviteit in de 10.000 g ghostsuspensie significant lager is dan in de 20.000 g ghostsuspensie. Tabel III laat ook zien dat er wel een significant verschil bestaat tussen de enzymactiviteiten en eiwitconcentraties van de bij 500 g en 20.000 g (of 10.000 g) verkregen ghostsuspensies. Echter, de relatieve specifieke activiteit voor acetylcholinesterase blijft in de 500 g, 10.000 g en de 20.000 g ghostsuspensie gelijk.

Zuivering van de ghostsuspensies door sucrose gradient centrifugatie

Het is bekend dat centrifugatie van reticulocyten ghostsuspensies op een discontinue sucrose gradient kan resulteren in een fractie, die vooral de plasmamembranen representeert en in fracties, welke met name de mitochondriën en lysosomen bevatten (12).

Indien een erythrocyten ghostsuspensie over de discontinue sucrose gradient werd gecentrifugeerd, ontstond er één zichtbare band in de 1,14 g/ml sucroselaag. Deze band representeert de plasmamembraanfractie, hetgeen in overeenstemming is met het feit dat zich in deze band ook de meeste acetylcholinesterase-activiteit bevindt. Een klein gedeelte van de acetylcholinesterase-activiteit is aanwezig in de 1,18-1,20 g/ml sucroselaag, hetgeen mogelijk wordt veroorzaakt doordat tijdens het centrifugeren enige enzymactiviteit van de plasmamembraan afgesplitst wordt (Tabel IV).

Tabel IV. — De verdeling van de gemiddelde procentuele enzymactiviteit en hoeveelheid eiwit in de verschillende sucroselagen na centrifugatie van erythrocyten ghosts op een discontinue sucrose gradient

	Centrifugatie-snelheid	Sucroselaag		
		40% (1,14 g/ml)	45% (1,16 g/ml)	50-60% (1,18/1,20 g/ml)
Eiwit	20.000 g	74	24	2
Acetylcholinesterase	20.000 g	76	12	12
Succinaat				
cytochroom C reductase	20.000 g	geen act.	geen act.	geen act.
Zure fosfatase	20.000 g	geen act.	geen act.	geen act.

Indien een reticulocyten ghostsuspensie op de sucrose gradient werd gecentrifugeerd, resulteerde dit in drie opalescente banden, een witte opalescente band in de 1,14 g/ml laag en twee geelbruine banden, respectievelijk in de 1,18 g/ml en in de 1,20 g/ml lagen. Soms vielen de laatste twee banden samen; indien zij gescheiden waren, werden zij na isolatie samengevoegd. De witte band in de 1,14 g/ml laag lijkt identiek aan de in deze laag verkregen band van de erythrocyten ghost en representeert de reticulocyten plasmamembraanfracties, aangezien de meeste acetylcholinesterase-activiteit zich ook in deze laag bevindt (tabel V).

Op grond van de geringe hoeveelheid succinaat cytochroom C reductase in deze laag is de contaminatie met mitochondriën in deze band zeer gering. Aangezien bijna alle mitochondriale activiteit in de samengevoegde 1,18 en 1,20 g/ml banden aanwezig is, bevatten deze banden de mitochondriën, waarmee de oorspronkelijk opgebrachte ghostsuspensie verontreinigd was (tabel V). Hoewel de oorspronkelijke reticulocyten ghostsuspensie met lysosomen gecontamineerd was, getuige de aanwezigheid van zure fosfatase-activiteit was de recovery van deze enzymactiviteit over de verschillende sucroselagen kleiner dan 50% en is een betrouwbare verdeling van deze enzymactiviteit over de verschillende sucroselagen niet te geven. Waarschijnlijk wordt de lage recovery veroorzaakt door het feit dat de lysosomale contaminatie in de

Tabel V. — De verdeling van de gemiddelde procentuele enzymactiviteit en hoeveelheid eiwit in de verschillende sucroselagen na centrifugatie van de bij 500 en 20.000 g verkregen reticulocyten ghosts op een discontinue sucrose gradient.

	Centrifugatie- snelheid	Sucroselaag		
		40% (1,14 g/ml)	45% (1,16 g/ml)	50-60% (1,18/1,20 g/ml)
Eiwit	500 g	52	14	34
	20.000 g	48	12	40
Acetylcholinesterase	500 g	69	15	16
	20.000 g	68	18	14
Succinaat-	500 g	15	21	64
cytochroom C reductase	20.000 g	12	22	66
α -glycerofosfaat	500 g	14	12	76
dehydrogenase	20.000 g	11	14	75
Succinaat dehydrogenase	500 g	14	16	70
	20.000 g	12	20	68

totale ghostsuspensie al laag was.

Gelfiltratie van de gezuiverde membraan- en mitochondriënfractie

Een van de geïncubeerde reticulocyten bereide 20.000 g ghostsuspensie werd in 2 delen gesplitst. Een deel werd opgelost en direct gefractioneerd door gelfiltratie over Sepharose-2B en -6B, zoals beschreven in hoofdstuk VI. Het andere deel werd gecentrifugeerd op een discontinue sucrose gradient; de verkregen plasmamembraanband en beide banden met mitochondriën werden verzameld, opgelost in Triton X-100 en tenslotte onderworpen aan gelfiltratie over Sepharose-2B en -6B. Eenzelfde experiment werd ook uitgevoerd met een 500 g ghostsuspensie. De resultaten van tien van deze experimenten zijn samengevat in de figuren 3-5, waarbij de gemiddelde waarden zijn weergegeven.

Indien de gezuiverde plasmamembranen (1,14 g/ml sucroselaag) aan de gelfiltratie over Sepharose-2B werden onderworpen was de ^{59}Fe -bevattende A-component bijna geheel uit het elutiepatroon verdwenen (fig. 3 en 4). De hoeveelheid ^{59}Fe in de fractie van de mitochondriale lagen (1,18 en 1,20 g/ml sucroselagen), die in het void volume van de Sepharose-2B kolom elueert (void volume component in onderste deel van fig. 3 en 4), vertoont een duidelijk verband met ^{59}Fe -activiteit van de A-component in de ongezuiverde ghostsuspensie. Het is dan ook waarschijnlijk dat de void volume piek van de mitochondriale laag overeenkomt met de A-component van de oorspronkelijke ghostsuspensie.

Het feit dat in de gezuiverde membraansuspensie de A-component niet meer voorkomt, gevoegd bij het feit dat in de experimenten met de verschillende centrifugatiesnelheden de procentuele ^{59}Fe -activiteit van de A-component afhankelijk was van de centrifugatiesnelheid bij gelijk blijvende relatieve specifieke activiteit van het plasmamembraan gebonden enzym acetylcholinesterase, toont aan dat de A-component van een niet-gezuiverde ghostsuspensie geen membraancomponent is. Deze A-component kan afkomstig zijn van de mitochondriën en lysosomen die de ghost-

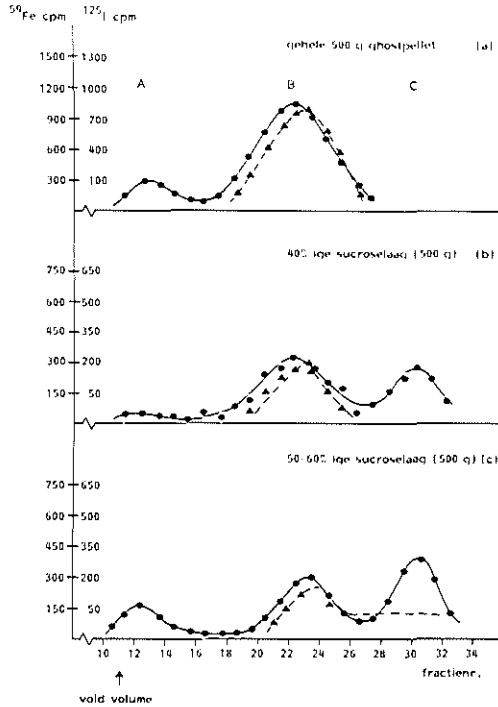


Fig. 3 Chromatografie op Sepharose-2B van 0,3 ml opgeloste, bij 500 g verkregen ghosts (a) en van de suspensies verkregen van de 40%-ige (1,14 g/ml) (b) en de 50/60%-ige (1,18-1,20 g/ml) (c) sucroselagen na centrifugatie van 0,3 ml van een 500 g ghostsuspensie op een discontinue sucrose gradient.

●—●—● ^{59}Fe ▲—▲—▲ ^{125}I

suspensie verontreinigen. Indien de sucroselagen met de contaminerende mitochondriën (1,18 g en 1,20 g/ml lagen) onderworpen werden aan gelfiltratie over Sepharose-2B, werden naast de void volume fractie nog twee radioactieve componenten verkregen. Zestig procent van de ^{59}Fe -activiteit van de laatste radioactieve component, C, blijkt aanwezig als heemijzer, hetgeen waarschijnlijk van de mitochondriën afkomstig is (fig. 3c en 4c). De tweede radioactieve component, B, in deze mitochondriale laag (fig. 3c en 4c) bevat transferrine, hetgeen met behulp van immunoprecipitatie werd aangetoond. Mogelijk is dit transferrine specifiek gebonden aan een intracellulaire component (b.v. aan mitochondriënmembraan), echter het in deze laag aanwezige transferrine kan ook een contaminatie zijn, daar er tijdens de centrifugatieprocedure van de ghosts op de sucrose gradient zich wat transferrine van de receptor op de plasmamembraan (1,14 g/ml laag) afsplitst en vrij transferrine na centrifugatie in evenwicht is met de 1,18-1,20 g/ml sucroselagen.

Uit de resultaten van fig. 5 blijkt dat de actuele ^{59}Fe -activiteit in de B₁-componenten van de ongezuiverde en gezuiverde ghostsuspensie praktisch gelijk zijn (de geringe vermindering van ^{59}Fe -activiteit wordt verklaard door verlies van materiaal ten gevolge van de sucrose gradient centrifugatie). De resultaten in tabel VI laten zien dat bij de gezuiverde ghostsuspensies de procentuele verdeling van ^{59}Fe na gelfiltratie

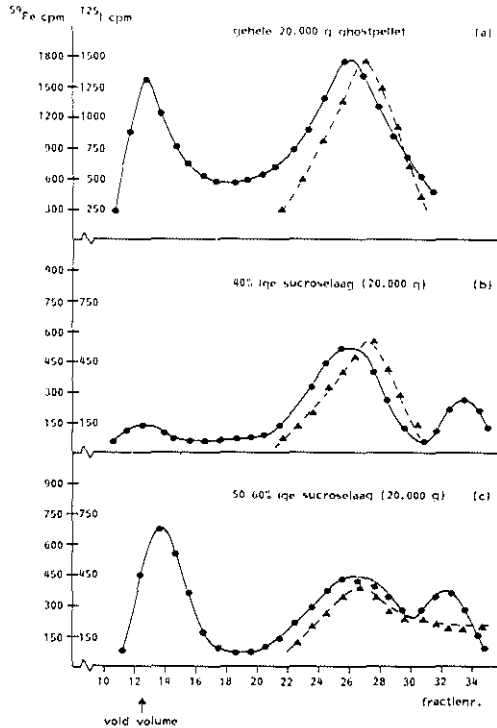


Fig. 4 Chromatografie op Sepharose-2B van 0,3 ml opgeloste bij 20.000 g verkregen ghosts (a) en van de suspensies verkregen van de 40%-ge (1.14 g/ml) (b) en van de 50/60%-ige (1.18-1.20 g/ml) sucrorelagen na centrifugatie van 0,3 ml van een 20.000 g ghostsuspensie op een discontinue sucrose gradient.

●—●—● ^{59}Fe ▲—▲—▲ ^{125}I

over Sepharose-6B zelfs verschoven is ten gunste van de B₁-component; dit wordt veroorzaakt door de afname van ^{59}Fe -activiteit uit de B₂-component ten gevolge van een afsplitsing van ^{125}I , ^{59}Fe -transferrine van de receptorcomponent B₂ tijdens het centrifugeren op de discontinue sucrose gradient. Met behulp van immunoprecipitatie met antihemoglobine antilichamen werd aangetoond dat B₁ geen hemoglobine bevatte, evenmin bleek er veel ^{59}Fe als heem aanwezig in B₁, van zowel de gezuiverde als de niet-gezuiverde ghosts.

Discussie

De aard van het ijzertransport via de transferrine-receptor op de plasmamembraan naar de mitochondriën in het cytoplasma is nog niet opgehelderd. In hoofdstuk VI is aangetoond dat chromatografie van een reticulocyten ghostsuspensie over Sepharose-2B en -6B resulteerde in drie ^{59}Fe -bevattende componenten, welke werden aangeduid als A, B₁ en B₂ en als membraancomponenten werden beschouwd. Deze componenten zijn als steun gebruikt voor de hypothese van Jandl, volgens welke

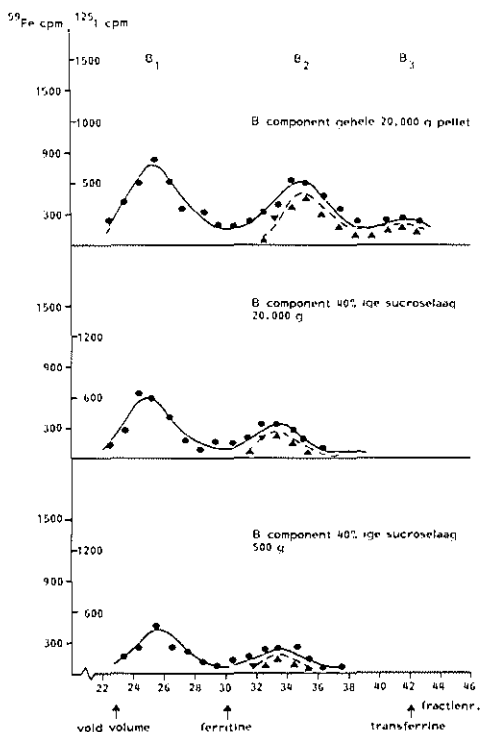


Fig. 5 Chromatografie van de Sepharose-2B verkregen B-component op Sepharose-6B. B-componenten werden verkregen van een ongezuiverde 20.000 g ghostsuspensie en van de 40%-ige sucroselagen van een 20.000 g en 500 g ghostsuspensie.

Tabel VI. — De gemiddelde procentuele ^{59}Fe - en ^{125}I -verdeling na gelfiltratie van de, van een Sepharose-2B verkregen, B-componenten van een gezuiverde en ongezuiverde ghostsuspensie op Sepharose-6B.

	B-component van ongezuiverde ghostsuspensie	B-component van door discontinue sucrose gradient centrifugatie gezuiverde ghostsuspensie
Gemiddelde procentuele ^{59}Fe -activiteit van B ₁ -component t.o.v. totale ^{59}Fe -recovery van Sepharose-6B kolom	32%	42%
Gemiddelde procentuele ^{59}Fe - en ^{125}I -activiteit t.o.v. B ₂ -component t.o.v. de recovery van de totale hoeveelheid activiteit van de Sepharose-6B kolom	^{59}Fe 31% ^{125}I 92%	24% 93%
$^{59}\text{FeB}_1/^{59}\text{FeB}_2$ verhouding van Sepharose-6B kolom	1.0	1.7

transferrine ijzer aan membraaneiwitten afgeeft, die als intermediairen fungeren in het ijzertransport van transferrine naar de cytosol; transferrine zou in deze hypothese dus

niet naar de cytosol worden getransporteerd om dan pas haar ijzer af te geven. Aangezien echter de reticulocyten ghosts gecontamineerd kunnen zijn met mitochondriën en lysosomen zouden de beschreven ^{59}Fe -bevattende componenten ook onderdeel kunnen uitmaken van mitochondriën of lysosomen, die de plasmamembranen van ghostsuspensies verontreinigen. De in dit hoofdstuk beschreven experimenten tonen aan dat ghostsuspensies bereid van rattenreticulocyten volgens de methode van Dodge et al., gecontamineerd zijn met mitochondriën en lysosomen, blijkens de aanwezigheid van mitochondriale en lysosomale enzymactiviteiten in deze ghostsuspensies.

Zoals tabel II toont, is de mate van mitochondriale en lysosomale contaminatie afhankelijk van de centrifugatiesnelheid waarbij de ghostsuspensie wordt verkregen. Eveneens wordt aangetoond dat het mogelijk is om bij 10.000 en 20.000 g verkregen ghostsuspensies gedeeltelijk te zuiveren door de harde, groen/bruine pellet van de erop liggende crème-kleurige ghostsuspensie te scheiden. Deze harde, groen/bruine pellet bevatte de meeste mitochondriën zoals blijkt uit de procentuele hoeveelheid en uit de relatieve specifieke activiteit van de mitochondriale enzymen in deze pellet. Het verwijderen van deze harde groen/bruine pellet resulteerde echter niet in een ghostsuspensie, welke volledig vrij was van elke mitochondriale en lysosomale verontreiniging. Een voortgezette zuivering werd uitgevoerd door de ghostsuspensie te centrifugeren op een discontinue sucrose gradient, hetgeen resulteerde in een plasmamembraanfractie met nog slechts een zeer geringe contaminatie aan mitochondriën en lysosomen.

Het feit dat de ^{59}Fe -activiteit van de A-component toeneemt met een toenemende centrifugatiesnelheid, zowel actueel als procentueel, terwijl de relatieve specifieke activiteit van het plasmamembraanenzym acetylcholinesterase gelijk blijft, zodat de hogere centrifugatiesnelheid dus niet resulteert in een procentuele verrijking van de plasmamembraanfractie in de ghostpellet, deed reeds vermoeden dat component A geen membraancomponent is. Dit wordt bevestigd door het feit dat de A-component nagenoeg geheel afwezig was in de op de discontinue sucrose gradient bereide membraanfractie.

Deze component bevindt zich in de mitochondriale laag en maakt daarom mogelijk deel uit van de mitochondriën. Misschien komt component A overeen met de ijzerbevattende void volume fractie die Ponka et al. verkregen, door geïsoleerde mitochondriën aan gelfiltratie over Sepharose G-200 te onderwerpen (20).

Aangezien de procentuele ^{59}Fe -activiteit in B_1 in de gezuiverde membraanfractie gelijk bleef of zelfs iets toenam ten opzichte van de ongezuiverde ghostsuspensie, en de procentuele ^{59}Fe -activiteit in B_1 niet door de centrifugatiesnelheid, waarbij de ghostsuspensies werden verkregen, werd beïnvloed, is het zeer waarschijnlijk dat B_1 een ijzer-bevattende membraancomponent is. (Strikt genomen is een intracellulaire component, die een sterke binding aangaat met de plasmamembraan niet uigesloten.) De functie van deze component in het ijzertransport naar de mitochondriën dient nog nader geanalyseerd te worden.

Literatuur

1. MORGAN, E.H. and APPLETON, T.C. (1969). Autoradiographic localization of ^{125}I -labelled transferrin in rabbit reticulocytes. *Nature* 223, 1371-1372.
2. MARTINEZ-MEDELLIN, J. and SCHULMAN, H.M. (1972). The kinetics of iron and transferrin incorporation into rabbit erythroid cells and the nature of stromal-bound iron. *Biochim. Biophys. Acta* 264, 272-284.
3. BOROVA, J., PONKA, P. and NEUWIRT, J. (1973). Study of intracellular iron distribution in rabbit reticulocytes with normal and inhibited heme synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 320, 143-156.
4. HEMMAPLARDH, D. and MORGAN, E.H. (1974). The mechanism of iron exchange between synthetic iron chelators and rabbit reticulocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 375, 84-99.
5. HEMMAPLARDH, D. and MORGAN, E.H. (1977). The role of endocytosis in transferrin uptake by reticulocytes and bone marrow cells. *Brit. J. Haematol.* 36, 85-96.
6. KATZ, J.H. and JANDL, J.H. (1964). The role of transferrin in the transport of iron into the developing red cell. In: *Iron Metabolism* (Gross, F. Ed.), pp. 103-117. Springer-Verlag, Berlin.
7. FIELDING, J. and SPEYER, B.E. (1974). Iron transport intermediates in human reticulocytes and the membrane binding site of iron-transferrin. *Biochim. Biophys. Acta* 336, 387-396.
8. WORKMAN, E.F. and BATES, G.W. (1974). Mobilization of iron from reticulocyte ghosts by cytoplasmic agents *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 58, 787-794.
9. GLASS, J., NUNEZ, M.T. and ROBINSON, S.H. (1977). Iron transport from sepharose-bound transferrin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 75, 226-232.
10. VERHOEF, N.J. and NOORDELOOS, P.J. (1977). Binding of transferrin and uptake of iron by rat erythroid cells in vitro. *Clin. Sci. Mol. Med.* 52, 87-96.
11. GLASS, J., NUNEZ, M.T. and ROBINSON, S.H. (1980). Transferrin-binding and iron-binding proteins of rabbit reticulocyte plasma membranes. Three distinct moieties. *Biochim. Biophys. Acta* 593, 293-304.
12. LODISH, H.F. and SMALL, B. (1975). Membrane proteins synthesized by rabbit reticulocytes. *J. Cell Biol.* 65, 51-64.
13. ELLMAN, G.L., COURTNY, K.D., ANDRES, V., Jr., and FEATHERSTONE, R.M. (1961). *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95.
14. SOTTOCA, G.L., KUYLENSTIERNA, B., ERNSTER, I. and BERGSTVAND, A. (1967). An electron-transport system associated with the outer membrane of liver mitochondria. *J. Cell Biol.* 32, 415-428.
15. 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.
16. DE DUVE, C., PRESSMAN, B.C., GRANETTO, R. WATTIAUX, R. and APPELMANS, F. (1955). Tissue fractionation studies 3 and 4. *Biochem. J.* 59, 426-445.
17. 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. *Anal. Biochem.* 87, 206-210.
18. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDALL, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
19. THUNELL, S. (1965). Determination of incorporation of ^{59}Fe in hemin of peripheral red blood cells and of red cells in bone marrow cultures. *Clin. Chim. Acta* 11, 321-333.
20. PONKA, P., NEUWIRT, J.M., BOROVA, J. and FUCHS, O. (1977). Control of iron delivery to haemoglobin in erythroid cells. In: *Iron Metabolism*, Ciba Foundation Symposium 51, Excerpta Medica, Amsterdam, pp. 167-200.

HOOFDSTUK X

Het intracellulaire ijzertransport van de rattenreticulocyt

Inleiding

Zoals reeds in hoofdstuk I werd aangegeven is het nog niet duidelijk of bij het ijzertransport naar het cytoplasma, transferrine, na binding aan de membraanreceptor, wel of niet naar binnen gaat (1 t/m 6). Ook het transport van het intracellulaire ijzer naar de mitochondriën, waar de inbouw van ijzer in protoporfyrine plaatsvindt, is nog niet opgehelderd. In hoofdstuk I werd al aangegeven dat uit de literatuur een aantal componenten bekend zijn, welke mogelijk een rol spelen bij de ijzerstofwisseling in het cytoplasma. De functies die aan de verschillende componenten worden toegeschreven, wisselen sterk (zie tabel IV, hoofdstuk I).

Het staat vast dat naast hemoglobine ook ferritine in de cytosol van de cel aanwezig is. Of dit ferritine een opslagfunctie, of wel een intermediaire functie in het ijzertransport van transferrine naar mitochondriën heeft, is nog onbekend (3, 4, 5, 7 t/m 11). Behalve hemoglobine en ferritine spelen mogelijk ook een hoog-moleculaire, "niet-heem, niet-ferritine component" (10), transferrine (2, 9, 10, 12) een "niet-hemoglobine component" met een relatieve molecuulmassa van circa $60 \cdot 10^3$ (9) en een laag moleculaire component (4, 5, 10, 11) een rol bij de intracellulaire ijzerstofwisseling. Genoemde componenten worden echter lang niet altijd gecombineerd aangetroffen (zie tabel IV, hoofdstuk I).

In dit hoofdstuk wordt nagegaan welke componenten bij de intracellulaire ijzerstofwisseling in de rattenreticulocyt betrokken zijn, alsmede of deze componenten als intermediair in het intracellulaire ijzertransport kunnen fungeren. Tevens wordt nagegaan wat de functie van de eerder beschreven membraancomponenten, B₁ en B₂, bij het ijzertransport naar de mitochondriën is.

Materiaal en Methoden

- a) reticulocyten werden verkregen van mannelijke Wistar ratten volgens de in hoofdstuk II beschreven wijze.
- b) Met ⁵⁹Fe en ¹²⁵I gemerkt rattentransferrine werd bereid op de in hoofdstuk II beschreven methode.
- c) De reticulocyten werden op de in hoofdstuk II beschreven wijze geïncubeerd met transferrine. In een aantal experimenten werd de invloed van een afgenomen heemsynthese op de verdeling van ⁵⁹Fe over de cytosolcomponenten

nagegaan. De heemsynthese werd geremd door een reticulocyten suspensie te incuberen met, isonicotinezuurhydroxide (INH), dat de vorming van δ -amino-laevulinezuur tegengaat (zie schema I, hoofdstuk I). De incubatieduur met INH varieerde van 15-30 minuten bij een temperatuur van 37°C . De eindconcentratie van INH in het incubatiemedium was 0,01 mol/liter.

d) *Bereiding cytosol*

Reticulocyten suspensies werden op twee wijzen gehemolyseerd:

- 1) Met 20 mOsm PBS; de verhouding cellen:buffer was 1:30 (soms 1:8). Het hemolysaat werd vervolgens 30 minuten bij 25.000 g gecentrifugeerd;
- 2) Met een 5 millimolaire Tris-HCl buffer van pH 7,5, welke 1 millimolair trisnatriumcitraat bevatte, de verhouding cellen:buffer was 1:1. Het verkregen hemolysaat werd weer 30 minuten gecentrifugeerd bij 20.000 g.

e) *Chromatografie cytosol*

De reticulocyten cytosol werd gechromatografeerd over Sephadex G-100, die geëquilibreerd was met een 0,1 molaire Tris-HCl buffer, pH 8,0; deze buffer fungeerde ook als elutiebuffer. De elutiesnelheid bedroeg 6 ml/30 minuten. De van de Sephadex G-100 kolom verkregen void volume fracties (component I, zie resultaten) werden met behulp van een Amicon filterapparaat geconcentreerd en opnieuw gechromatografeerd over Sepharose-6B. De fracties, die na chromatografie over de Sephadex G-100 kolom, de zgn. component IV vormden (zie resultaten), werden eveneens met behulp van een Amicon filterapparaat geconcentreerd en weer gechromatografeerd over Sephadex G-50.

f) *Karakterisering van componenten I en IV*

Van de componenten I en IV werden opnames gemaakt in de analytische ultracentrifuge. Met een Ouchterlony immunodiffusie techniek werden de reacties van antiferritine, antitransferrine en antihemoglobine met de componenten I en IV nagegaan. Van de componenten I en IV werd tevens een absorptiespectrum bepaald tussen 220 en 700 nm.

g) *Reïncubatie reticulocyten*

Reticulocyten werden op de in hoofdstuk II beschreven wijze geïncubeerd met transferrine. Na verwijdering van niet gebonden transferrine werd de celsuspensie in drie gelijke delen, A, B en C, gesplitst; van celsuspensie A werd direct na incubatie een ghostsuspensie bereid. Celsuspensies B en C werden, direct na isolatie, gedurende respectievelijk 30' en 60' bij 37°C gereïncubeerd in een medium met ongemerkt transferrine, alvorens er ghostsuspensies van werden bereid. Alle ghostsuspensies werden met Triton X-100 opgelost en gechromatografeerd over Sepharose-2B en Sepharose-6B op de in hoofdstuk VI beschreven wijze.

h) *Incubatie van een met ^{59}Fe en ^{125}I gemerkte reticulocyten ghostsuspensie in een incubatiemedium*

Een met ^{125}I en ^{59}Fe gemerkte ghostsuspensie werd bereid op de in hoofdstuk

II beschreven wijze. De verkregen ghostsuspensie werd gedurende 30 minuten geïncubeerd in het in hoofdstuk II beschreven incubatiemedium. Na incubatie werden incubatiemedium en ghostsuspensie door middel van centrifugatie gescheiden en werd de afgifte van ^{59}Fe en ^{125}I door de ghostsuspensie aan het incubatiemedium bepaald. De ghostsuspensie werd in Triton X-100 opgelost en vervolgens gechromatografeerd over Sepharose-2B en Sepharose-6B op de in hoofdstuk VI beschreven wijze.

- i) *Incubatie van een reticulocyten cytosol met een met ^{59}Fe en ^{125}I gemerkte reticulocyten ghostsuspensie*
Een met ^{125}I en ^{59}Fe gemerkte reticulocyten ghostsuspensie werd bereid op de in hoofdstuk II beschreven wijze. Van een niet met transferrine geïncubeerde reticulocytensuspensie werd een hemolysaat bereid in 20 mOsm PBS (verhouding cellen:buffer = 1:4). Een cytosol werd bereid door het verkregen hemolysaat 30 minuten bij 25.000 g te centrifugeren. Zowel de cytosol als het hemolysaat werden vervolgens gedurende 30-60 minuten bij 37°C geïncubeerd met de met ^{59}Fe en ^{125}I gemerkte reticulocyten ghostsuspensie. De verhouding hemolysaat of cytosol/ghostsuspensie was 1:1 (berekend ten opzichte van de oorspronkelijke celsuspensies). De overdracht van aan de ghostsuspensie gebonden ijzer en/of transferrine naar de cytosolcomponenten werd vervolgens geanalyseerd.
- j) *Incubatie van een reticulocyten cytosol met geïsoleerde membraancomponenten*
Opgeloste, met ^{125}I en ^{59}Fe gemerkte, reticulocyten ghosts werden gechromatografeerd over Sepharose-2B en Sepharose-6B op de in hoofdstuk VI beschreven wijze. De verkregen membraancomponenten B_1 en B_2 werden geconcentreerd en vervolgens geïncubeerd met een niet met ^{59}Fe en ^{125}I gemerkte reticulocyten cytosol (zgn. "koude" cytosol). De overdracht van aan B_1 en B_2 gebonden ijzer en transferrine naar de cytosolcomponenten werd vervolgens door middel van chromatografie van de cytosol geanalyseerd.
- k) *Incubatie van de met ^{59}Fe gemerkte cytosolcomponenten I en IV met een niet-gemerkte ongefractioneerde cytosol en hemolysaat*
De na chromatografie, van een met ^{59}Fe gemerkte cytosol over Sephadex G-100, verkregen componenten I en IV (zie onder resultaten) werden gedurende 60 minuten bij 37°C geïncubeerd met een niet-gefractioneerde cytosol of hemolysaat, die werden verkregen van een niet met transferrine geïncubeerde reticulocytensuspensie. Na incubatie werd de eventuele overdracht van ^{59}Fe door de componenten I en IV aan andere cytosolcomponenten nagegaan.
- l) *Bepaling van Fe^{2+} en Fe^{3+} gehalte in de cytosolcomponent IV*
De hoeveelheid $\text{Fe}(\text{II})$ in component IV werd direct colorimetrisch bepaald met de bathophenantroline methode. Tevens werd de hoeveelheid $\text{Fe}(\text{II})$ bepaald na reductie van component IV met ascorbinezuur. Het verschil tussen beide uitkomsten geeft de oorspronkelijke hoeveelheid $\text{Fe}(\text{III})$ in component IV aan.

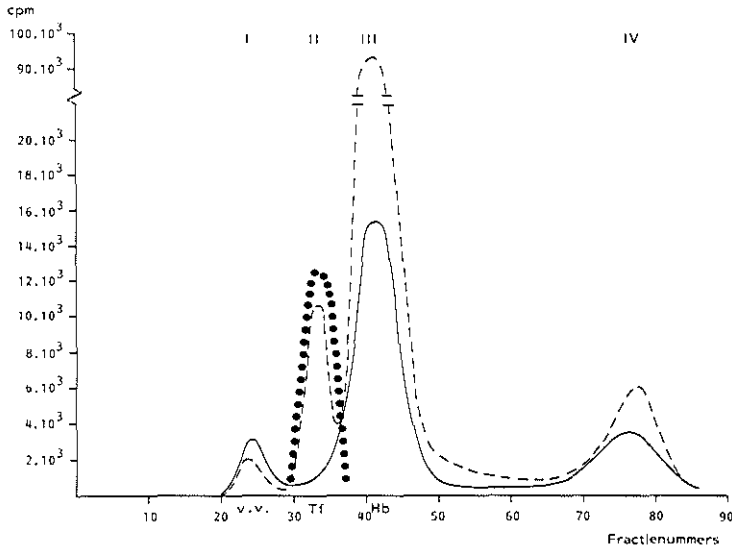


Fig. 1 Gelfiltratie van een reticulocyten cytosol op Sephadex G-100.

————— E₂₅₄ nm - - - - - ⁵⁹Fe ● ● ● ¹²⁵I.

Resultaten

a) Chromatografie van een reticulocyten cytosol over Sephadex G-100

De chromatografie van een cytosol bereid uit, met ¹²⁵I, ⁵⁹Fe-transferrine geïn-cubeerde reticulocyten resulteerde in een chromatogram met 4 radioactief gemerkte fracties (fig. 1). Component I elueerde in het void volume van de kolom en bevatte vrijwel uitsluitend ⁵⁹Fe. Component II elueerde op de plaats van vrij transferrine uit de kolom; deze component bevatte naast ⁵⁹Fe, vrijwel alle ¹²⁵I-activiteit die in de cytosol aanwezig was. Mede gezien het feit dat deze component met antitransferrine reageerde, representeert deze fractie vrij transferrine. De derde activiteitspiek bevatte alleen ⁵⁹Fe-activiteit, die voor meer dan 80% in heem bleek te zijn ingebouwd. Mede gezien het gemeten absorptiespectrum, het elutievolume en de reactie met tegen hemoglobine gerichte antilichamen representeert deze component hemoglobine.

Na de hemoglobine-piek wordt nog een ⁵⁹Fe-piek waargenomen, die samenvalt met een tevens nog aanwezige eiwitpiek (component IV). De relatieve verdeling van ⁵⁹Fe over de verschillende componenten is weergegeven in tabel I.

Tabel I. — Procentuele verdeling van de ⁵⁹Fe- en ¹²⁵I-activiteit over de cytosolcomponenten I t/m IV.

Component	Percentage van totale ⁵⁹ Fe-activiteit	Percentage van totale ¹²⁵ I-activiteit
I	1 ± 0,3	
II	6 ± 1,0	98 ± 2,0
III	90 ± 2,0	
IV	3 ± 0,8	

Een verdere fractionering van een aantal verzamelde void volume fracties werd verkregen door chromatografie over Sepharose-6B. Zoals uit de resultaten van fig. 2 blijkt, werden hierbij twee radioactieve componenten verkregen; de eerste component (I_1), met de minste ^{59}Fe -activiteit, elueerde in het void volume uit de kolom. De tweede ^{59}Fe -actieve component (I_2) heeft een elutievolume dat overeenkomt met dat van ferritine.

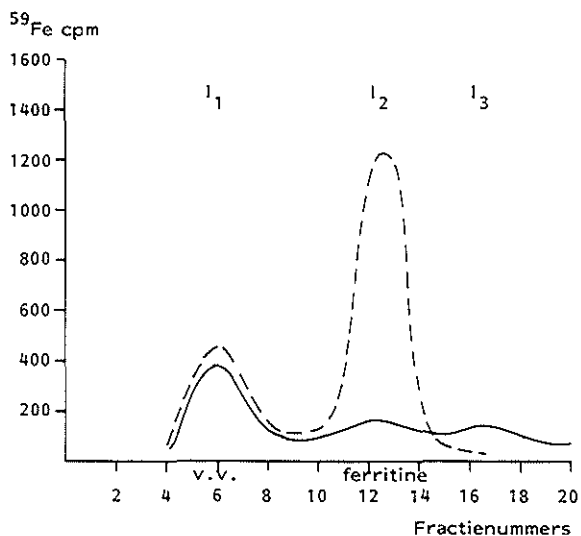


Fig. 2 Herchromatografie van component I van de Sephadex G-100 kolom op Sepharose-6B.
 ————— $E_{254\text{ nm}}$ - - - - - ^{59}Fe

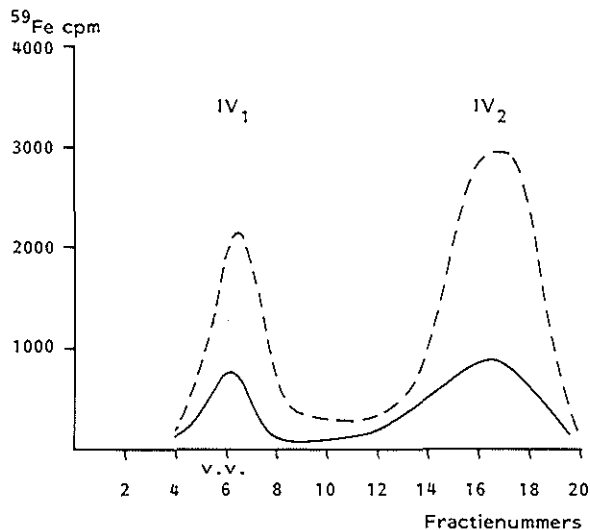


Fig. 3 Herchromatografie van component IV van de Sephadex G-100 kolom op Sephadex G-50.

————— $E_{254\text{ nm}}$ - - - - - ^{59}Fe .

De Sephadex G-100 component IV, verzameld uit een aantal experimenten, werd eveneens verder gefractioneerd door chromatografie over Sephadex G-50. Dit resulteerde in een elutediagram dat is weergegeven in fig. 3, waaruit blijkt dat bij deze fractionering twee eiwitfracties werden verkregen die samenvielen met twee ^{59}Fe -fracties (IV_1 en IV_2). Om na te gaan of de tweede component (IV_2) geen splitsingsproduct was, ontstaan bij de bewerking van component IV, werd een cytosol direct over Sephadex G-50 gechromatografeerd. Uit de resultaten in fig. 4 blijkt dat ook nu na de void volume piek een eiwitfractie met ^{59}Fe -activiteit ontstaat.

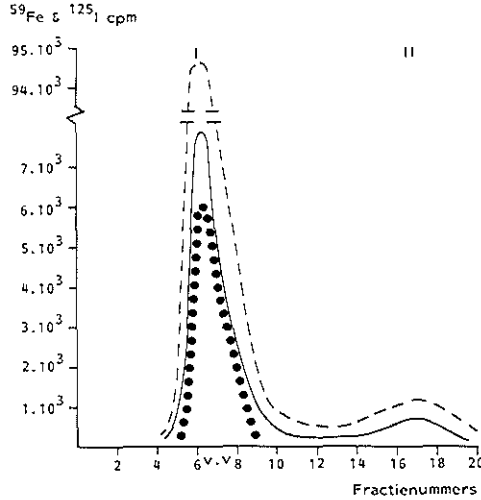


Fig. 4 Gelfiltratie van een reticulocyten cytosol op Sephadex G-50.
 ————— $E_{254} \text{ nm}$ - - - - - ^{59}Fe ● ● ● ^{125}I .

b) *Nadere karakterisering van de componenten I en IV van Sephadex G-100 kolom*

Ad. Component I

Het heterogene karakter van component I, dat op grond van de chromatografie over Sepharose-6B (fig. 2) reeds aannemelijk was, werd bevestigd met behulp van een opname in de analytische ultracentrifuge, waarbij fracties met verschillende Svedberg-constanten werden verkregen.

Na de fractionering van component I over Sepharose-6B werden de hierbij verkregen componenten I_1 , I_2 en I_3 in een Ouchterlony diffusie-techniek tegen antitransferrine, antiferritine en antihemoglobine getoetst. De resultaten zijn weergegeven in tabel II; gezien de positieve reactie van component I_2 met antiferritine werd met behulp van een precipitatieractie tussen component I_2 en antiferritine nagegaan of de ^{59}Fe van deze component I_2 ook aan ferritine is gekoppeld. Het bleek dat met antiferritine meer dan 80% van de ^{59}Fe -activiteit in component I_2 precipiteerde.

Tabel II. — Reactie van de componenten I₁, I₂, I₃ uit fig. 2 met antilichamen tegen transferrine, ferritine en hemoglobine

	Component I ₁	Component I ₂	Component I ₃
Antiferritine	—	+	—
Antihemoglobine	—	—	+
Antitransferrine	—	—	—

Ad. Component IV

Met behulp van filtratie via Amicon-filters werd vastgesteld dat de relatieve molecuulmassa van component IV ligt tussen de 1000 en 10.000 daltons. Indien een met ⁵⁹Fe gemerkte cytosol zonder voorafgaande gelfiltratie op de Amicon-filters werd gebracht, bleek dat component IV ook aanwezig was. Dit resultaat maakt het onwaarschijnlijk dat component IV tijdens de chromatografie van de cytosol, als splitsingsprodukt van componenten I, II of III, ontstaat. Er werd een aminozuur-analyse verricht van de, na fractionering van component IV op Sephadex G-50 verkregen, componenten IV₁ en IV₂ (fig. 3). Daar in het hydrolysaat van beide componenten alle aminozuren aanwezig waren concludeerden wij dat deze componenten polypeptiden zijn. Het bleek dat circa 90% van het aan component IV gebonden ijzer als Fe(II) was gebonden en circa 10% als Fe(III). Gezien de activiteitsverdeling over de componenten IV₁ en IV₂ (fig. 3) houdt dit in dat ook deze twee componenten nog heterogeen van samenstelling zijn.

- c) *De invloed van een verminderde heemsynthese op de verdeling van ⁵⁹Fe over de componenten I t/m IV in de cytosol*

Uit de literatuur is bekend dat INH de heemsynthese remt, waarbij er slechts

Tabel III. — De verdeling van ⁵⁹Fe in reticulocyten, welke met of zonder INH werden geïncubeerd met een zelfde dosis ⁵⁹Fe-transferrine

	Met INH (A)		Zonder INH (Q)	
	⁵⁹ Fe in cpm	procentuele ⁵⁹ Fe-verdeling t.o.v. totaal	⁵⁹ Fe in cpm	procentuele ⁵⁹ Fe-verdeling t.o.v. totaal
Gehele reticulocyten (50 λ)	18.900		19.900	
Ghost	16.028		6.828	
Cytosol (100 λ; verdund)	2.268	12	12.935	65
Cytosol over Sephadex G-100		procentuele ⁵⁹ Fe-verdeling t.o.v. recovery		procentuele ⁵⁹ Fe-verdeling t.o.v. recovery
Component I	1.708	5	1.874	0,8
Component II	10.862	32	11.524	5
Component III	14.007	41	202.778	88
Component IV	7.322	20	5.762	2,5

geringe veranderingen in de totale ijzeropname door de cel optreden (zie hoofdstuk I). In tabel III is de invloed van preïncubatie met INH op de (sub) cellulaire ^{59}Fe -verdeling weergegeven. Na preïncubatie met INH bleek de totale ^{59}Fe -opname door de celsuspensie niet significant te verschillen van de ^{59}Fe -opname door een niet met INH gepreïncubeerde celsuspensie. Na hemolysen en centrifugeren bij 25.000 g bleek dat de cytosol na preïncubatie met INH veel minder ^{59}Fe bevatte, terwijl de, bij deze sedimentatiesnelheid verkregen ghostsuspensie, juist meer ^{59}Fe -activiteit bevatte dan de ghostsuspensie verkregen van reticulocyten zonder preïncubatie met INH.

Uit tabel III blijkt dat na preïncubatie met INH ook de procentuele verdeling van ^{59}Fe over de cytosolcomponenten veranderd is; de procentuele ^{59}Fe -activiteit in piek I, en met name in piek IV, nemen toe, terwijl de procentuele ^{59}Fe -activiteit in piek III (hemoglobine) afneemt. De reële ^{59}Fe -activiteit in de gehele component I verschilt na preïncubatie met INH niet significant van de ^{59}Fe -activiteit zonder preïncubatie met INH, terwijl de reële ^{59}Fe -activiteit in component IV, na preïncubatie met INH iets toeneemt (tabel III).

d) *Incubatie van cytosolcomponenten I & IV met een reticulocyten hemolysaat en cytosol*

Ten einde na te gaan of de cytosolcomponenten I en IV, direct dan wel indirect, een rol spelen als ijzerdonor voor mitochondriën of andere intracellulaire componenten, werden beide radioactieve componenten met een niet-radioactief reticulocyten hemolysaat (respectievelijk cytosol) geïncubeerd.

Na incubatie van de cytosol met de componenten I en IV was er geen significante ^{59}Fe -afgifte van beide componenten aan cytosolcomponenten waarneembaar. Aangezien in een door ons bereide cytosol de mitochondriën voor het grootste deel verwijderd zijn (zie hoofdstuk IX) werd met behulp van een hemolysaat nagegaan of in aanwezigheid van deze mitochondriën wel een afgifte van ^{59}Fe door cytosolcomponent I of IV plaatsvond. Echter, ook nu bleek dat na incubatie, componenten I of IV geen significante ^{59}Fe -activiteit hadden afgegeven.

e) *Reïncubatie van met ^{59}Fe - ^{125}I -transferrine geïncubeerde reticulocyten*

Door reïncubatie van met ^{59}Fe -, ^{125}I -transferrine gemerkte reticulocyten werd getracht een indruk te krijgen van de functie van de met ^{59}Fe -gemerkte cellulaire componenten bij het ijzertransport naar de mitochondriën. (Zie onder methoden, g). Na reïncubatie werden van de reticulocytensuspensies op de gebruikelijke wijze ghostsuspensies en cytosol bereid. Na 30 en 60 minuten reïncubatie bleek circa 30 resp. circa 50% van de oorspronkelijke aan de cel gebonden hoeveelheid transferrine aan het incubatiemedium te zijn afgegeven (Tabel IV).

e₁) *Veranderingen in de ghostsuspensie na reïncubatie*

In fig. 5 en tabellen Va en Vb worden de veranderingen weergegeven in de ^{59}Fe -activiteit van de bij de fractionering van de ghostsuspensie verkregen componenten A, B, B₁ en B₂. De resultaten van één experiment zijn weergegeven,

Tabel IV. — De ^{59}Fe en ^{125}I -activiteit in ghostsuspensies en cytosolen van gereïncubeerde reticulocyten

	Geen reïncubatie		30 min. reïncubatie		60 min. reïncubatie	
	^{59}Fe cpm	^{125}I cpm	^{59}Fe cpm	^{125}I cpm	^{59}Fe cpm	^{125}I cpm
Gehele cel	1.827.300		1.819.470		1.811.700	
Ghost	283.350	42.000	175.800	28.960	131.800	21.338
Cytosol	1.391.980		1.490.853		1.512.090	

de resultaten van de overige experimenten waren vrijwel identiek.

Samenvattend kunnen wij stellen dat de ^{59}Fe -activiteit en ^{125}I -activiteit van de totale ghostsuspensie afnamen.

De ^{59}Fe -activiteit in component A bleek niet significant te veranderen, hoewel procentueel de ^{59}Fe -activiteit in deze component toenam. De bij reïncubatie waargenomen afname van de ^{59}Fe -activiteit van de ghostsuspensie werd dan

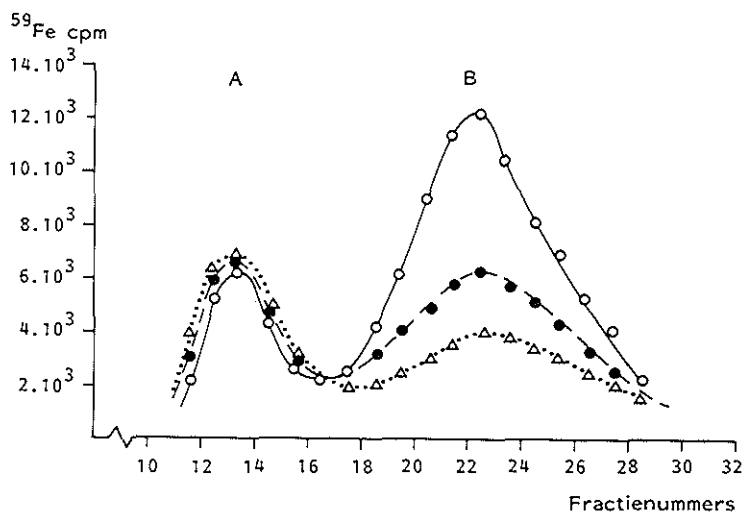


Fig. 5a Chromatografie van een normale ghostsuspensie (O—O—O) een ghostsuspensie na 30 min. reïncubatie (●—●—●) en een ghostsuspensie na 60 min. reïncubatie (△—△—△) op Sepharose-2B.

Tabel V^A. — De veranderingen in ^{59}Fe -activiteit van de ghostsuspensiecomponenten A en B, verkregen na chromatografie over Sepharose-2B

	Geen reïncubatie		30 min reïncubatie		60 min reïncubatie	
	^{59}Fe cpm	% van recovery Sepharose-2B kolom	^{59}Fe cpm	% van recovery Sepharose-2B kolom	^{59}Fe cpm	% van recovery Sepharose-2B kolom
Component A	17.500	16	18.481	25	18.821	31
Component B	78.417	72	42.842	58	30.762	51

ook alleen veroorzaakt door een afname van de ^{59}Fe -activiteit in de B-component. De afgenomen ^{59}Fe -activiteit, waargenomen in de B-component van de Sepharose-2B kolom, blijkt te worden veroorzaakt door een afname van de ^{59}Fe -activiteit in zowel de B_1 -component als de B_2 -component (tabel Vb; fig. 5b).

De ^{59}Fe -activiteit van de B_1 -component neemt tijdens de eerste 30 minuten van de reïncubatie minder af dan de ^{59}Fe -activiteit van de B_2 -component, hetgeen zich weerspiegelt in een procentuele toename van de ^{59}Fe -activiteit in B_1 tijdens de reïncubatie en een toename van de $^{59}\text{Fe } B_1 / ^{59}\text{Fe } B_2$ -verhouding; in de tweede 30 minuten verschilt de afgifte van ^{59}Fe uit de componenten B_1 en B_2 niet veel meer.

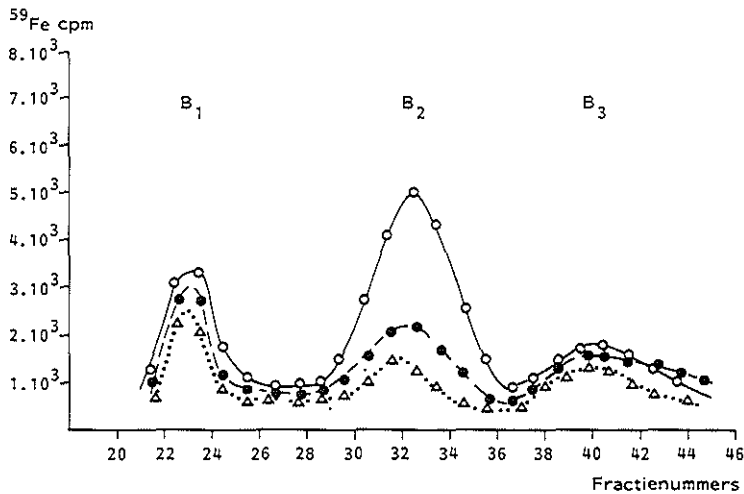


Fig. 5b Herchromatografie van de verschillende B-componenten (uit fig. 5a) van de Sepharose-2B kolom op Sepharose-6B.

- O—O—O B-component normale ghostsuspensie
- B-component ghostsuspensie na 30 min. reïncubatie
- △—△—△ B-component ghostsuspensie na 60 min. reïncubatie

Tabel V^B. — De veranderingen in ^{59}Fe -activiteit van de ghostsuspensiecomponenten verkregen na chromatografie van component B over Sepharose-6B

	Geen reïncubatie		30 min. reïncubatie		60 min. reïncubatie	
	Fe cpm	% van recovery Sepharose-6B kolom	Fe cpm	% van recovery Sepharose-6B kolom	Fe cpm	% van recovery Sepharose-6B kolom
Component B ₁	10.274	21	8.893	30	6.743	31
Component B ₂	21.023	44	9.023	30	6.241	29
Fe B ₁ /Fe B ₂	0,49		0,99		1,01	

e₂) *Veranderingen in de cytosol na reïncubatie*

In tabel VI worden de resultaten van één experiment weergegeven; de resultaten van andere experimenten waren vrijwel identiek. Samenvattend concluderen wij dat bij toenemende reïncubatietijd de ⁵⁹Fe-activiteit van de cytosol toenam, hetgeen met name veroorzaakt werd door hogere ⁵⁹Fe-activiteit in component III (hemoglobine).

Tabel VI. – De veranderingen in ⁵⁹Fe-activiteit van de cytosolcomponenten I, III en IV.

	Geen reïncubatie*		30 min. reïncubatie*		60 min. reïncubatie*	
	⁵⁹ Fe cpm	% van recovery	⁵⁹ Fe cpm	% van recovery	⁵⁹ Fe cpm	% van recovery
Component I	4.176	0,7	6.681	0,9	10.584	1,4
Component III	611.775	88	667.157	89,5	687.963	91
Component IV	13.918	2	7.959	1,2	3.120	0,4
Componenten I + IV	18.094		14.640		13.704	

* Voor de chromatografie werd de helft van de oorspronkelijke cytosol gebruikt. Zie voor beschrijving van de componenten I t/m IV fig. 1.

Tijdens het reïncuberen nam de ⁵⁹Fe-activiteit in component I zowel reëel als procentueel toe, terwijl de reële en actuele ⁵⁹Fe-activiteit in component IV afnam. De gezamenlijke ⁵⁹Fe-activiteit van de componenten I en IV nam tijdens het reïncuberen iets af, daar de ⁵⁹Fe-activiteit in component IV sneller afnam dan de ⁵⁹Fe-activiteit in component I toenam.

f) *Reïncubatie van een met ⁵⁹Fe- en ¹²⁵I-gemerkte reticulocyten ghostsuspensie met Hanks'*

Van met ⁵⁹Fe-, ¹²⁵I-transferrine geïncubeerde reticulocyten werd een ghost-suspensie bereid volgens de in hoofdstuk II beschreven wijze. De verkregen ghostsuspensies werden gedurende verschillende tijden bij 37°C in Hanks' geïncubeerd, waarna eventueel opgetreden veranderingen in ⁵⁹Fe- en ¹²⁵I-activiteit van de ghostsuspensies werden geanalyseerd. Reïncubatie van een ghost-suspensie gedurende 30 minuten resulteerde in een afgifte van circa 9% van de in de ghostsuspensie aanwezige ⁵⁹Fe-activiteit, terwijl eveneens 9% van de in de ghostsuspensie aanwezige ¹²⁵I-activiteit werd afgegeven. Gezien het feit dat de ⁵⁹Fe/¹²⁵I-verhouding van een ghostsuspensie groter is dan de ⁵⁹Fe/¹²⁵I-verhouding van de oorspronkelijke transferrine-oplossing, houdt dit in dat ook niet aan transferrine gebonden ⁵⁹Fe werd afgegeven.

De resultaten van een karakteristiek experiment zijn weergegeven in de tabellen VIIa en b; resultaten van identiek uitgevoerde experimenten gaven een overeenkomstig beeld. Na reïncubatie waren zowel de actuele als de procentuele ⁵⁹Fe-activiteit in de A-component toegenomen en in de B-component gedaald (Sepharose-2B kolom). Tevens bleek dat de ⁵⁹Fe/¹²⁵I-verhouding van de B-component significant was afgenomen. Na fractionering van de B-componenten over Sepharose-6B bleek bij de gereïncubeerde ghostsuspensie in tegenstelling tot bij de gereïncubeerde intacte reticulocyten zowel de reële als de procen-

Tabel VII^A. -- De veranderingen in ⁵⁹Fe-activiteit van de ghostsuspensiecomponenten, verkregen na chromatografie over Sepherose-2B.

	Geen reïncubatie		30 min. reïncubatie	
	⁵⁹ Fe cpm	% van recovery	⁵⁹ Fe cpm	% van recovery
Component A	23.071	11	46.421	25
Component B	163.594	78	113.258	60
Totale ghost	209.737		188.763.	

Tabel VII^B. -- De veranderingen in ⁵⁹Fe-activiteit van de ghostsuspensiecomponenten, verkregen na chromatografie van component B over Sepharose-6B

	Geen reïncubatie		30 min. reïncubatie	
	⁵⁹ Fe cpm	% van recovery	⁵⁹ Fe cpm	% van recovery
Component B ₁	46.849	30	52.941	48
Component B ₂	64.089	42	25.781	23
Fe B ₁ /Fc B ₂	0,7		2,1	

tuele hoeveelheid ⁵⁹Fe-activiteit in component B₁ te zijn toegenomen. De ⁵⁹Fe-activiteit in B₂ was afgenomen. De reële toename van de ⁵⁹Fe-activiteit in zowel B₁ als A, alsmede de praktisch gelijke ⁵⁹Fe en ¹²⁵I-afgifte van de ghost-suspensie aan de incubatiebuffer, maken het waarschijnlijk dat de B₂-component naast aan transferrine gebonden ijzer nog een niet aan transferrine gebonden ijzercomponent bevat.

g) *Incubatie van een met ⁵⁹Fe en ¹²⁵I-gemerkte ghostsuspensie met een reticulocyten cytosol*

Een met ⁵⁹Fe- en ¹²⁵I-gemerkte ghostsuspensie werd gedurende 45 minuten met een reticulocyten cytosol geïncubeerd. Na incubatie werden de veranderingen in ⁵⁹Fe en ¹²⁵I-activiteit van de bij fractionering van de ghostsuspensie verkregen componenten A, B, B₁ en B₂ geanalyseerd. Tevens werd nagegaan of ⁵⁹Fe-activiteit was afgestaan aan cytosolcomponenten. Na incubatie bleek dat 26%, respectievelijk 28%, van de in de oorspronkelijke ghostsuspensie aanwezige ⁵⁹Fe-activiteit en ¹²⁵I-activiteit aan de cytosol was afgestaan (tabel VIII).

g₁) *Veranderingen in de ghostsuspensie*

In de tabellen IXa en IXb zijn de resultaten van een karakteristiek experiment weergegeven. Evenals bij de incubatie van een ghostsuspensie in Hanks'/MEM nam de ⁵⁹Fe-activiteit in component A zowel reël als procentueel toe. In component B nam zowel de ⁵⁹Fe- als de ¹²⁵I-activiteit af. Na fractionering van de B-component over Sepharose-6B bleken de veranderingen in ⁵⁹Fe-activiteit van de componenten B₁ en B₂ een patroon te vertonen dat overeenkwam met het patroon dat gezien werd bij de reïncubatie van intacte reticulocyten, namelijk een afname van de ⁵⁹Fe-activiteit in zowel component B₁ als B₂. Gezien de afname van de ⁵⁹Fe/¹²⁵I-verhouding van component B₂ geeft B₂ meer ⁵⁹Fe-

Tabel VIII. — De verdeling van ^{59}Fe en ^{125}I na incubatie ghostsuspensie en cytosol

	^{59}Fe cpm	Ghostsuspensie	
		% oorspr. ghost	^{125}I cpm
Normaal	247.390	100	34.190
Reïncubatie	173.173	70	22.565

	^{59}Fe cpm	Cytosol	
		% oorspr. ghost	^{125}I cpm
Normaal	—	—	—
Reïncubatie	64.260	26	9.530

Tabel IX^A. — De veranderingen in ^{59}Fe -activiteit van de ghostsuspensiecomponenten verkregen na chromatografie over Sepharose-2B

	Geen reïncubatie		45 min. reïncubatie	
	^{59}Fe cpm	% van recovery	^{59}Fe cpm	% van recovery
Component A	24.492	11	26.495	17
Component B	175.894	79	109.098	70

Table IX^B. — De veranderingen in ^{59}Fe -activiteit van de ghostsuspensiecomponenten, verkregen na chromatografie van component B over Sepharose-6B.

	Geen reïncubatie		45 min. reïncubatie	
	^{59}Fe cpm	% van recovery	^{59}Fe cpm	% van recovery
Component B ₁	39.400	28	31.420	36
Component B ₂	61.915	44	30.547	35
Fe B ₁ /Fe B ₂	0,64		1,03	
$^{59}\text{Fe}/^{125}\text{I}$ comp. B ₂	4,8		4,2	

activiteit af dan op grond van het ^{125}I (\equiv transferrine) verlies te verklaren valt. Dit vormt weer een indirect bewijs dat in component B₂ naast transferrine nog een ^{59}Fe -bevattende component aanwezig is. Daar de ^{59}Fe -B₁/ ^{59}Fe -B₂-verhouding bij incubatie toeneemt, blijkt ook hier, evenals bij de reïncubatie van intacte reticulocyten dat de netto daling van ^{59}Fe -activiteit in B₂ na reïncubatie groter is dan in B₁. Het patroon wijkt duidelijk af van dat wat verkregen wordt bij een reïncubatie van een ghostsuspensie in Hanks'/MEM, zoals in de vorige paragraaf beschreven.

g₂) Veranderingen in de cytosol

Na 45 minuten incubatie bleek dat de door de ghostsuspensie aan de cytosol afgegeven ^{59}Fe - en ^{125}I -activiteit zich over verschillende componenten verdeeld had, op een wijze zoals in tabel X weergegeven is. In vergelijking met de cytosol van een normaal incubatie-experiment is de procentuele bijdrage van ^{59}Fe -Hb (component III) aan de totale ^{59}Fe -activiteit van de cytosol kleiner.

Tabel X. — De verdeling van de ^{59}Fe - en ^{125}I -activiteit over de cytosolcomponenten.

	Procentuele verdeling van de cytosolactiviteit over de componenten	
	^{59}Fe	^{125}I
Component I	8	—
Component II	38	95
Component III	39	5
Component IV	15	—

h) *Incubatie van met ^{59}Fe - en ^{125}I -gemarkte ghostcomponenten met reticulocyten cytosol.*

De na fractionering van de ghostsuspensie verkregen componenten B_1 en B_2 werden geconcentreerd en vervolgens ieder apart met een reticulocyten cytosol geïncubeerd.

Component B_1

Na chromatografie van een met ^{59}Fe - B_1 geïncubeerde cytosol over Sephadex G-100 bleek dat meer dan 90% van de recovery van de ^{59}Fe -activiteit in de void volume fracties aanwezig was. De hemoglobinepiek bevatte geen ^{59}Fe -activiteit.

Component B_2

Na fractionering van de geïncubeerde cytosol en component B_2 over Sephadex G-100 werd een in fig. 6 weergegeven elutiepatroon verkregen. Het bleek dat 75% van de oorspronkelijk aan B_2 gebonden hoeveelheid ^{125}I -transferrine na de incubatie als vrij transferrine van de kolom elueerde; de resterende 25% bevond zich in de void volume fracties.

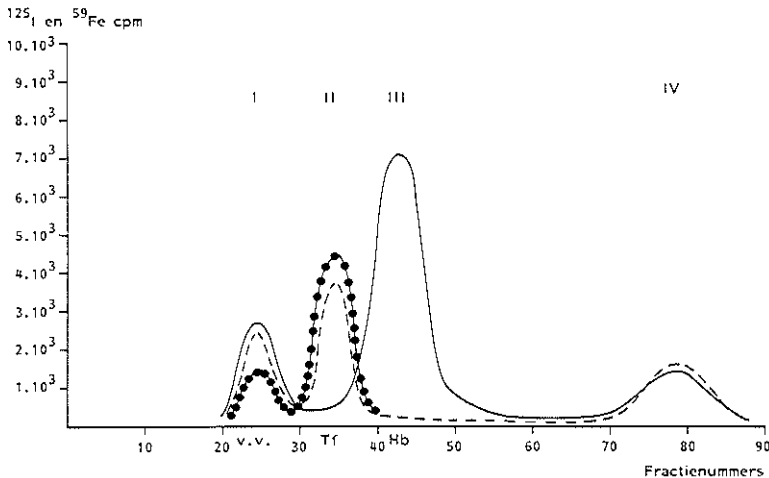


Fig. 6 Gelfiltratie van een reticulocyten cytosol na incubatie met membraancomponent B_2

— E_{254} nm - - - - ^{59}Fe ● ● ● ^{125}I .

Van de ^{59}Fe -activiteit bevond zich 30% in de void volume fracties, terwijl 47% in component II (\equiv transferrine) en 23% in component IV (\equiv laag-moleculaire component) van de kolom elueerden. Evenals bij de incubatie met component B_1 bevatte de cytosol component III, d.w.z. hemoglobine, geen ^{59}Fe -activiteit.

i) *Incubatie van met ^{59}Fe - en ^{125}I -gemerkte ghostcomponenten met "reticulocyten hemolysaat"*

Aangezien voor de produktie van heem mitochondriën noodzakelijk zijn, werd nagegaan of na incubatie van de ghostcomponenten B_1 en B_2 met een reticulocyten hemolysaat waarin zich nog mitochondriën bevonden wel ^{59}Fe -gemerkt hemoglobine was gevormd. Een "reticulocyten hemolysaat" werd bereid door een reticulocyten suspensie te hemolyseren en daarna gedurende 30 minuten bij 500 g te centrifugeren. De gevormde supernatant bleek nog veel mitochondriale enzymactiviteit te bevatten en wordt in het vervolg hemolysaat genoemd.

i₁) *Incubatie van hemolysaat met een zich binnen de dialysemembraan bevindende B_1 -component*

Teneinde na te gaan of bij een eventuele overdracht van ^{59}Fe van B_1 naar de mitochondriën de laag-moleculaire component een directe rol speelt, werd B_1 in een dialysemembraan gedaan, die vervolgens in de cytosol werd geplaatst en gedurende 2 uur bij 37°C werd geïncubeerd. (Dialysemembraan doorlaatbaar voor stoffen met een relatieve molecuulmassa van kleiner dan 10.000). Na 2 uur incuberen bleek geen ^{59}Fe -activiteit door B_1 te zijn afgegeven.

i₂) *Incubatie van hemolysaat met component B_1*

Component B_1 werd in direct contact gebracht met het hemolysaat en gedurende 2 uur bij 37°C geïncubeerd. Na incubatie werd het hemolysaat bij 25.000 g

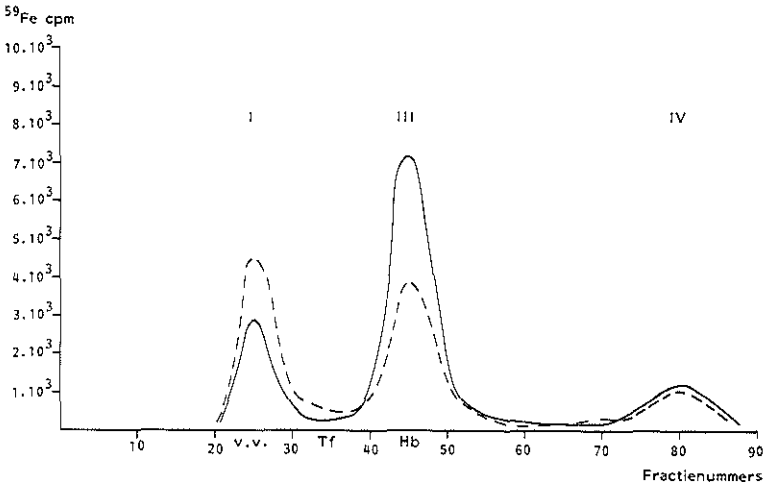


Fig. 7 Gelfiltratie van een reticulocyten hemolysaat na incubatie met membraancomponent B_1 .
 ————— E_{254} nm - - - - - ^{59}Fe

gecentrifugeerd, geconcentreerd op een Amicon-filter en over Sephadex G-100 gefiltreerd. Het hierbij verkregen elutiepatroon is weergegeven in fig. 7. Na incubatie bleek circa 47% van de oorspronkelijk in component B₁ aanwezige ⁵⁹Fe-activiteit in de void volume fracties van de kolom aanwezig.

De hemoglobinefracties bevatte, na incubatie, circa 38% van de oorspronkelijk in B₁ aanwezige ⁵⁹Fe-activiteit, terwijl in de laag-moleculaire fractie (component IV) circa 15% van deze ⁵⁹Fe-activiteit aanwezig was. De void volume fracties werden niet verder gefractioneerd. Meer dan 80% van de in de hemoglobinepiek aanwezige ⁵⁹Fe-activiteit bleek te zijn ingebouwd in heem.

Discussie

In de inleiding werd gesteld dat een aantal componenten een rol spelen bij het intracellulaire ijzertransport. Echter de aard en de functie van deze componenten is nog niet opgehelderd. Uit de in dit hoofdstuk beschreven resultaten kan geconcludeerd worden dat bij het intracellulaire ijzermetabolisme van de rattenreticulocyt tenminste 5 componenten betrokken zijn. Tot deze 5 componenten behoren hemoglobine en ferritine; daarnaast wordt een hoog-moleculaire "niet-heem", niet-ferritine component gevonden, die door Borova et al. (10) ook in konijnenreticulocyten is beschreven. Evenals door andere onderzoekers werd in de cytosol van de reticulocyten tevens een laag-moleculaire fractie gevonden, die ijzer bevat. Deze laag-moleculaire fractie was heterogeen van samenstelling en kon opgesplitst worden bij nadere fractionering in 2 componenten. Op grond van de aminozuursamenstelling en de gemeten absorptiespectra van deze componenten werd geconcludeerd dat beide laag-moleculaire componenten polypeptiden zijn.

Naast deze 5 componenten speelt mogelijk het eveneens in de cytosol aanwezige transferrine een specifieke rol bij het intracellulaire ijzermetabolisme. Teneinde meer inzicht te verkrijgen over de functies van de verschillende beschreven componenten werd eerst nagegaan welke veranderingen preincubatie met INH in de ⁵⁹Fe-activiteit van de componenten induceert. In de ghostsuspensie bleek dat de totale ⁵⁹Fe-activiteit was toegenomen ten gevolge van een toename van de ⁵⁹Fe-activiteit in componenten A, B₁ en B₂ en in de meegeïsoleerde mitochondriën, zoals reeds beschreven is (3). Ondanks het feit dat veel ijzer in de mitochondriën van de cel werd opgeslagen, bleek dat de ⁵⁹Fe-activiteit van de hoog-moleculaire component I niet sterk toenam; wel nam de ⁵⁹Fe-activiteit van de laag-moleculaire component toe. Deze resultaten verschillen van die welke door Nunez et al. met konijnenreticulocyten werden verkregen, waar de ⁵⁹Fe in ferritine 20% van de totale activiteit van de cytosol bedroeg. Evenals wij vond ook Borova (10) dat bij incubatie van reticulocyten met transferrine en INH de hoeveelheid ⁵⁹Fe-activiteit in ferritine van de cytosol slechts gering toenam. Gezien het feit dat na incubatie met INH de ⁵⁹Fe-activiteit van de membraancomponenten B₁ en B₂ sterk toenam, alsmede de ⁵⁹Fe-activiteit in de mitochondriën sterk toenam, lijkt het minder waarschijnlijk dat de niet sterk in ⁵⁹Fe-activiteit veranderde hoog-moleculaire component (I) en laag-moleculaire component (IV) als intermediair fungeren tussen B₁, B₂ en de mitochondriën. De resultaten van de experimenten waarbij een met ⁵⁹Fe gemerkte hoog-moleculaire en laag-moleculaire

component met een hemolysaat/cytosol werden geïncubeerd bevestigden deze waarneming; in een reticulocyten hemolysaat, dat in aanwezigheid van een geschikte ijzerdonor (zie exp. onder i_7) in staat is hemoglobine te synthetiseren waren zowel de hoog-moleculaire als de laag-moleculaire component niet in staat ^{59}Fe aan mitochondriën af te geven en ^{59}Fe -heem te synthetiseren. Uit de experimenten met transferrine (zie onder i_2) bleek ook dit eiwit in hetzelfde incubatiesysteem niet in staat ^{59}Fe aan andere intracellulaire componenten of mitochondriën af te geven.

Samenvattend concludeerden wij op grond van de resultaten van incubatie-experimenten met reticulocyten hemolysaat dat geen van de geïsoleerde ijzer-bevatende componenten, die intracellulaire aanwezig zijn, als ijzerdonor voor de mitochondriën lijkt te fungeren.

In tegenstelling tot de beschreven intracellulaire componenten blijkt de geïsoleerde membraancomponent B_1 , in het incubatiesysteem van een reticulocyten hemolysaat, een goede ijzerdonor voor mitochondriën gezien het feit dat ^{59}Fe -hemoglobine door het incubatiesysteem geproduceerd wordt. Het bleek dat B_1 in direct contact met het hemolysaat gebracht moest worden om ^{59}Fe af te staan. Bovendien bleek dat indien een met ^{59}Fe gemerkte B_1 component in direct contact met een cytosol werd gebracht er bijna geen afgifte van ^{59}Fe aan cytosolcomponenten plaatsvond. De afgifte van ^{59}Fe -activiteit vanuit B_1 lijkt dan ook afhankelijk van het tegelijkertijd aanwezig zijn van cytosolcomponenten en mitochondriën. Dit zou verklaren waarom de reïncubatie van intacte reticulocyten en de incubatie van een cytosol met een gehele ghostsuspensie (die nog mitochondriën bevat) de ^{59}Fe -activiteit uit B_1 wel doet afnemen, terwijl incubatie van een gehele ghostsuspensie in Hanks' medium (zonder cytosolcomponenten) of van een geïsoleerde B_1 -component (zonder mitochondriën) met een cytosol geen afname van de ^{59}Fe -activiteit bewerkstelligt.

Component B_2 bleek niet in staat om direct ^{59}Fe af te geven ten behoeve van de hemoglobinesynthese; de reïncubatie-experimenten van de ghostsuspensie in Hanks' tonen aan dat er vanuit B_2 wel een ^{59}Fe -transport naar B_1 plaatsvond.

Onze hypothese is dan ook dat nadat transferrine aan de receptor B_2 is gebonden, ijzer van transferrine wordt afgesplitst en via de membraancomponent B_1 naar de mitochondriën wordt getransporteerd, zonder dat intracellulair transferrine, ferritine en een laag-moleculaire fractie een intermediaire functie in dit deel van het intracellulaire ijzertransport vervullen. Of de B_1 -component zijn ijzer direct aan de mitochondriën afgeeft, b.v. via afsplitsing uit de membraan, is nog een onbeantwoorde vraag. Zeer recent is namelijk gebleken dat in de cytosol van de rattenreticulocyt onder de component II/III zich nog een ijzer-bindende intracellulaire component bevindt ($M_r \sim 70.000$). Nader onderzoek zal moeten uitwijzen of deze component, die ook in de cytosol van de cavia trophoblast aanwezig is (persoonlijke mededeling van J.P. van Dijk), mogelijk gelijk is aan de recent door Nunez (9) in de konijnenreticulocyten beschreven ijzer-bindende cytosolcomponent met een relatieve molecuulmassa van circa 60.000. Tevens zal uit nader onderzoek moeten blijken of deze ijzer-bindende cytosolcomponent een transportfunctie tussen de membraancomponent B_1 en de mitochondriën vervult of mogelijk zelfs een afsplitsingsproduct van B_1 is.

Literatuur

1. JANDL, J.H. and KATZ, J.H. (1963). The plasma-to-cell cycle of transferrin. *J. Clin. Invest.* **42**, 314-326.
2. MORGAN, E.H. and APPLETON, T.C. (1969). Autoradiographic localization of ^{125}I -labelled transferrin rabbit reticulocytes. *Nature* **223**, 1371-1372.
3. SPEYER, B.E. and FIELDING, J. (1974). Chromatographic fractionation of human reticulocytes after uptake of doubly labelled ^{59}Fe , ^{125}I -transferrin. *Biochim. Biophys. Acta* **332**, 192-200.
4. WORKMAN, E.F. and BATES, G.W. (1974). Mobilization of iron from reticulocyte ghosts by cytoplasmic agents. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **58**, 787-794.
5. NUNEZ, M.T., GLASS, J. and ROBINSON, S.H. (1980). Mobilization of iron from the plasma membrane of the murine reticulocyte. *Biochim. Biophys. Acta* **509**, 170-180.
6. SULLIVAN, A.L., GRASSO, J.A. and WEINTRAUB, L.R. (1976). Micropinocytosis of transferrin by developing red cells: an electron-microscopic study utilizing ferritin-conjugated transferrin and ferritin-conjugated antibodies to transferrin. *Blood* **47**, 133-143.
7. ZAIL, S.S., CHARLTON, R.W., TORRANCE, J.D. and BOTHWELL, T.H. (1964). Studies on the formation of ferritin in red cell precursors. *J. Clin. Invest.* **43**, 670-680.
8. MAZUR, A. and CARLETON, A. (1963). Relation of ferritin iron to heme synthesis in marrow and reticulocytes. *J. Biol. Chem.* **238**, 1817-1824.
9. NUNEZ, M.T., CATE, E.S. and GLASS, J. (1980). Cytosol intermediates in the transport of iron. *Blood* **55**, 1051-1055.
10. BOROVA, J., PONKA, P. and NEUWIRT, J. (1973). Study of intracellular iron distribution in rabbit reticulocytes with normal and inhibited heme synthesis. *Biochem. Biophys. Acta* **32**, 143-156.
11. BLACKBURN, G.W. and MORGAN, E.H. (1977). Factors affecting iron and transferrin release from rabbit reticulocyte ghosts to cytosol. *Biochim. Biophys. Acta* **497**, 728-744.
12. NEUWIRT, J. and PONKA, P. (1977). In: *Regulation of Haemoglobin Synthesis* (Eds.: Neuwirt, J. and Ponka, P.). Uitg.: Martinus Nijhoff, Medical Division, The Hague.

Samenvatting

In dit proefschrift worden de resultaten beschreven van een onderzoek dat tot doel heeft een aantal fundamentele aspecten van de ijzeropname door voorlopers van de erythrocyt te bestuderen.

Hoofdstuk I geeft een overzicht van de literatuur betreffende het proces van de ijzeropname door voorlopers van de erythrocyt. De belangrijkste nog niet opgeloste vragen, welke zich bij dit ijzeropnameproces van de erythroblast voordoen, zijn:

- a) Bestaat er een functioneel verschil tussen de twee ijzerbindingsplaatsen van transferrine met betrekking tot de ijzerafgifte aan voorlopers van de erythrocyt?
- b) Wat zijn de functie en de samenstelling van de transferrine-receptor op de celmembraan van de voorlopers van de erythrocyt?
- c) Bestaan er ijzerbevattende plasmamembraancomponenten, die als intermediären tussen transferrine-ijzer en de bij het ijzermetabolisme betrokken intracellulaire componenten zouden kunnen fungeren?
- d) Wat zijn de functie en samenstelling van de bij het intracellulaire ijzermetabolisme betrokken componenten?

Met name de onder a t/m d genoemde punten vormen het onderwerp van het onderzoek dat neergelegd is in dit proefschrift.

Hoofdstuk II is gewijd aan de materialen en methoden die bij dit onderzoek regelmatig worden gebruikt. Methoden, die alleen betrekking hebben op de experimenten van een bepaald hoofdstuk, worden in dat betreffende hoofdstuk besproken. In hoofdstuk III wordt de ontwikkeling van een scheidingstechniek voor de vier voorkomende vormen van transferrine, te weten apo-Tf, TfFe(A), TfFe(B) en Tf₂Fe, beschreven. Tevens wordt in dit hoofdstuk ingegaan op de omstandigheden, die van invloed zijn op de vorming van TfFe(A) en TfFe(B), zoals de voor het opladen van transferrine gebruikte ijzerverbindingen en de ionaire samenstelling en pH van de voor het opladen gebruikte buffers. Het blijkt dat met de ontwikkelde methode, die gebruik maakt van een isoelektrische focuseringstechniek op "flat bed gels", de vier voorkomende vormen van transferrine goed van elkaar te scheiden zijn.

Met FeNTA als ijzerdonor en in een NTA/Na₃NTA-buffer als incubatiemedium blijkt het, afhankelijk van de pH van het incubatiemedium, mogelijk om een specifiek met TfFe(A) of TfFe(B) verrijkte oplossing te verkrijgen. Wel blijken de specifiek opgeladen TfFe(A) en TfFe(B) verontreinigd te zijn met apotransferrine, de andere monoferric transferrine en met diferric transferrine. Bij het specifiek opladen van transferrine blijken incubatietijd, incubatietemperatuur en incubatiemedium een belangrijke rol te spelen.

In hoofdstuk IV wordt een door ons ontwikkelde methode ter bereiding van zuiver TfFe(A) en zuiver TfFe(B) beschreven, daarbij gebruik makend van het in hoofdstuk III aangetoonde verschil in isoelektrisch punt tussen beide "monoferric" transferrinen. Met de ontwikkelde preparatieve isoelektrische focuseringstechniek

met een "granulated" gel, Ultrodex, is het mogelijk om zuiver monoferric TfFe(A) en zuiver monoferric TfFe(B) van elkaar te scheiden en te isoleren. Onder gunstige omstandigheden bedraagt de opbrengst 20%.

In hoofdstuk V worden de resultaten van het onderzoek naar een eventueel functioneel verschil tussen beide ijzerbindingsplaatsen van transferrine weergegeven. Volgens de zgn. Fletcher en Huehns hypothese zou de ene ijzerbindingsplaats van transferrine (A-plaats) ijzer vooral aan voorlopers van de erythrocyten afgeven, terwijl de andere ijzerbindingsplaats van transferrine (B-plaats) ijzer vooral aan de ijzeropslagplaatsen in het lichaam zou afstaan. Het blijkt dat bij het toetsen van de Fletcher en Huehns hypothese met zuivere, volgens de in de hoofdstuk IV beschreven methode verkregen, monoferric TfFe(A) en TfFe(B) geen aanwijzingen voor een functioneel verschil tussen beide ijzerbindingsplaatsen van transferrine worden gevonden.

Hoofdstuk VI bevat een beschrijving van de isolatiemethode van een transferrinemembraan-receptorcomplex van rattenreticulocyten. Immunofluorescentiestudies tonen aan dat in vivo, reeds in het proerytroblastenstadium, transferrine aan de buitenzijde van de membraan wordt gebonden. Fractionering van een in vitro met ^{125}I -transferrine- ^{59}Fe gemerkte reticulocyten ghostsuspensie over Sepharose-2B en Sepharose-6B resulteert in een aantal radioactieve ghostcomponenten. Op grond van het feit dat één van deze componenten, B₂ genoemd, praktisch alle ^{125}I -transferrine van de ghostsuspensie bevat, wordt gepostuleerd dat de ghostcomponent B₂ het transferrine-membraan-receptorcomplex bevat. Centrifugatiestudies in de analytische ultracentrifuge, alsmede immunologische studies tonen aan dat component B₂ nog heterogeen van samenstelling is. De betekenis en de herkomst van de overige, bij fractionering verkregen, ^{59}Fe -bevattende membraancomponenten, A en B₁ genoemd, wordt in hoofdstuk IX en hoofdstuk X beschreven.

In hoofdstuk VII worden de resultaten van een onderzoek naar de functionele betekenis van de geïsoleerde B₂-component als transferrine-receptor beschreven. In konijnen worden antilichamen opgewekt tegen de B₂-component; de geïsoleerde tegen de B₂-component gerichte immunoglobulinefractie is met behulp van affiniteitschromatografie gezuiverd van de antitransferrine antilichamen. Van dit "gezuiverde" anti-B₂ antilichaam zijn Fab-fragmenten bereid. Na preïncubatie met een reticulocytensuspensie blijken de Fab-fragmenten van het gezuiverde anti-B₂ antilichaam in staat een afname van zowel de transferrinebinding als de ijzeropname te bewerkstelligen; de afname van de ijzeropname is meer uitgesproken dan de afname van de transferrinebinding. Zowel de afname van transferrinebinding als van de ijzeropname was afhankelijk van de concentratie van de Fab-fragmenten in het preïncubatiemedium. De beschreven resultaten tonen het functionele belang van de geïsoleerde ghostcomponent B₂ in het proces van transferrinebinding en ijzeropname aan en rechtvaardigen de conclusie dat component B₂ de transferrine-receptor bevat.

Hoofdstuk VIII beschrijft de nadere karakterisering van de geïsoleerde transferrine-receptor. Met behulp van een polyacrylamide gel elektroforese met de geïsoleerde transferrine-receptor is vastgesteld dat de receptor gelocaliseerd is op een membraanpolypeptide met een relatieve molecuulmassa van circa $70\text{-}80 \cdot 10^3$. Door het selectief oplossen van de reticulocytenmembraan wordt verder geconstateerd dat dit polypeptide tot de minor, intrinsieke membraanpolypeptiden behoort en een hydrofobe binding heeft met de lipiden dubbellaag van de celmembraan.

Hoofdstuk IX beschrijft de invloed van de bereidingswijze en zuivering van de ghosts op de verschillende met ^{59}Fe - en/of ^{125}I -gemerkte componenten, geïsoleerd uit een ghostsuspensie. Het blijkt dat een reticulocyten ghostsuspensie geen zuivere celmembraansuspensie is, maar ook mitochondriën en lysosomen bevat. Na zuivering van de ghostsuspensie blijkt dat één van de geïsoleerde radioactieve componenten, de uitsluitend ^{59}Fe -activiteit bevattende A-component, geen membraancomponent is, maar een component van de met de membraan meegeïsoleerde mitochondriën. Uit de in dit hoofdstuk beschreven experimenten blijkt eveneens dat de uitsluitend ^{59}Fe -activiteit bevattende B₁-component wel een membraancomponent is, die mogelijk als intermediair fungeert in het transport van ijzer vanaf de transferrine-receptor naar het intracellulaire compartiment.

Hoofdstuk X beschrijft de componenten die bij het intracellulaire ijzermetabolisme van de reticulocyt betrokken zijn. Het blijkt dat bij dit ijzermetabolisme tenminste vier mogelijk vijf, of zelfs zes, componenten betrokken zijn, die ten dele konden worden gekarakteriseerd. Naast hemoglobine en ferritine spelen ook een hoog-moleculaire niet-ferritinecomponent en waarschijnlijk 2 laag-moleculaire componenten ($M_r < 10 \cdot 10^3$) en een eiwit met $M_r \sim 75 \cdot 10^3$ een rol bij het intracellulaire ijzermetabolisme van de reticulocyt.

In hoofdstuk X worden tevens de resultaten van experimenten beschreven die tot doel hadden de functies van de, bij het ijzermetabolisme van de reticulocyt betrokken, componenten nader te analyseren. Geen van de gekarakteriseerde, intracellulaire componenten lijkt direct als ijzerdonor voor de mitochondriën ten behoeve van de heemsynthese te fungeren. Voor het recent ontdekte ijzerbevattende intracellulaire eiwit met $M_r \sim 75 \cdot 10^3$ is de functie van ijzerdonor voor de mitochondriën niet nagegaan. Uit de in dit hoofdstuk beschreven resultaten blijkt tevens dat de membraancomponent B₁ ^{59}Fe opneemt van de transferrine-membraan-component B₂ en in aanwezigheid van een hemolysaat als goede ijzerdonor fungeert voor de mitochondriën ten behoeve van de hemoglobinesynthese. Of deze overdracht direct plaatsvindt (via brokstuk van B₁), dan wel indirect via het intracellulaire eiwit $M_r \sim 75 \cdot 10^3$ is nog onduidelijk. Zelfs zou het intracellulaire eiwit $M_r \sim 75 \cdot 10^3$ nog een brokstuk van B₁ kunnen zijn.

Summary

The aim of the investigation described in this thesis is to study some fundamental aspects of the iron uptake by erythroid cells.

In *Chapter I* a survey is given of the literature on the process of iron uptake by red cell precursors. The most important yet unsolved questions of this process are:

- a. Are the two binding sites of transferrin functional different with respect to the delivery of iron to red cell precursors.
- b. What is the function and what is the composition of the transferrin receptor on the membrane of red cell precursors.
- c. Do there exist iron containing plasma membrane components, which can function as intermediates between the transferrin bound iron and the intracellular components which are involved in the iron metabolism of the red cell?
- d. What is the function and what is the composition of the intracellular components, involved in the intracellular iron metabolism of red cell precursors.

In *Chapter II* the various techniques and materials are described which are regular used throughout the investigation. The techniques which are only related to experiments of a particular chapter are described in the chapter in question.

In *Chapter III* the development of a separation technique for the four known forms of transferrin, apo-TF, TfFe(A), TfFe(B) and Tf₂Fe is described. In this chapter we also describe the circumstances, which influence the production of TfFe(A) and TfFe(B), circumstances such as iron chelators, ionic strength and pH of the incubation buffers. With the method developed, an isoelectric focussing technique on flat bed gels, the four forms of transferrins can be separated. It is possible, under specific conditions of pH in a NTA/Na₃NTA buffer, with FeNTA as donor, to prepare monoferric TfFe(A) or TfFe(B). For the labelling of transferrin at one of the two metal binding sites not only pH, but also the time, temperature of incubation and the ionic strength of the medium are very important. The preferentially enriched monoferric transferrin preparations comprise next to the main monoferric component, the other monoferric component and to a certain degree diferric transferrin.

Chapter IV, Based on the differences in IEP of the two monoferric transferrins we developed a preparative isoelectric focussing method on granulated gels, Ultrodex, for the isolation of monoferric TfFe(A) and TfFe(B) on a mg level. The results of the investigations on a possible functional difference between the two iron binding sites of transferrin are presented in *chapter V*. According to the Fletcher and Huehns hypothesis transferrin would not behave as a homogeneous iron pool; one iron binding site, classified as A, would deliver its iron mainly to precursors of the red cells, whereas the other iron binding site, called B, would deliver its iron mainly to the iron storage pools. Using the pure monoferric transferrins in incubation experiments with reticulocytes and bone marrow cells we found no functional differences of the two binding sites of human transferrin for erythroid cells in vitro.

In *chapter VI* a description is given of the isolation method of a transferrin-membrane-receptor complex of rat reticulocytes. Immunofluorescence studies show that *in vivo* proerythroblasts have bound transferrin at the outside of the membrane. Fractionation of a ^{125}I -transferrin- ^{59}Fe labelled ghost-suspension of reticulocytes on Sepharose-2B and Sepharose-6B resulted in a number of radioactive ghost components. Based on the fact that one of these components, called B_2 , contains nearly all ^{125}I -transferrin of the ghost-suspension it is concluded that this ghost component represents the transferrin-membrane-receptor complex. Sedimentation analysis of component B_2 as well as immunochemical studies show heterogeneity of the component B_2 . The significance and origin of the other ^{59}Fe components, obtained after fractionation, called A and B_1 are described in *chapter IX* and X.

The functional role of the isolated B_2 -component as transferrin receptor is studied in *chapter VII*. Antibodies against the B_2 -component were raised in rabbits; anti-transferrin antibodies were removed from the antiserum raised to the B_2 -component by means of affinity chromatography on a transferrin-sepharose column. This purified anti- B_2 was divided in Fab- and Fc-fragments. Preincubation of a reticulocyte cell suspension with Fab-fragments from the purified anti- B_2 antibody resulted in a decrease in transferrin binding and iron-uptake. The decrease in iron-uptake is more pronounced than the decrease in transferrin binding. Both the decrease of transferrin binding and the decrease of iron uptake were dependent on the concentration of Fab-fragments in the incubation medium. These results show the functional importance of the isolated ghost component B_2 in the process of transferrin binding and iron uptake and justify the conclusion that the B_2 -component contains the transferrin receptor.

A characterization in detail of the isolated transferrin-receptor is described in *chapter VIII*. Polyacrylamide gel electrophoresis of this receptor complex show that the receptor is localised on a membrane polypeptide with $M_r \sim 70\text{-}80 \cdot 10^3$. Selective solubilization of the reticulocyte membrane indicates that this polypeptide belongs to the minor, integral membrane polypeptides and has a hydrophobic binding with the lipid bilayer of the membrane.

Chapter IX describes the influence of purification of the ghosts on ^{59}Fe iron containing components of the isolated ghost suspension. We have shown that a reticulocyte ghost suspension is contaminated with mitochondria and lysosomes. Purification of the ghost suspension reveals that the A-component, which contains only ^{59}Fe -activity, represents an intracellular product of mitochondrial and lysosomal origin, instead of a plasma membrane component. The other ghost component which contains only ^{59}Fe activity, B_1 , seems to be a real plasma membrane component. This component may function as an intermediate in the iron-transport between transferrin bound to its receptor on the plasma membrane and the iron-containing intracellular components.

In *chapter X* six components, which may be involved in the intracellular iron metabolism, are described and partly characterized. Besides hemoglobin and ferritin, a high molecular weight non-ferritin component, probably two low molecular weight components ($M_r < 10 \cdot 10^3$) and a protein with $M_r \sim 75 \cdot 10^3$ are involved in the intracellular iron metabolism of the reticulocyte. The results of the investigations, which had the object to analyse the functions of the components, are also presented in

chapter X. None of the characterized intracellular components seems to function as an iron donor for the mitochondria. The recently discovered intracellular protein with $M_r \sim 75 \cdot 10^3$ has not yet been marked as an iron donor for the mitochondria. From our results we conclude that membrane component B_1 takes up iron from the transferrin-receptor-membrane complex B_2 . In presence of a reticulocyte hemolysate component B_1 delivers its iron to the mitochondria in behalf of the heme synthesis. Whether this iron transfer occurs directly (by a splitting product of B_1) or indirectly by the intracellular protein with $M_r \sim 75 \cdot 10^3$ is not clear. It is even possible that this intracellular protein represents a splitting product of component B_1 .

Naschrift

In de eerste plaats wil ik mijn moeder bedanken voor de mij geboden gelegenheid mijn studie in de geneeskunde te volgen.

Dit proefschrift werd geheel bewerkt op de afdeling Chemische Pathologie, waar tijdens het keuzepracticum, dat een uniek onderdeel van de studie in de geneeskunde aan de faculteit der geneeskunde van de Erasmus Universiteit Rotterdam vormt, de basis werd gelegd voor dit werk. Na het keuzepracticum werd mij door de afdeling Chemische Pathologie gedurende de rest van mijn studie en mijn specialisatie de gelegenheid geboden om een aantal facetten van de ijzerstofwisseling nader te bewerken onder de begeleiding van Prof. Dr. H.G. van Eijk.

Hooggeleerde Van Eijk, beste Henk, in de eerste plaats wil ik je bedanken voor de zowel bij, maar met name ook buiten, het werk genoten vriendschap gedurende de afgelopen jaren. Bij het bewerken van dit onderwerp is het de gehele periode duidelijk waarneembaar geweest dat de ijzerstofwisseling ook jouw grote belangstelling heeft, hetgeen je echter geenszins weerhield mij een grote vrijheid te laten in het bewerken van deze materie. Door jouw enthousiasme over te dragen op anderen is er op de afdeling een groep mensen bijeen gebleven die onder jouw geestdriftige begeleiding met bijzonder veel plezier aan een aantal facetten van de ijzerstofwisseling werken.

Hooggeleerde Abels, beste Johan, ik bedank je voor de kritische opmerkingen die je als coreferent bij het manuscript hebt gemaakt en waarvan dankbaar gebruik gemaakt werd. Daarnaast past een woord van dank voor het feit dat je mij voortdurend in de gelegenheid gesteld hebt om naast de werkzaamheden op jouw afdeling ook het onderzoek in de ijzerstofwisseling te kunnen blijven verrichten.

Hooggeleerde Van Gool, ook U wil ik bedanken voor de kanttekeningen die U als coreferent en als kenner van een groot aantal aspecten van de ijzerstofwisseling bij het manuscript plaatste en waarvan eveneens dankbaar gebruik werd gemaakt.

Hooggeleerde Leijnse, U wil ik bedanken voor de geboden gastvrijheid op Uw instituut. Door mij als klinicus de gelegenheid te geven op een preklinisch instituut een onderwerp te bewerken op het grensgebied tussen de hematologie en biochemie droeg U daadwerkelijk bij aan de hoog geroemde integratie tussen kliniek en prekliniek.

Hooggeleerde Gerbrandy, U dank ik voor de onder Uw leiding genoten opleiding tot internist. Uw grote interesse in wetenschappelijk werk bracht met zich mee dat U mij tijdens de opleidingsperiode veel gelegenheid bood om een onderzoek dat in de "hoogbouw" gestart was tijdens mijn "klinische fase" te kunnen continueren.

Beste Martin Kroos, jij was de medewerker die mij in voor- en tegenspoed met je kritische instelling en je grote technische vaardigheden al die jaren het meest terzijde hebt gestaan. Hartelijk dank voor je grote inzet en de zeer plezierige samenwerking die hopelijk ook in de toekomst wordt gecontinueerd.

Ook Nel de Jeu-Jaspars en Wim van Noort hebben een essentiële bijdrage geleverd aan de tot stand koming van dit proefschrift. Wim zonder jouw hulp beschikten wij waarschijnlijk nog niet over zuiver monoferric transferrine.

Mevrouw E.M.W. van Zaal-de Korte verrichtte alle typewerk dat tenslotte resul-

teerde in het uiteindelijke manuscript. Beste Ella, hartelijk dank voor de bijzonder accurate en zeer plezierige wijze waarop je de afgelopen jaren de manuscripten voor de artikelen en tenslotte het manuscript voor dit proefschrift verzorgde. Ondanks voortdurende veranderingen in de tekst behield je steeds je goede humeur.

Voor het verrichten van werkzaamheden van uiteenlopende aard worden Jan Kruis en Ben van Bloppoel hartelijk bedankt.

Tenslotte wil ik mijn vrouw bedanken. Joke doordat jij begreep dat wetenschappelijk werk zeer veel tijd vergt was het mij mogelijk de afgelopen jaren, ongestoord, vele avonden en weekends in de "hoogbouw" door te brengen.

CURRICULUM VITAE

De schrijver van dit proefschrift werd op 30 januari 1948 geboren te Rotterdam. In 1966 behaalde hij het diploma HBS-B aan het Charlois Lyceum te Rotterdam.

In 1967 begon hij met de studie in de geneeskunde aan de toenmalige Medische Faculteit Rotterdam, alwaar in 1972 het doctoraal examen en in 1973 het arts-examen werden afgelegd.

In september 1973 ving zijn specialisatie in de Inwendige Geneeskunde aan op de afdeling Inwendige Geneeskunde I van het Academisch Ziekenhuis Dijkzigt te Rotterdam (hoofd: Prof. Dr. J. Gerbrandy), waarop in 1978 inschrijving in het specialistenregister volgde. Sinds januari 1979 is hij als internist verbonden aan de afdeling Hematologie van het Academisch Ziekenhuis Dijkzigt (hoofd: Prof. Dr. J. Abels).

