

## FERRITINE

ONDERZOEKINGEN OVER DE OPBOUW EN AFBRAAK VAN DEZE STOF  
IN VERBAND MET ZIJN FUNCTIE IN HET IJZERMETABOLISME



# FERRITINE

## ONDERZOEKINGEN OVER DE OPBOUW EN AFBRAAK VAN DEZE STOF IN VERBAND MET ZIJN FUNCTIE IN HET IJZERMETABOLISME

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR IN DE  
GENEESKUNDE  
AAN DE MEDISCHE FACULTEIT TE ROTTERDAM  
OP GEZAG VAN DE DEKAAN DR. J. MOLL  
HOGLERAAR IN DE FACULTEIT DER GENEESKUNDE  
TEGEN DE BEDENKINGEN VAN HET COLLEGE VAN DEKANEN  
UIT DE FACULTEIT DER GENEESKUNDE  
TE VERDEDIGEN OP  
WOENSDAG 7 JUNI 1972 TE 16.00 UUR PRECIES

DOOR

BERNARDUS KORNELIS VAN KREEL

GEBOREN TE ROZENBURG IN 1941

1972

BRONDER-OFFSET N.V. – ROTTERDAM

PROMOTOR: PROF. DR. B. LEIJNSE

COREFERENTEN: PROF. DR. W.C. HÜLSMANN  
DR. H.G. VAN EIJK

## INHOUD

	pag.
INLEIDING EN PROBLEEMSTELLING	9
HOOFDSTUK I	
LITERATUUR OVERZICHT.	12
Isolatie-methoden.	12
Het voorkomen van ferritine in diverse diersoorten, de verspreiding over de organen en het voorkomen in celfracties.	13
Structuur en fysische eigenschappen van ferritine.	15
Structuur en samenstelling van de micel.	17
Structuur van apoferritine.	18
Functies en gedrag van ferritine in het ijzermetabolisme.	20
HOOFDSTUK II	
MATERIALEN EN METHODEN.	29
Inleiding.	29
De analyse van monsters afkomstig van sucrose gradient-centrifugatie.	30
Radioactiviteits-metingen.	32
Bereiding van ferritine.	33
Chemicaliën en glaswerk.	35
Rattelever perfusie; het bereiden van de bij de perfusie gebruikte oplossingen.	35
HOOFDSTUK III	
ISOLATIE VAN FERRITINE.	37
Inleiding.	37
Werkwijze.	40

	pag.
Opbrengst.	42
De aard en de zuiverheid van het geïsoleerde ferritine.	44
 HOOFDSTUK IV	
SCHEIDING VAN FERRITINE EN APOFERRITINE DOOR MIDDEL VAN CENTRIFUGATIE IN EEN ISOKINETISCHE SUCROSE GRADIENT.	50
Inleiding.	50
Berekening van een isokinetische gradient voor de fractionering van ferritine.	51
Het constant volume "gradient makend" apparaat.	53
Berekening van de parameters $V_{mix}$ en $C_{res}$ door simulatie van een constant volume gradient apparaat met behulp van een R-C circuit.	54
Practische uitvoering van de berekening $V_{mix}$ en $C_{res}$ .	56
Scheiding van een paardemilt ferritine preparaat in apoferritine en ferritine fracties met een opklimmende Fe/N verhouding.	57
 HOOFDSTUK V	
DE INBOUW VAN [ $^{59}Fe$ ] FERRI(III)CITRAAT, [ $^{32}P$ ] ORTHOFOSFAAT EN AMINOZUREN ([ $^{75}Se$ ] SELEENMETHIONINE, [ $^{14}C$ ] ASPARAGINEZUUR, [ $^3H$ ] LEUCINE) IN KONIJNE- EN RATTELEVER FERRITINE.	59
Algemene inleiding.	59
De inbouw van intraveneus toegediend ijzer gemerkt met [ $^{59}Fe$ ] Fe(III)chloride in het ferritine van de konijnelever.	60
IJzerafgifte uit konijnelever ferritine als gevolg van een door bloedverlies ontstane anaemie.	63
Beschrijving van de bij de perfusie experimenten gevolgde werkwijze.	66
Incorporatie van [ $^{59}Fe$ ] Fe(III)citraat en [ $^{75}Se$ ] seleenmethionine in rattelever ferritine.	67
Incorporatie van [ $^{32}P$ ] orthofosfaat in rattelever ferritine.	71
Incorporatie van [ $^{14}C$ ] asparaginezuur in rattelever ferritine.	74
Incorporatie van [ $^{59}Fe$ ] Fe(III)citraat, [ $^{32}P$ ] orthofosfaat en [ $^3H$ ] leucine in rattelever ferritine.	76
 HOOFDSTUK VI	
ALGEMENE DISCUSSIE.	82

SAMENVATTING	pag. 89
SUMMARY	92
LITERATUUR-OPGAVE	94
NASCHRIFT	96





## INLEIDING EN PROBLEEMSTELLING

De duitse farmacoloog Schmiedenberg (1) was de eerste die in 1894 een ijzerhoudend eiwit beschreef dat geïsoleerd was uit varkenslever. Hij noemde dit ferratine. Zijn isolatie methode was echter dusdanig dat het hier geen zuiver eiwit betrof maar een mengsel van eiwitten en nucleïnezuren.

In 1909 beschreef Scaffidi (2) de bereiding uit varkenslever van een nucleoproteïne preparaat van de volgende samenstelling: 3,5% Fe, 3,3% P. Hierop voortbouwend hebben verschillende onderzoekers getracht om het nucleoproteïne ijzervrij in handen te krijgen, zonder veel succes echter. Een beter inzicht in de aard van het preparaat werd verkregen toen de probleemstelling door Laufberger (3) werd omgedraaid. Deze auteur trachtte de eiwit-ijzer verbinding van contaminerend nucleïnezuur te bevrijden. Zijn eerste pogingen, waarbij van paardelever werd uitgegaan bleven zonder succes. Pas nadat de paardelever werd vervangen door paardemilt slaagde hij er in een ijzerhoudend eiwit te isoleren dat hij ferritine noemde. Dit ferritine bevatte 20% ijzer, betrokken op drooggewicht en het hoge ijzergehalte bracht Laufberger er toe te veronderstellen dat ferritine betrokken zou zijn bij de opslag van ijzer in het lichaam. In dit verband was al eerder door Cook (17) en Asher (16) aangetoond dat in geval van snelle hemoglobine destructie in het lichaam, een ijzerhoudend pigment wordt gevormd in beenmerg, milt en lever, gepaard gaande met een ziektebeeld dat bekend staat onder de naam hemochromatosis. Na de publicatie van Laufberger in 1937 duurde het tot 1942 toen Granick (4) de isolatie van ferritine opnieuw ter hand nam en de fysisch-chemische eigenschappen van ferritine aan een nader onderzoek onderwierp.

Ondanks het vele onderzoek over ferritine dat sinds 1942 verricht wordt,

is zowel wat betreft de structuur van deze stof als de functie die het ferritine in de ijzerstofwisseling vervult, nog veel onbekend. Schema's betreffende de ijzerstofwisseling, zoals het in hoofdstuk I, §1 weergegeven bekende schema van Pollycove, suggereren een grotere kennis dan wij in feite bezitten. Wij besloten daarom in het kader van het uitgebreid onderzoek aangaande de ijzerstofwisseling, dat op de afdeling Chemische Pathologie van de Medische Faculteit Rotterdam plaatsvindt, aandacht te besteden aan het ferritine. In de eerste plaats leek het ons gewenst een diepgaand literatuur onderzoek te verrichten, hetgeen is neergelegd in het eerste hoofdstuk van deze dissertatie.

Ferritine is geen homogeen eiwit. Naast  $\alpha$ -ferritine komen  $\beta$ - en  $\gamma$ -ferritinen voor, waarschijnlijk zijn  $\beta$ - en  $\gamma$ -ferritine, di- respectievelijk trimeren van het monomeer  $\alpha$ -ferritine. Het leek gewenst  $\beta$ - en  $\gamma$ -ferritine in een zodanige hoeveelheid naast het  $\alpha$ -ferritine te isoleren, dat een analyse van de Fe/N en Fe/P verhoudingen mogelijk zou zijn. Dit met het doel nader bewijsmateriaal te vinden voor de opvatting dat het  $\beta$ -ferritine een dimeer en het  $\gamma$ -ferritine een trimeer van het  $\alpha$ -ferritine is.

Wij meenden tevens de inhomogeniteit van het ferritine met de iso-electrische focuseringstechniek te moeten nagaan. Een opvallende eigenschap van het ferritine is het feit dat het met gradient centrifugatie kan worden gesplitst in fracties met een Fe/N verhouding die oploopt van 0 mg Fe/mg N tot ruim 3 mg Fe/mg N. Teneinde dit fenomeen goed te kunnen bestuderen trachten wij een isolatie methode voor ferritine te ontwikkelen, waarbij slecht  $\alpha$ -ferritine werd verkregen, en wel zodanig dat de diverse fracties met oplopende Fe/N verhouding een ongeveer gelijke opbrengst zouden geven. Aan dit punt werd tot nu toe geen aandacht besteed in de literatuur. De gebruikelijke scheiding van ferritinepreparaten in fracties met oplopende Fe/N verhouding via een gradient centrifugatie met een lineaire sucrose gradient zoals o. a. door Drysdale werd toegepast, is onvoldoende. Zo is het niet gelukt de apoferritine fractie volledig te scheiden van ferritine fracties met een laag ijzergehalte. Voor ons verder onderzoek was deze scheiding echter van belang gezien de functie van het apoferritine bij de vorming van ferritine. Wij meenden dat de techniek van de isokinetische gradient centrifugatie voordelen zou kunnen bieden boven die van de lineaire gradient centrifugatie. Zoals reeds eerder werd vermeld, was het uiteindelijke doel van ons onderzoek meer gegevens te verzamelen over de rol die ferritine vervult in het ijzermetabolisme. Wij hebben getracht ons inzicht hierin te verdiepen door de inbouw van aminozuren, ijzer en fosfaat in het ferritine te bestuderen. In de literatuur zijn wat betreft de fosfaatincorporatie geen ge-

gegevens bekend. In eerste instantie hebben wij getracht onze experimenten te verrichten met intacte proefdieren. Teneinde meer kwantitatieve gegevens te kunnen verzamelen besloten wij de incorporaties ook d. m. v. leverperfusies te bestuderen. Uit de verkregen resultaten hoopten wij bestaande theorieën aangaande de vorming van ferritine te kunnen aanvullen of modificeren.

## HOOFDSTUK I

### LITERATUUROVERZICHT

#### § 1. ISOLATIEMETHODEN

De eerste isolatie-methode voor een gezuiverd ferritine preparaat stamt van Laufberger (3). Deze isolatie van ferritine uit paardemilt valt in drie delen te splitsen:

- 1e. Verwijdering van de meeste eiwitten door verhitting van het fijn gemaakte miltweefsel tot 80°C.
- 2e. Concentratie en verdere zuivering van het ferritine, door de ferritine-bevattende oplossing tot 50% met ammoniumsulfaat te verzadigen, waardoor het ferritine neerslaat.
- 3e. Specifieke kristallisatie van het ferritine door middel van  $\text{CdSO}_4$ .

De op deze wijze uit verschillende paardemilten geïsoleerde ferritines, hadden alle de volgende constante samenstelling: 9,9% N; 20% Fe; 0,9% P betrokken op drooggewicht.

Toen Laufberger (3) trachtte op identieke wijze ferritine te isoleren uit paardelever, was hij genoodzaakt enkele extra stappen aan het schema voor de isolatie van ferritine uit paardemilt toe te voegen. Stap 1 moest worden voorafgegaan door een precipitatie bij pH=4 door het toevoegen van azijnzuur. Aan het supernatans werd vervolgens 30 g ammoniumsulfaat per 100 ml toegevoegd en het aldus gevormde neerslag werd opgelost en verder behandeld als voor paardemilt-ferritine. In 1942 publiceerde S. Granick (4) een methode om paardemilt-ferritine te isoleren, die zich in wezen niet van de methode van Laufberger onderscheidt. Ook thans wordt de methode van Granick nog algemeen gebruikt

om paardemilt-ferritine te isoleren. Het handelspreparaat is paardemilt-ferritine bereid volgens de methode van Granick.

De opbrengst aan ferritine, geïsoleerd volgens de methode van Granick, wordt algemeen als gering opgegeven. Exacte gegevens dienaangaande zijn niet aanwezig in de literatuur. Vandaar dat verschillende onderzoekers naar andere methoden hebben gezocht om ferritine in hogere opbrengst in handen te krijgen. Hierbij dient te worden opgemerkt dat voornamelijk de kristallisatie voor de lage opbrengst verantwoordelijk wordt gesteld. Uiteraard is ook de hitte-behandeling een dubieus punt en het is mogelijk dat de eigenschappen van ferritine er door veranderen. Ook dit gaf aanleiding andere isolatie-methoden voor het ferritine te beproeven. De methode beschreven door Drysdale (44) bestaat uit het verhitten van een homogenaat tot 80°C, gevolgd door een iso-electrische precipitatie bij pH 4,8. Hierna volgt chromatografie van het supernatans over C. M. Cellulose en gelfiltratie over Sephadex G200. Gabuzda (52) ontwikkelde een isolatieprocedure waarbij na het verhitten tot 80°C het supernatans 16 uur bij 55.000 x g werd afgedraaid. Het verkregen precipitaat werd vervolgens aan dichtheidscentrifugatie in een sucrosegradient onderworpen. Tenslotte beschreef A. Surran (43) een methode om paardemilt-ferritine te isoleren, waarbij stap I van de methode van Granick (4) vervangen was door een langdurige extractie van het homogenaat bij pH 4,7. Ze stelde vast dat de hitte-behandeling geen invloed heeft op de electroforetische eigenschappen van ferritine.

Zoals gesteld, zijn bovengenoemde technieken ontwikkeld met het doel een hogere opbrengst te verkrijgen dan met de klassieke methode van Granick mogelijk is. Opmerkelijk is, dat de auteurs zich er niet over uitlaten in hoeverre dit doel bereikt is. Over het algemeen neemt men aan dat het ijzer dat in het supernatans na de hitte-behandeling aanwezig is, afkomstig is van ferritine (44). Ons eigen onderzoek betreffende het rendement van de ferritine-isolatie komt ter sprake in hoofdstuk III.

## § 2. HET VOORKOMEN VAN FERRITINE IN DIVERSE DIERSOORTEN, DE VERSPREIDING OVER DE ORGANEN EN HET VOORKOMEN IN CELFRACTIES

Behalve in milt en lever van het paard is ferritine ook aangetoond in deze organen bij andere diersoorten, b.v. bij konijn, rat, guinees biggetje en de mens.

Ook is vastgesteld dat ferritine in enkele andere organen aanwezig is, zowel bij het paard als bij de andere diersoorten. Het één en ander werd nagegaan door Granick (8), de resultaten van dit onderzoek zijn weergegeven in tabel I, 1.

Tabel I, 1.

soort:	milt:	lever:	beenmerg:
paard	++++	+	+++
mens	++	+++	++
hond	+	++	0
cavia	+	++	0
muis	+	+	-
rat	+	+	-
konijn	+	0	0
kat	0	0	-

Relatief voorkomen van ferritine in organen van verschillende diersoorten (8).

Rangschikt men voor het paard de organen volgens aflopend ferritinegehalte, dan ontstaat de volgende reeks: milt> beenmerg> lever> testis> nier> bijnier> pancreas> ovarium> lymfhe-klier, terwijl geen ferritine in bloed, maagwand en spier kon worden aangetoond. Latere onderzoekingen (13) wezen uit dat ook ferritine in geringe hoeveelheden voorkomt in de mucosa van de dunne darm. Uit het werk van Pearson (48) is gebleken dat in de mucosa-cellen van het duodenum van de rat een tweede eiwitfractie voorkomt die in staat is ijzer te binden; het betreft hier echter een ander eiwit dan ferritine.

Door Granick (8) is aangetoond dat ferritines uit verschillende organen van één diersoort immunologische overeenkomst vertonen. Dat er toch een zekere orgaanspecificiteit bij ferritine bestaat, wordt duidelijk door het werk van o. a. C.P. Alfrey (53). De in de mens voorkomende ferritines in lever, milt en reticulocyten gedragen zich verschillend bij electroforese op cellulose-acetaat. Ferritine geïsoleerd uit beenmerg blijkt uit twee componenten te bestaan, waarvan de één, wat het electroforetische gedrag betreft, overeenkomt met ferritine uit de milt en de ander met dat uit reticulocyten. In hart, bijnier en hersenen komen ook 2 isoferritines voor, zoals door Lynch (70) is aangetoond. Ook bij het konijn bevinden zich twee soorten ferritines in het beenmerg (isoferritines), hetgeen werd aangetoond door Gabuzda (47). Een konijn werd ingespoten met, door middel van  $^{55}\text{Fe}$  gemerkte reticulocyten en tegelijkertijd met, door middel van  $^{59}\text{Fe}$  gemerkt transferrine. Na isolatie van ferritine uit diverse organen en electroforese op zetmeelgel, bleek dat in lever en milt de  $^{55}\text{Fe}$  en  $^{59}\text{Fe}$  pieken samenvallen. Het ferritine, geïsoleerd uit beenmerg, vertoonde echter twee pieken. De  $^{55}\text{Fe}$  piek viel samen met de  $^{55}\text{Fe}$  en  $^{59}\text{Fe}$  piek van de ferritines uit lever en milt. De  $^{59}\text{Fe}$  piek van het ferritine uit beenmerg daarentegen had sneller gelopen. Gabuzda concludeerde hieruit dat in lever, milt en beenmerg

"katabool ferritine" voorkomt, waarvan de functie zou zijn ijzer uit afgebroken erythrocyten op te nemen; terwijl in het beenmerg ook "anabool ferritine" voorkomt, dat ijzer uit transferrine zou opnemen en doorgeven aan de bloedvormende cellen van het beenmerg.

Kuff (23) onderzocht in welke celfractie het ferritine van de rattelever voorkomt. Daartoe centrifugeerde hij een homogenaat van rattelever in 0,2 molair sucrose en stelde vast dat het ferritine zich overwegend in de cytoplasmafractie bevond. Dit resultaat kon worden bevestigd door electronen-microscopische opnamen van levercoupes. Arstila (26) vond echter dat behalve in het cytoplasma van de rattelevercel ook in de lysosomen ferritine voorkomt. Beide onderzoekers konden geen ferritine in kernen en mitochondria aantonen.

### § 3. STRUKTUUR EN FYSISCHE EIGENSCHAPPEN VAN FERRITINE

Het eerste, door Laufberger (3) gekarakteriseerde paardemilt-ferritine had de volgende constante samenstelling: 9,9% N; 20% Fe; 0,9% P betrokken op drooggewicht. Dit komt overeen met een Fe/N verhouding van 2 en een Fe/P verhouding van 20. Laufberger liet zich niet expliciet uit over het vraagstuk van de zuiverheid van zijn preparaat. Maar uit de inhoud van zijn artikel menen wij te mogen opmaken dat hij, waarschijnlijk op grond van het feit dat het preparaat via kristallisatie werd bereid en een constante samenstelling had, meende met een zuivere stof te doen te hebben. Later werden door Granick (4) ook verschillende ferritine preparaten geanalyseerd. De resultaten hiervan zijn samengevat in tabel I, 2 Granick nam in zijn analyses ook de moederloog op die overblijft

Tabel I, 2.

preparaat:	Fe	P	N	Fe/N	Fe/P
I. 2 x gekristalliseerd	22,7	1,60	10,5	2,4	14
II. 3 x gekristalliseerd en dialyse	22,8	1,26			18
III. 4 x gekristalliseerd	20,2	1,42	11,1	1,8	14
IV. 1 x gekristalliseerd van een paard dat grote hoeveelheden bloed had verloren	23,1	1,99	12,6	1,8	11
V. neergeslagen met Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> geen kristallisatie	24,5	1,45	11,0	2,2	17
VI. "non crystallizable ferritin" van moeder loog	20,2	1,52	9,1	2,2	13

Analyses van paardemilt-ferritine in % droog gewicht (4).

na kristallisatie van het ferritine met  $\text{CdSO}_4$ . De overeenkomst die dit moederloog vertoont wat betreft de Fe/N en Fe/P verhoudingen met het gekristalliseerd product, bracht Granick ertoe deze moederloog de naam "Non Crystallizable Ferritin", afgekort N. C. F., te geven. Dat het ferritine een entiteit zou kunnen zijn, werd afgeleid uit het feit dat ferritine zich homogeen gedraagt tijdens electroforese in een Tiselius electroforese-opstelling (20).

Door Rothen (5) werd het gedrag van ferritine in de ultracentrifuge nagegaan. Hierbij bleek 20% van een ferritine-preparaat te bestaan uit een eiwitfractie die een symmetrische piek te zien gaf. Deze fractie bevatte geen ijzer en had een mol. massa van 465.000. De rest van het ferritine was ijzerhoudend en gaf een langgerekt diffuus patroon in de ultracentrifuge.

Eerder waren Granick en medewerkers (6) erin geslaagd ferritine van zijn ijzer en fosfaat te ontdoen door reductie met dithioniet bij pH 4,5. Het zo ontstane kunstmatige apoferritine gedroeg zich identiek met de eerdergenoemde ijzerloze fractie die in ferritine voorkomt, zoals blijkt bij ultracentrifugatie (5). Het is opvallend dat in diverse preparaten van b.v. paardemilt-ferritine de Fe/N verhouding nagenoeg gelijk is. De Fe/P verhouding is echter variabel.

Volgens Mazur (20) kan men paardemilt-ferritine gefractioneerd precipiteren met ammoniumsulfaat. De fracties die het eerst worden geprecipiteerd, hebben een hoge Fe/N verhouding, terwijl de laatst neergeslagen fractie een lage Fe/N verhouding heeft. Echter de Fe/P verhouding is in alle neergeslagen fracties gelijk. De resistentie van ferritine tegen de werking van proteolytische enzymen is sterk afhankelijk van de Fe/N verhouding; apoferritine wordt relatief gemakkelijk gehydrolyseerd, terwijl ferritine veel moeilijker te splitsen is.

De aard van de binding van de ferritine-micel aan het apoferritine is volledig onbekend. Uit de proeven met proteolytische enzymen blijkt duidelijk dat de micel het eiwitgedeelte van ferritine stabiliseert. Dat een groot aantal aminozuren niet sterk gebonden is aan de micel, blijkt door titratie van ferritine. Muraoka (45) vond bij titratie van konijnelever-ferritine 88 vrije zure groepen en in totaal 53 vrije basische groepen. Tenslotte moet worden vermeld dat ferritine in twee kristalvormen voorkomt, één vorm is isotroop, de andere anisotroop. Apoferritine komt echter alleen voor in de isotrope vorm (28).

Behalve inhomogeniteit die het ferritine geeft, als het wordt onderworpen aan gradient centrifugatie, treedt ook een inhomogeniteit aan het licht als het iso-electrisch punt van het ferritine met behulp van iso-electrische focussing wordt bepaald. Duidelijk werd dat het ferritine splitst in tenminste 4 fracties met verschillende iso-electrische punten (86, 87).



#### § 4. STRUKTUUR EN SAMENSTELLING VAN DE MICEL

Teneinde de bindingstoestand van het ijzer in de micel na te gaan, werden door L. Michaelis en S. Granick (7) de magnetische eigenschappen van paarde-milt-ferritine onderzocht. Het ijzer in ferritine bleek een magnetisch moment te hebben van 3,87 Bohr Magnetonen. Neemt men aan dat dit magnetisch moment voornamelijk afkomstig is van de spin der ongepaarde electronen, dan vindt men met behulp van de formule  $\mu = \sqrt{n(n+2)}$  B.M. een aantal van  $n = 3$  ongepaarde electronen. Voor de overige bindingselectronen moet men dan een  $dsp^2$  hybridisatie aannemen en de vorming van 4 covalente bindingen. S. Granick en P. F. Hahn (10) stellen dat dit magnetisch moment niet ontstaat door binding van het ijzer aan eiwit, want indien men ferritine behandelt met 1 molair loog, dan komt Fe(III)hydroxyde vrij uit het ferritine terwijl het magnetisch moment identiek is aan dat van ferritine. Deze onderzoekers stelden de volgende formule voor de intacte micel voor:  $Fe(OOH)_8(FeO-OPO_3H_2)$ . Gebruikmakend van de door Rothen (5) gevonden waarde voor de dichtheid van apoferritine ( $sm = 1,34$  g/ml) en van ferritine ( $sm = 1,75$  g/ml: 23% Fe) berekent men dat de micel tot 38% van het gewicht van een ferritine molecuul kan uitmaken en dat de dichtheid van een dergelijke micel 3,50 g/ml bedraagt.

Granick en Hahn (10) onderzochten ook de manier waarop het fosfaat in de micel gebonden is. Behandelden zij ferritine met 1 molair loog, dan vonden deze onderzoekers dat 75% van het fosfaat in het supernatans als anorganisch fosfaat terecht komt, terwijl de rest zich in het neergeslagen Fe(III)hydroxyde bevindt. Incubatie van ferritine en apoferritine met radioactief fosfaat toonde aan dat slechts een zeer geringe hoeveelheid fosfaat aan ferritine en apoferritine werd geadsorbeerd.

Tracht men ferritine van zijn fosfaat te ontdoen, door het gedurende enige dagen in contact te brengen met een oplossing van ammonium-magnesiumcitraat, dan blijkt dat zowel ijzer als fosfaat uit het ferritine verdwijnen en tevens dat fosfaat dit sneller doet dan ijzer. Als alle fosfaat onafhankelijk van het ijzer in de micel zou zijn gebonden, zou men een veel grotere stijging van de Fe/P verhouding van het ferritine verwachten dan de waargenomen stijging. Volgens Granick (60) is alle fosfaat als orthofosfaat in de micel aanwezig. Behandelt men ferritine met 1 molair HCl dan komt alle fosfaat binnen enkele minuten als orthofosfaat vrij.

Indien men aan een ferritine-oplossing bij pH 7,4  $\alpha'$ -dipyridyl toevoegt en na 10 minuten incubatie bij kamertemperatuur het ferritine neerslaat met een

gelijk volume verzadigde ammoniumsulfaat-oplossing, dan kan het als Fe(II) aanwezige ijzer bepaald worden (22). Het blijkt dat de verhouding concentratie Fe(II)/concentratie Fe(II) + Fe(III) ongeveer  $0,25 \times 10^{-3}$  bedraagt. Het relatieve Fe(II) gehalte stijgt indien men het ferritine-preparaat verdunt en de concentratie dipyridyl constant houdt. Mazur en Schorr (22) schrijven dit toe aan een competitie voor het Fe(II) tussen ferritine en dipyridyl. Zij vonden tevens dat de Fe(II)-N verhouding niet afhangt van de Fe(III)-N verhouding en een constante waarde heeft. Deze waarnemingen suggereren dat het Fe(II) direct aan functionele groepen van het eiwit gebonden is. Volgens Mazur en Schorr zijn de -SH-groepen hiervoor verantwoordelijk.

Electronenmicroscopische opnamen van ferritine-moleculen geven de indruk dat de micel is opgebouwd uit 6 sub-units (33, 34). Uit de resultaten verkregen door middel van röntgendiffractie, kan echter geen bevestiging verkregen worden voor de aanwezigheid van sub-units (28). Deze laatste opvatting zou te rijmen zijn met de stelling dat apoferritine met continue toenemende hoeveelheden ijzer oplaadbaar is tot een gehalte van 20% ijzer.

## § 5. STRUCTUUR VAN APOFERRITINE

Sinds door Granick (6) was gevonden dat het eiwitgedeelte van ferritine van de micel kan worden ontdaan door reductie met dithioniet, is veel onderzoek verricht aangaande de eigenschappen van dit eiwit. Zoals reeds eerder opgemerkt werd (5) bestaat een ferritine-preparaat voor ongeveer 20% uit een zich in de ultracentrifuge homogeen gedragend eiwit "apoferritine" genaamd. De relatieve mol. massa bedraagt 465.000. Dit eiwit gedraagt zich in de centrifuge identiek met apoferritine, dat verkregen was door reductie. Op grond van andere criteria bestaan wel verschillen tussen "natuurlijk" apoferritine en het door reductie verkregen apoferritine. Zo vond Kopp (42) dat gereduceerd apoferritine door middel van zetmeelgel-electroforese te splitsen is in 3 banden, respectievelijk genoemd  $\alpha$ -,  $\beta$ - en  $\gamma$ -ferritine. "Natuurlijk" apoferritine geeft echter slechts één band die identiek is met de  $\alpha$ -band van gereduceerd apoferritine. Worden de  $\alpha$ -,  $\beta$ - en  $\gamma$ -banden, verkregen door zetmeelgel-electroforese van gereduceerd apoferritine, onderworpen aan ultracentrifugatie, dan gedragen de fracties zich homogeen met de volgende sedimentatie constanten (35, 43):  $\alpha = 18S$ ;  $\beta = 26S$ ; en  $\gamma = 34S$ . Neemt men aan dat  $S \sim \sqrt{(mg)^3}$ , dan moet men veronderstellen dat de  $\beta$ - en  $\gamma$ -fracties di-, respectievelijk trimeren van de  $\alpha$ -fractie zijn.

De aard van de binding die verantwoordelijk zijn voor het vormen van polymeren van ferritine zijn onbekend. Waterstofbruggen zijn waarschijnlijk niet belangrijk omdat electroforese van ferritine in ureum hetzelfde patroon geeft. Het evenwicht tussen  $\alpha$ -,  $\beta$ - en  $\gamma$ -ferritine werd door middel van lichtverstrooiing (55) bestudeerd. De gevonden waarden voor de  $\Delta F^0$  van de evenwichten  $2\alpha = \beta$  en  $3\alpha = \gamma$  zijn echter ons inziens geen maat voor het al of niet aanwezig zijn van covalente bindingen. De  $\Delta H^0$  is een betere maat voor deze bindingsenergie.

Indien men natuurlijk apoferritine door middel van optische rotatie dispersie vergelijkt met gereduceerd apoferritine, dan blijkt de hoeveelheid  $\alpha$ -helix in gereduceerd apoferritine toegenomen te zijn ten opzichte van de hoeveelheid  $\alpha$ -helix in natuurlijk apoferritine (46).

Aminozuur-analyses werden door diverse onderzoekers verricht voor apoferritine afkomstig uit diverse diersoorten. De analyses zijn samengevat in tabel I, 3 (45). Pogingen om een N-eindstandig aminozuur aan te tonen, bleven zonder succes totdat Surran (43) erin slaagde na hydrolyse van paardemilt-apoferritine met trypsine een ninhydrine negatief, arginine positief peptide te

Tabel I, 3.

	Konijn (lever)	Paard (milt)	Hond (lever)
Aminozuur	Aminozuur samenstelling in g per 100 g eiwit		
Lysine	2,04	2,97	8,34
Histidine	2,32	1,98	5,27
Ammonia	--	--	--
Arginine	2,44	3,56	8,31
Asparagine	14,48	15,75	12,93
Threonine	4,36	3,84	3,82
Serine	5,52	5,36	4,56
Glutaminezuur	17,72	20,57	16,75
Proline	4,12	--	1,68
Glycine	4,12	4,68	4,89
Alanine	6,72	6,71	6,90
Cystefne	--	--	--
Valine	4,84	5,40	0,27
Methionine	2,32	1,94	0,33
Isoleucine	2,72	3,06	2,28
Leucine	6,68	9,77	15,48
Tyrosine	5,64	5,58	3,41
Fenylalanine	6,24	8,24	5,23
Tryptofaan	--	--	--
	92,20	99,40	100,21

Aminozuur samenstelling van konijnlever ferritine vergeleken met die van paardemilt en hondeliver. Volgens N. Muraoka (45).

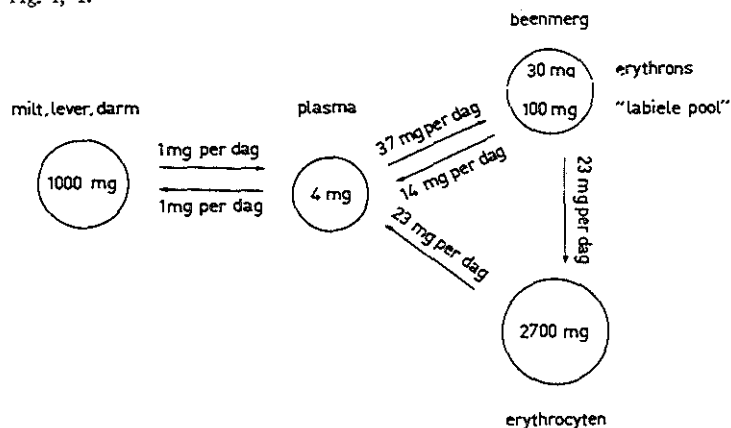
isoleren, waarvan werd aangetoond dat het eindstandig aminozuur N-acetylserine was.

Eerder was door Harrison (35) aannemelijk gemaakt door middel van hydrolyse met trypsine, dat apoferritine uit 20 identieke sub-units bestaat. Deze resultaten waren in overeenstemming met röntgendiffractie experimenten door dezelfde onderzoeker verricht (36). Dissociatie van apoferritine in zijn sub-units kon worden bewerkstelligd door een gevriesdroogd preparaat met natriumdodecylsulfaat te behandelen (37). Deze sub-units hadden een relatieve mol. massa van 27.000 zoals werd bepaald met de analytische ultracentrifuge, terwijl de theoretische waarde voor de molecuul massa van een sub-unit 23.000, nl. 1/20 van het totaal, bedraagt. Dialyseert men een oplossing van sub-units in het detergens tegen water, dan ontstaan deeltjes die zich identiek aan apoferritine gedragen indien ze worden onderworpen aan zetmeelgel-electroforese (58). De resultaten van deze proeven maken aannemelijk dat voor de vorming van apoferritine geen ijzerhydroxyde micel als matrix nodig is.

## § 6. FUNCTIES EN GEDRAG VAN FERRITINE IN HET IJZERMETABOLISME

De rol die ferritine vervult in het ijzermetabolisme van de mens is schematisch weergegeven in onderstaande figuur (75).

Fig. I, 1.



Verdeling en kinetiek van ijzer in vivo volgens Pollycove (75).

Achtereenvolgens zullen de volgende punten besproken worden:

- A. Absorptie van ijzer door de dunne darm en de rol die ferritine hierbij vervult.
- B. Ferritine synthese en afbraak in de lever.
- C. Het mechanisme van de ijzeropname en afgifte door ferritine, speciaal in de lever.

A. Absorptie van ijzer door de dunne darm en de rol die ferritine hierbij vervult.

Over de rol van ferritine in de absorptie van ijzer in de dunne darm valt het volgende op te merken.

Zoals gebleken is uit het werk van McCane (11) en Greenberg (12) gedraagt ijzer zich anders in het lichaam dan b. v. natrium en kalium. Deze laatste worden door de darm geheel opgenomen, terwijl een overmaat door de nieren wordt uitgescheiden, waardoor het handhaven van een nauwkeurig evenwicht wordt bereikt.

Ijzer daarentegen wordt niet altijd volledig opgenomen, terwijl slechts zeer weinig door het lichaam kan worden uitgescheiden via de nieren en eventueel de gal. Eén en ander leidt tot een gebrekkige regulatie van het evenwicht tussen opname en verlies van ijzer.

De mogelijke rol die ferritine, voorkomend in de mucosa-cellen, bij de absorptie van ijzer uit de dunne darm zou kunnen spelen, werd het eerst nagegaan door Granick (13). Indien guinese biggetjes een dieet kregen waaraan Fe(II)-sulfaat was toegevoegd, bleek dat het ferritine-gehalte van de mucosa aanmerkelijk steeg om zeven uur na de toediening een verzadigingsniveau bereikt te hebben. Absorptie-experimenten met radioactief ijzer (14) wezen uit dat een groot gedeelte van de label in de ferritinefractie van de mucosa-cellen terecht komt. Aan de hand van de resultaten van bovengenoemde experimenten stelden Granick (13) en Hahn (14) de volgende hypothese voor de ijzer-absorptie op:

In de mucosa-cellen is een snelle turnover van apoferritine. Ijzer in de tweewaardige vorm dringt de cellen binnen en wordt al naar gelang de behoefte opgenomen in ferritine. Dit ferritine heeft ten opzichte van apoferritine een lage turnover. Op deze wijze wordt een evenwicht bereikt in de mucosa-cel tussen het Fe(II)-ion en Fe(III) gebonden aan ferritine. Bij het bereiken van dit evenwicht raakt de cel verzadigd met Fe(II) en wordt geen ijzer meer door de cel opgenomen. Er treedt een toestand van verzadiging op, het zgn. "mucosal block". De mucosa-cel fungeert als een tijdelijke opslagplaats voor geabsor-

beerd ijzer. Het opgeslagen ijzer kan worden geutiliseerd, d. w. z. in de bloedbaan geraken, of met de faeces worden uitgescheiden als de mucosa-cel te gronde gaat.

Volgens Wiltink (68) is het waarschijnlijk dat slechts een bepaalde hoeveelheid van het ijzer dat zich in de mucosa-cellen bevindt kan worden geutiliseerd, zodat de utilisatie - hier gedefinieerd als "de totale hoeveelheid radioactief ijzer in de erythrocyten, 8 dagen na oraal toedienen van een dosis gemerkt ijzer, uitgedrukt in een percentage van het geabsorbeerde ijzer" - niet als maat voor de absorptie kan worden gehanteerd. Wiltink vond tevens dat Fe(III) en Fe(II) zouten in gelijke mate worden geresorbeerd, maar dat de utilisatie van Fe(II) zouten groter is dan die van Fe(III) zouten. Door veel onderzoekers (56, 67, 66, 39) is in het verleden dit verschil tussen absorptie en utilisatie niet onderkend. Zij maten in feite de utilisatie en noemden dit absorptie. Dit moet in aanmerking genomen worden bij de beoordeling van de bovenstaande literatuurreferenties.

Welke factoren verantwoordelijk zijn voor de mate van resorptie van ijzer, is nog niet bekend. Wel is gevonden dat de pancreas een factor uitscheidt, die remmend werkt op de ijzerresorptie (66), gemeten d. m. v. de utilisatiesnelheid.

Patienten met een chronische pancreatitis vertonen dan ook een verhoogde ijzerresorptie, gemeten d. m. v. de utilisatiesnelheid. Gezien de gebruikte meetmethodes en de gegevens verkregen door Wiltink (68), staat het niet vast dat dit toe te schrijven is aan een veranderde resorptie.

## B. Ferritine synthese en afbraak in de lever.

Toen in 1939 door Laufberger (3) voor het eerst ferritine werd geïsoleerd en geanalyseerd, nam hij aan dat ferritine betrokken zou zijn bij de opslag van ijzer in het lichaam vanwege het zeer grote ijzergehalte van ferritine.

In 1943 werden door S. Granick, P. F. Hahn en L. Michaelis (9, 10) experimenten gedaan om deze theorie te bevestigen. Hiertoe werden honden ingespoten met een dosis met  $^{59}\text{Fe}$  gemerkt Fe(III)-ammoniumcitraat. Na respectievelijk 1, 2 en 5 uur werden de dieren opgeofferd en werd de radioactiviteit in de lever en milt en de daaruit geïsoleerde ferritine bepaald. Het bleek dat na 1 uur reeds 40% van de radioactiviteit in de lever terecht was gekomen en bijna niets in de milt. De specifieke activiteit van de ferritine uit de lever was aanmerkelijk hoger dan de specifieke activiteit van het orgaan zelf. Dit is te verklaren door aan te nemen dat het ijzer dat in ferritine van de lever wordt

geïncorporeerd, direct afkomstig is van het in de bloedbaan ingespoten ijzer en niet via een andere ijzerpool terechtkomt in het ferritine in de lever. Na 2 uur was ongeveer 60% van de activiteit in de lever terug te vinden en ongeveer 20% van deze activiteit in het leverferritine. De milt had ook nu nog geen ijzer opgenomen!

De vorm waarin het ijzer intraveneus wordt toegediend, is bepalend voor het feit of ijzer in de vorm van ferritine of hemosiderine wordt opgeslagen in de lever (63). IJzer-dextraan wordt voornamelijk in ferritine omgezet in de konijnlever, terwijl colloïdaal ijzeroxyde in de hemosiderinefractie terechtkomt.

Een konijn kan gemiddeld per dag 20 tot 30 mg ijzer in ferritine omzetten. Verhoogt men deze dosis dan zal, indien men ijzer in de vorm van ijzer-dextraan toedient, de serum-ijzerspiegel stijgen. Bij toedienen van ijzer als colloïdaal ijzeroxyde blijft de serum-ijzerspiegel constant en stijgt alleen het hemosiderine niveau van de lever. Hieruit blijkt dat de vorming van hemosiderine kan plaats hebben voordat het maximaal vermogen van de lever om ferritine te synthetiseren is overschreden. Ook blijkt dat de ijzerdepots in het lichaam niet statisch zijn, maar voortdurend met elkaar ijzer uitwisselen. Wordt aan konijnen een overdosis ijzer in de vorm van ijzeroxyde intraveneus toegediend, dan vindt in de eerste 3 tot 6 maanden een herverdeling plaats van het ijzer (63). Het totale lever-ijzer gehalte gaat omhoog, het lever-ferritine gehalte gaat omlaag en het lever-hemosiderine gehalte gaat omhoog, hetgeen dus neerkomt op een omzetting van ferritine naar hemosiderine in de lever en een daarbij komende aanvoer van ijzer uit andere organen. Het ijzergehalte van beenmerg en milt daalt (62).

Het door Granick (19) onderzochte verschijnsel van het stijgen van het ferritine-gehalte in de lever en andere organen na toedienen van ijzer, werd door hem verklaard door aan te nemen dat het aanwezige apoferritine een relatief hoge turnover heeft. Zodra dit apoferritine door het aanbod van ijzer is omgezet in ferritine, daalt de turnover door de stabiliserende werking die de ijzer micel op het eiwit uitoefent. Het ferritine zou dus gestabiliseerd worden tegen de afbraak door intracellulaire proteolytische enzymen. Volgens Granick (19) vindt dus geen door ijzer geïnduceerde de-novo synthese plaats van het ferritine na ijzertoediening.

Dat dit niet het enige mechanisme kan zijn dat voor de verhoging van het ferritine-gehalte na ijzertoediening aansprakelijk is, werd duidelijk door het werk van Fineberg en Greenberg (21, 30). Deze onderzoekers vonden via de meting van de incorporatie van [<sup>3</sup>H]leucine een synthese van 4 µg ferritine-N

per 8 uur per gram rattelever in dieren die geen ijzer kregen toegediend. Werden de dieren met ijzer ingespoten, dan bedroeg deze synthesesnelheid 18  $\mu\text{g}$  ferritine-N per 8 uur per gram lever. Neemt men aan dat in de niet-gestimuleerde ferritine-synthese evenwicht bestaat tussen synthese en afbraak, dan wordt dus ook 4  $\mu\text{g}$  ferritine-N per 8 uur per gram lever afgebroken. Indien de afbraak alleen wordt vertraagd door toedienen van ijzer en de synthese normaal blijft verlopen kan maximaal een vermeerdering van 8  $\mu\text{g}$  ferritine-N per 8 uur per gram lever plaatsvinden.

Men vond echter dat na stimulatie met ijzer de synthesesnelheid van ferritine 18  $\mu\text{g}$  ferritine-N per 8 uur per gram lever bedroeg, hetgeen dus alleen te verklaren is door een verhoging van de de-novo ferritine-synthese aan te nemen. Fineberg en Greenberg (21, 30) bepaalden de hoeveelheid ferritine-N per gram rattelever, waarbij ze ervan uitgingen dat na extractie van de lever en de hitte-behandeling alle ferritine zich in het supernatans bevindt en de extractie dus 100% opbrengst geeft. Van deze veronderstelling uitgaande, vonden zij 40  $\mu\text{g}$  ferritine-N per gram rattelever. Met behulp van deze waarde rekent men uit dat in normale omstandigheden de hele ferritinepool in de lever na 80 uur is vernieuwd.

De onderzoeken van Fineberg en Greenberg werden bevestigd door Drysdale en Munro (31, 32) die ook een verhoging van de de-novo-synthese van rattelever ferritine waarnamen na toediening van ijzer. Deze synthese zou volgens hen niet geremd worden door actinomycine D. Drysdale en Munro spotten ratten in met [ $^{14}\text{C}$ ] leucine en stimuleerden de ferritine-synthese door ijzer intraveneus in te spuiten. De dieren werden op opeenvolgende tijdstippen opgeofferd en de ferritine werd geïsoleerd. Na fractioneren van de ferritine door centrifugatie in een dichtheidsgradient in fracties met verschillende Fe/N verhoudingen, konden zij constateren dat de  $^{14}\text{C}$  label eerst in de fracties met lage Fe/N verhouding verschijnt. Pas later vertonen ook de fracties met een hogere Fe/N verhouding de label.

Het apoferritine zou dus een precursor voor het ferritine zijn. Drysdale en Munro bepaalden een turnover van 72 uur voor rattelever ferritine indien de synthese niet door Fe werd gestimuleerd. Dit getal vertoont een goede overeenkomst met de waarde die Fineberg en Greenberg opgeven. Tevens menen Drysdale en Munro een verlenging van de ferritine turnover te kunnen constateren indien ijzer wordt toegediend.

Met behulp van dichtheidsgradient-centrifugatie kon worden aangetoond dat, indien men radioactief gemerkt ijzer intraveneus inspuit, al na ongeveer



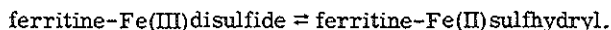
één uur het leverferritine gemerkt is en dat de specifieke activiteit van de fracties met een lage Fe/N verhouding het hoogst is. De fracties met een hoge Fe/N verhouding worden ook gemerkt (30).

Samenvattend kan men dus stellen dat volgens de huidige opvatting de ferritine-synthese onder andere wordt gereguleerd door de hoeveelheid ijzer in de circulatie. Bij een verhoogd ijzeraanbod vindt synthese plaats van apoferritine, die het grootste deel van het ijzer incorporeert. Echter ook het reeds voor de stimulatie gevormde ferritine kan een deel van het ijzer incorporeren.

Of de afgifte van ijzer van het ferritine gepaard gaat met een afbraak van het eiwit, of dat het eiwitgedeelte gedurende dat proces blijft bestaan, is nog niet duidelijk. Een bepaling van de halfwaardetijd van het eiwit zou vergeleken moeten worden met de halfwaardetijd van het ijzer om dit probleem te kunnen oplossen.

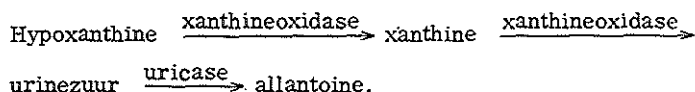
### C. Het mechanisme van de ijzeropname en- afgifte door ferritine.

Zoals reeds eerder werd vermeld, nemen Mazur en Schorr (22) aan dat een geringe hoeveelheid ijzer in het ferritine in de Fe(II)-vorm aanwezig is. Volgens hen zou dit gebonden zijn aan -SH-groepen waardoor het tegen oxidatie beschermd is. Volgens deze onderzoekers (22) zou het volgend evenwicht een rol spelen bij het vrijmaken van ijzer uit het ferritine:



Werden levercoupes anaeroob met ferritine geïncubeerd, dan steeg het Fe(II)-gehalte van de oplossing. Hieruit concludeerden de onderzoekers zonder meer dat het Fe(II)-gehalte van ferritine omhoog is gegaan. Ook brachten Mazur en Schorr een aantal honden in een toestand van shock door herhaald bloed aftappen. Ze vonden dat het serum-ijzer niveau stijgt en het latent ijzerbindend vermogen daalt. Zij concludeerden hieruit niet alleen dat in een toestand van hypoxemie de weefsels ijzer afgeven aan het serum, maar ook dat dit ijzer afkomstig is van leverferritine! De reductie van ferritine kan, behalve door anaeroob incuberen, ook worden bewerkstelligd met een gekookt lever-extract of met ascorbinezuur.

Green en medewerkers (27) gaven een verklaring voor de reductie van ferritine door levercoupes, respectievelijk een gekookt lever-extract. Zij toonden aan dat de verantwoordelijke stof hiervoor urinezuur is. Het metabolisme van urinezuur in de levende cel is als volgt:



Bekend is dat xanthine-oxidase als electronenacceptor behalve zuurstof ook andere substraten kan gebruiken zoals methyleen-blauw. Ook ferritine bleek als electronenacceptor voor gereduceerd xanthine-oxidase te kunnen optreden.

Alhoewel in vitro zowel urinezuur als xanthine ferritine kunnen reduceren, blijkt dat een injectie met urinezuur in de bloedbaan geen verhoging geeft van de serum-ijzerspiegel. Een injectie met xanthine of xanthine precursors geeft echter wel een verhoging van de serum-ijzerspiegel.

Green (27) stelt zich nu voor dat een regulatie van de ijzerafgifte uit de lever kan plaatsvinden op twee manieren:

- a. verandering van het hypoxanthine- en/of xanthine-gehalte in de weefsels.
- b. verandering van de xanthine-oxidase activiteit in de lever.

De regulering wordt verder beïnvloed door de eigenschappen van het xanthine-oxidase. Bij de oxidatie van hypoxanthine door xanthine-oxidase blijkt nl. dat, als zuurstof als electronenacceptor fungeert, het enzym geremd wordt door een overmaat substraat. Dit is echter niet het geval als ferritine als electronen-acceptor optreedt. Een verschil in het mechanisme voor deze twee reacties is dus evident. Tot zover het mechanisme van het vrijmaken van ijzer uit ferritine. Volgens Osaki en Frieden (71) zou de overgang van uit ferritine afkomstig ijzer naar de circulatie mede worden bewerkstelligd door het serum eiwit ferroxi-dase I (ceruloplasmine).

Het tegenovergestelde mechanisme, te weten de overdracht van transferrine gebonden plasma-ijzer naar leverferritine, werd onderzocht door Mazur en medewerkers (29). Deze onderzoekers stelden vast dat het transferrine-ijzer complex aan de levercel gebonden kan worden, zowel onder aerobe als anaerobe omstandigheden. Echter de incorporatie van het transferrine-ijzer in het leverferritine bleek afhankelijk te zijn van het oxidatieve metabolisme van de cel. Bij incubatie van levercoupes met aan transferrine gebonden ijzer bleken substraten van de Krebs cyclus een stimulerende invloed te hebben. Remmers van de oxidatieve fosforylering, zoals b.v. dinitro-fenol, remmen ook de incorporatie van aan transferrine gebonden ijzer in lever-ferritine.

Volgens Mazur en medewerkers (29) zijn ATP en ascorbinezuur in een verhouding 2:1, samen verantwoordelijk voor de overdracht van transferrine-ijzer naar leverferritine. Zij nemen aan dat het ijzer aan transferrine wordt

omringd door ATP en ascorbinezuur, waarna een reductie van het ijzer plaats vindt en het Fe(II)-ATP-complex het transferrine verlaat. Dit complex zou dan worden overgedragen op de vrije SH groepen van het ferritine. Deze laatste veronderstelling wordt bevestigd door het feit dat in vitro de overdracht van transferrine-ijzer naar ferritine geremd wordt door b. v. p-chloromercuriben-zoaat.

Het mechanisme van de ijzertransfer van transferrine naar ferritine werd ook onderzocht door Miller (65). Deze onderzoeker dialyseerde transferrine tegen ferritine en onderzocht het effect van enkele reducerende stoffen, enkele chelaatvormers en verzadigingspercentages van transferrine en ferritine op de ijzer-overdracht. De conclusies uit deze experimenten waren: 1e. ATP is niet speciaal nodig als chelaatvorm, ook citraat kan als zodanig dienst doen; 2e. de reactie is van de pH afhankelijk en heeft een optimum bij pH 7,3; 3e. de overdracht is afhankelijk van het verzadigingspercentage van zowel transferrine als ferritine. Ferritine neemt het meeste ijzer op als het tot ongeveer 50% verza-digd is (10% Fe w/w). Tevens vonden Miller en medewerkers (65) dat door poly-merisatie van het ferritine het ijzer-opnemend vermogen van het ferritine af-neemt.

Tenslotte moet nog vermeld worden dat lijnrecht tegenover de zojuist be-schreven hypothese van Mazur (29), Miller (65) en Green (27) - dat het ijzer het ferritine in en uit gaat via een redoxreactie en dat apoferritine een precursor is voor ferritine - de opvatting staat van Pape (50). Deze neemt aan dat eerst de ijzer micel wordt gevormd, waarna de sub-units van apoferritine zich hier-omheen rangschikken. Het zgn. N. C. F. (Non Crystallizable Ferritin) zou dan een precursor zijn van het ferritine, dus een ijzer micel met onvolledige eiwit-mantel. -Deze hypothese berust op twee waarnemingen:

- 1e. N. C. F. is tot kristallisatie te brengen door apoferritine toe te voegen;
- 2e. een oplossing van 0,1 molair nitrilotri-azijnzuur is in staat 40% van het ijzer van ferritine af te halen.

Samenvattend kan men stellen dat de in vitro experimenten die zijn ver-richt door Miller, slechts tot één conclusie kunnen leiden, nl.: de uitwisseling van ijzer tussen transferrine en ferritine gebeurt in het lichaam wezenlijk an-ders dan door Miller gesuggereerd. Immers, normaal is transferrine tot onge-veer 30% verzadigd en zou dus nooit ijzer kunnen afstaan aan ferritine. Daar komt nog bij dat in vivo juist het apoferritine het meeste ijzer incorporeert, zo-als gebleken is uit de proeven van Drysdale en Munro (31, 32). In de proeven van Miller daarentegen is het apoferritine niet in staat ijzer te binden.

Over de veronderstellingen van Pape valt op te merken dat zij in tegen-  
spraak zijn met de in vivo proeven van Drysdale en Munro (31, 32) en van  
Fineberg en Greenberg (21, 30). Uit deze proeven blijkt duidelijk dat apoferritine een precursor is van ferritine en niet de ijzermicel.

## HOOFDSTUK II

### MATERIALEN EN METHODEN

#### INLEIDING

Zoals reeds in hoofdstuk I werd vermeld brachten onze experimenten met zich mee dat de specifieke activiteit (s. a.) van drie isotopen die tegelijkertijd in één monster voorkomen, moest worden bepaald.

Voor de bestudering van de incorporatie van ijzer kozen wij  $^{59}\text{Fe}$ . Voor de incorporatie van fosfaat in ferritine kozen wij  $^{32}\text{P}$ . Voor het vervolgen van de synthese van de eiwitcomponent van ferritine hadden wij de keuze tussen [ $^{75}\text{Se}$ ] Seleenmethionine, [ $^{14}\text{C}$ ] asparaginezuur of andere met  $^{14}\text{C}$  gemerkte aminozuren en met  $^3\text{H}$  gemerkte aminozuren b. v. [ $^3\text{H}$ ] leucine.

In eerste instantie werd het [ $^{75}\text{Se}$ ] Seleenmethionine gekozen omdat dit isotoop als  $\gamma$  straler het eenvoudigst is te meten. Het bleek echter dat de incorporatie van dit isotoop vergeleken met de incorporatie van het  $^{59}\text{Fe}$  gering is, zodat het bepalen van de radioactiviteit van het  $^{75}\text{Se}$  naast het  $^{59}\text{Fe}$  niet goed mogelijk bleek te zijn. De reden voor deze relatief lage incorporatie is de lage s. a. van [ $^{75}\text{Se}$ ] seleenmethionine. Hieraan viel helaas niets te veranderen.

Hierna werd getracht een met  $^{14}\text{C}$  gemerkt aminozuur (asparaginezuur) te gebruiken. Het in het ferritine geïncorporeerde  $^{14}\text{C}$  werd d. m. v. natte destructie omgezet in  $^{14}\text{CO}_2$  dat opgevangen werd in een organische base. Hiervoor werden ethanolamine en benzylamine gebruikt. Het bleek echter, dat het destructieproces niet gelijkmatig verloopt, waardoor een kwantitatief opvangen van het gevormde  $^{14}\text{CO}_2$  onmogelijk is.

Uiteindelijk werd als gemerkt aminozuur het [ $^3\text{H}$ ] leucine genomen. De

radioactiviteit kan zoals in §1 beschreven wordt d. m. v. natte destructie wel kwantitatief worden bepaald naast  $^{59}\text{Fe}$  en  $^{32}\text{P}$ , door omzetting in  $^3\text{H}_2\text{O}$ .

## § 1. DE ANALYSE VAN MONSTERS AFKOMSTIG VAN SUCROSE GRADIENT CENTRIFUGATIE

De sucrose gradient centrifugatie wordt beschreven in hoofdstuk IV. Voor het geval in één monster de radioactiviteit van  $^3\text{H}$ ,  $^{32}\text{P}$  en  $^{59}\text{Fe}$  gemeten moest worden, ontwikkelden wij de volgende procedure:

De monsters, volume  $\pm \frac{1}{2}$  ml werden onderworpen aan een destructie met geconcentreerd zwavelzuur. Het vrijkomende water werd via destillatie kwantitatief opgevangen. In het destillaat bevindt zich alle  $^3\text{H}$  uit het monster. De  $^3\text{H}$  radioactiviteit werd bepaald zoals in §2 is aangegeven. Het destruaat werd op pH 5 gebracht en tot 10 ml aangevuld met water. In  $\frac{1}{2}$  of 1 ml van deze vloeistof werd het ijzer bepaald volgens Zettner (72). De stikstof bepaling vond plaats met  $\frac{1}{2}$  of 1 ml van deze vloeistof volgens de methode van Stein en Moore (73). In 3 ml van de oplossing vond de fosfaat bepaling en de meting van de  $^{32}\text{P}$  en  $^{59}\text{Fe}$  activiteit plaats. Hierbij volgden wij in grote lijnen de gang van zaken bescheven bij de fosfaat bepaling volgens Berenblum (74).

Allereerst werd echter het door de destructie gevormde metafosfaat door zure hydrolyse in orthofosfaat omgezet. Het orthofosfaat werd vervolgens omgezet in fosfomolybdaat en geëxtraheerd met isobutanol-benzeen. Een gedeelte van dit extract werd gebruikt voor de bepaling van de  $^{32}\text{P}$  radioactiviteit, terwijl een ander gedeelte na reductie, waarbij een blauwe kleur ontstaat, werd gebruikt om het fosfaatgehalte te bepalen. De waterlaag die overblijft na de extractie van het fosfaat wordt gebruikt om de radioactiviteit van het  $^{59}\text{Fe}$  te bepalen. Wanneer het monster een andere isotopen samenstelling had, kon de werkwijze worden vereenvoudigd.

Indien het monster  $^{59}\text{Fe}$  en  $^{75}\text{Se}$  bevatte werden de monsters zonder voorafgaande destructie overgebracht in telbuisjes en werd de activiteit bepaald. Hierna werden de monsters gedestruueerd en werd het N, Fe en  $\text{PO}_4$  gehalte bepaald.

Als  $^{14}\text{C}$  als enig isotoop aanwezig was werd het monster verdund tot 2 ml. De helft hiervan werd voor de radioactiviteitsmeting gebruikt (dus zonder destructie), de andere helft werd gedestruueerd en hierna vond de bepaling van N, Fe en  $\text{PO}_4$  plaats.

Bij het voorkomen van  $^{32}\text{P}$  als enig isotoop werd eerst gedestruueerd. De

activiteit van  $^{32}\text{P}$  werd op de reeds eerder besproken wijze bepaald.

Hieronder volgt de volledige gang van zaken bij de analyse van een monster dat  $^3\text{H}$ ,  $^{32}\text{P}$  en  $^{59}\text{Fe}$  bevat. Allereerst werd het monster overgebracht in een micro-Kjeldahl kolfje voorzien van slijpstuk. Op dit slijpstuk werd een koeler geplaatst. Deze koeler mondde uit in een leeg telflesje van de  $\beta$  teller. Aan het monster (volume  $\frac{1}{2}$  ml) werd 0,2 ml geconcentreerd  $\text{H}_2\text{SO}_4$  toegevoegd. Hierna werd verhit tot een gele kleur ontstond. Na afkoelen werd 0,3 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30%) toegevoegd en werd wederom verhit. Deze procedure werd herhaald totdat de oplossing kleurloos bleef na verhitten. De ontwijkende waterdamp werd door de koeler gecondenseerd en in het telflesje opgevangen. Nu werd  $2 \times 0,5$  ml water aan het zwavelzuur toegevoegd en werd wederom verhit. Deze stap dient ervoor het getritieerde water geheel uit het geconcentreerd zwavelzuur te verwijderen en tevens worden hierdoor resten  $\text{H}_2\text{O}_2$  verwijderd.

Na deze destructie werd het micro-Kjeldahl kolfje gekoeld met ijs. De koeler werd vervolgens doorgespoeld met 10 ml telvloeistof. Deze telvloeistof werd in het telflesje waarin zich het getritieerde water bevond opgevangen. Aan het gekoelde destrukaat werd één druppel broom-cresol purper (1% in ethanol) toegevoegd, waarna met 5 molair NaOH tot paars werd getitreerd. Hierna werd met 1 molair  $\text{H}_2\text{SO}_4$  teruggetitreerd tot geel, vervolgens met 0,1 molair loog tot paars en tenslotte met 0,1 molair zuur tot geel. De oplossing had nu een pH van 5. Het volume werd vervolgens op 10 ml gebracht door aanvullen met water tot een op het kolfje aangebrachte ijkstreep. Het monster is nu gereed voor de analyses van N, Fe en  $\text{PO}_4$ . De stikstofbepaling geschiedde in 0,5 of 1,0 ml monster volgens Stein en Moore (73). Deze auteurs ontwikkelden de techniek voor de bepaling van aminozuren na voorafgaande chromatografische scheiding, waarbij storende stoffen zijn verwijderd. In ons geval ging aan de N bepaling geen chromatografie vooraf, zodat extra zorg aan de reagentia moest worden besteed (zie §4). De ijzerbepaling geschiedde in 0,5 ml of 1,0 ml volgens Zettner (72). De fosfaat bepaling geschiedde in 3 ml monster volgens Berenblum (74).

Alvorens deze bepaling kon worden uitgevoerd met een monster dat op bovenbeschreven wijze is gedestruerd, bleek het noodzakelijk het metafosfaat dat in het milieu van geconcentreerd zwavelzuur was gevormd, om te zetten in orthofosfaat. Dit gebeurde door na het toevoegen van 0,3 ml 5 molair  $\text{H}_2\text{SO}_4$  aan 3 ml monster, dit gedurende 30 minuten in een kokend waterbad te verhitten. Hierna werd afgekoeld en werd de bepaling verder volgens voorschrift uitgevoerd. Hiertoe werd 0,5 ml ammoniummolybdaat aan het monster toegevoegd en na 15

minuten werd het gevormde fosfomolybdaat met 4 ml isobutanol-benzeen 1 : 1 uitgeschud. Een gedeelte van de organische laag werd afgepipetteerd en gebruikt voor het bepalen van de  $^{32}\text{P}$  radioactiviteit (zie §2). Een ander gedeelte werd gebruikt voor de spectrofotometrische fosfaat bepaling. De waterlaag die overblijft na de extractie werd gebruikt om de radioactiviteit van het  $^{59}\text{Fe}$  te bepalen.

Tabel II, 1

	Activiteit Isotoop voor destructie	Activiteit $\text{H}_2\text{O}$ in telflesjes na destructie.
Exp. I	$[^3\text{H}]$ leucine 4, $60 \times 10^6$ dpm	$[^3\text{H}]$ leucine 4, $58 \times 10^6$ dpm 98%
II	$[^3\text{H}]$ leucine 0, $51 \times 10^6$ dpm	$[^3\text{H}]$ leucine 0, $49 \times 10^6$ dpm 96%
III	$[^{32}\text{P}]$ orthofosfaat 4, $3 \times 10^6$ dpm	$[^{32}\text{P}]$ orthofosfaat 0 dpm
IV	$[^{59}\text{Fe}]$ ferricitraat 0, $2 \times 10^6$ dpm	$[^{59}\text{Fe}]$ ferricitraat 0 dpm.

Bepaling van de storende invloed van de radioactiviteit van  $^{59}\text{Fe}$  en  $^{32}\text{P}$  op de  $^3\text{H}$  radioactiviteitsmeting indien de isotopen chemisch worden gescheiden. (Exp. I, II, III en IV).

Activiteit in de waterlaag voor de P bepaling	Activiteit in de organische laag na de P bepaling	Activiteit in de waterlaag na de P bepaling
V $^{32}\text{P}$ $56 \times 10^4$ dpm ( $\beta$ teller)	$^{32}\text{P}$ $56 \times 10^4$ dpm ( $\beta$ teller)	$^{32}\text{P}$ 0 dpm ( $\gamma$ teller)
VI $^{59}\text{Fe}$ $18 \times 10^4$ dpm ( $\gamma$ teller)	$^{59}\text{Fe}$ 0 dpm ( $\beta$ teller)	$^{59}\text{Fe}$ $18 \times 10^4$ dpm ( $\gamma$ teller)

Bepaling van de storende invloed van  $^{59}\text{Fe}$  op de radioactiviteits-bepaling van  $^{32}\text{P}$  en de storende invloed van  $^{32}\text{P}$  op de radioactiviteits-bepaling van  $^{59}\text{Fe}$  indien de isotopen chemisch worden gescheiden. (Exp. V en VI).

Tenslotte blijkt uit bovenstaande tabel II, 1 dat deze procedure ons in staat stelde de radioactiviteit van  $^3\text{H}$ ,  $^{32}\text{P}$  en  $^{59}\text{Fe}$  te bepalen zonder dat de activiteitsmeting van één isotoop gestoord werd door de aanwezigheid van de andere isotopen in het monster. Deze experimenten werden verricht door per experiment het betreffende isotoop toe te voegen in de aangegeven activiteit en de "recovery" na de behandeling te meten.

## 2. RADIOACTIVITEITSMETINGEN

Het meten van  $^{59}\text{Fe}$  en  $^{75}\text{Se}$ : gemeten werd in een Packard  $\gamma$  spectrometer model 578 bij de volgende instelling. Hoogspanning 842 volt; Kanaal I ( $^{59}\text{Fe}$ ) onderste discriminator 300 schaaldelen, bovenste discriminator 690 schaaldelen. Telefficiëntie 12,6% voor  $^{59}\text{Fe}$ , voor  $^{75}\text{Se}$  bedraagt de efficiëntie 0%. Kanaal II ( $^{75}\text{Se} + ^{59}\text{Fe}$ ) onderste discriminator 140 schaaldelen, bovenste discriminator 240 schaaldelen. In dit kanaal wordt 32,3% van de in kanaal I gemeten  $^{59}\text{Fe}$  activiteit geregistreerd. Aantal cpm  $^{75}\text{Se} = \text{cpm Kanaal II} - 0,32 \text{ cpm Kanaal I}$ .



Het meten van  $^{14}\text{C}$ : gemeten werd in een Packard Tri-Carb model 3380 in een vaste kanaalinstelling voor het  $^{14}\text{C}$  isotoop. Aan 1 ml monster werd 10 ml scintillatie vloeistof (zie § 4) toegevoegd. Dovingscorrecties werden met behulp van een in het instrument aanwezige interne standaard uitgevoerd.

Het meten van  $^{32}\text{P}$  vond plaats in dezelfde Packard Tri-Carb in een vaste kanaalinstelling voor dit isotoop. Aan 3 ml monster werd 10 ml scintillatie vloeistof toegevoegd. Dovingscorrecties bleken niet noodzakelijk te zijn.

Het meten van  $^3\text{H}$  gebeurde eveneens in de Tri-Carb in een vaste kanaalinstelling voor tritium. Aan ongeveer 2 ml monster werd 15 ml scintillatie vloeistof (zie § 4) toegevoegd. Dovingscorrecties vonden op de gebruikelijke manier plaats.

### § 3. DE BEREIDING VAN FERRITINE

Alvorens de lever waaruit ferritine werd geïsoleerd kon worden vrij geprepareerd diende dit orgaan bloedvrij te worden gemaakt. Dit geschiedde op de volgende manier. Het proefdier (konijn) werd verdoofd door injectie in de oorevene met hypnorm (Philips-Duphar) 0,5 ml per kg lichaamsgewicht, gevolgd door een injectie met heparine (50 mg). Vervolgens werd de borstholte opengeknipt en een naald via de linker kamer in de aorta gebracht. Nadat het rechter atrium was doorgeknipt werd het konijn bloed-vrij gemaakt door perfusie met ongeveer 1 liter fysiologisch zout.

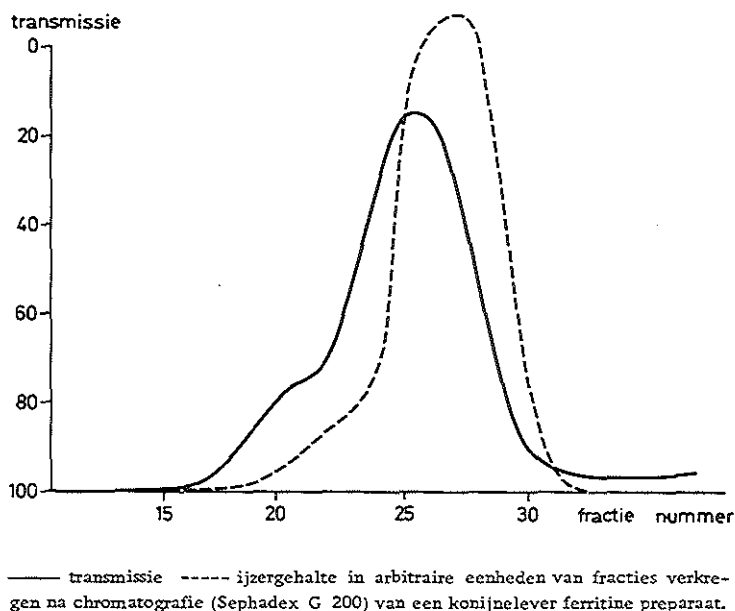
De gang van zaken bij de bereiding van ferritine wordt uitvoerig besproken in hoofdstuk III, zodat hier volstaan kan worden met enkele opmerkingen betreffende de technieken die bij de isolatie van ferritine werden gebruikt.

De ultrafiltratie geschiedde m. b. v. dialyse hulzen van de firma Sartorius die aan een glazen buis waren bevestigd. Buis en huls werden d. m. v. een rubber stop op een Erlenmeijer geplaatst, en het zo gevormde apparaat werd op de waterstraalpomp aangesloten. Per apparaat kan ongeveer 40 ml per dag worden geconcentreerd. Indien nodig werden meerdere apparaten op één waterstraalpomp tegelijk aangesloten.

Sephadex gel filtratie geschiedde op de gebruikelijk wijze. Als buffer waarin het gel was gesuspendeerd en waarmee werd geëluëerd kozen wij boraat-LioH buffer 0,05 molair pH = 8,6. Het ferritine werd in een volume van 5 ml boven op de kolom aangebracht. Na het inzakken van de ferritine oplossing werd de kolom aan de bovenkant gesloten waarna elutie met boraatbuffer volgde met een hydrostatische druk van 30 cm water. De elutie snelheid bij deze druk be-

droeg 8 druppels per minuut. Het eluaat werd door een uvicord (L.K.B.) geleid en de gemeten extinctie werd door middel van een recorder geregistreerd. Uiteindelijk werd het eluaat gefractioneerd opgevangen m. b. v. een fractie verzamelaar. Ter illustratie volgt hieronder het elutie patroon van een hoeveelheid konijnlever ferritine.

Fig. II, 1.



Preparatieve acrylamide gel electroforese geschiedde in een door ons ontworpen apparaat. Bijzonderheden zijn door ons reeds uitvoerig beschreven (76).

Acrylamide diskelectroforese geschiedde op de gebruikelijke manier in 5% acrylamide met de apparatuur van Shandon. Als buffer werd gebruikt Boraat-LiOH 0,05 molair pH = 8,6. De te electroforeren monsters opgenomen in buffer werden 1 : 1 verdund met een 10% sucrose oplossing in water en vervolgens met een pipet op het gel gebracht. Hierna volgde concentratie van het monster bij een stroomsterkte van 0,5 mA per buisje, waarna de stroomsterkte op 2,5 mA per buisje werd ingesteld. Na electroforese werden de gels op eiwit gekleurd met amidozwart. (1% amidozwart in methanol/ijsazijn/water in de verhouding 30 : 7 : 63). Ontkleurd werd in een oplossing methanol/azijnzuur/water 30 : 7 : 63.

Indien op ijzer werd gekleurd gebeurde dit in een 1% kalium Fe(II)cyanide oplossing in methanol/azijnzuur/water 30 : 7 : 63.

#### § 4. CHEMICALIEN EN GLASWERK

De chemicaliën gebruikt voor dit onderzoek waren allen, indien niet anders vermeld, van pro analyse kwaliteit. Indien betrokken van B. D. H. is dit de kwaliteit Analar. Sucrose werd betrokken van B. D. H. in de kwaliteit Aristar evenals het waterstofperoxide en het zwavelzuur. Het aqua bidest dat op de gebruikelijke wijze werd bereid in een glazen apparaat van de firma Pieterman werd voor gebruik nogmaals gedestilleerd in een glazen apparaat na toevoegen van ongeveer 10 ml geconcentreerd zwavelzuur aan 1 liter bidest. Het H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> werd met behulp van een anionen en kationen wisselaar gezuiverd van sporen ammoniak en fosfaat. De telvloei-stof die werd gebruikt voor het bepalen van de radioactiviteit van  $\beta$  stralers had de volgende samenstelling: 500 ml toluen, 500 ml triton X100, 5 g P. P. O., 0,5 g P. O. P. O. P. 10 ml van deze telvloei-stof is voldoende om met 2 ml waterig monster na krachtig schudden een heldere oplossing te geven.

Het glaswerk werd gereinigd door een behandeling van een half uur in een ultrasoon apparaat, waarna het 24 uur in een oplossing van bichromaat zwavelzuur werd gehouden. De destructie kolfjes en de reageerbuizen nodig voor de fosfaatbepaling werden voordat ze in het bichromaat zwavelzuur werden gelegd, 1 uur gekookt in een soda oplossing.

#### § 5. RATTELEVER PERFUSIE ; HET BEREIDEN VAN DE BIJ PERFUSIE GEBRUIKTE OPLOSSINGEN

Een hoeveelheid mengserum nodig voor 5 perfusies (250 ml) werd ontdooid, en vervolgens door een milliporefilter 220 n.m. gefiltreerd. Het ijzergehalte en de TYBC werden vervolgens bepaald en de hoeveelheid Fe(III)citraat nodig om de verzadiging van het transferrine op 80% te brengen, werd berekend. Hierna werd een oplossing van Fe(III)citraat in fysiologisch zout gemaakt en de benodigde hoeveelheid hiervan aan het serum toegevoegd; indien ook radioactief Fe(III)citraat moest worden toegevoegd, werd dit eerst gemengd met de benodigde hoeveelheid "koud" Fe(III)citraat. Het serum werd vervolgens onder zachtjes schudden 1 uur bij 37°C geïncubeerd en vervolgens in 5 gelijke porties verdeeld.

Bij de perfusie werd een Krebs-Ringer oplossing gebruikt van de volgende samenstelling: 15 ml 9% NaCl; 6 ml 1,15% KCl; 1,5 ml 3,82%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 4,5 ml 1,22%  $CaCl_2$ ; 31,5 ml 1,3%  $NaHCO_3$  (1,5 ml 2,11%  $KH_2PO_4$ ); 135 ml bidest. Aan 50 ml serum werd 25 ml van deze Krebs-Ringer oplossing toegevoegd, vlak voor het begin der perfusie.

Van het mengserum waarvan in totaal 1 liter was bereid en dat voor alle perfusie proeven is gebruikt, werden ter controle enkele parameters bepaald. De osmolariteit van het serum bedroeg 300 m osm./l. Het gehalte aan vrije aminozuren in het serum is weergegeven in tabel II, 2.

Tabel II, 2

Methionine sulfoxide	0,4
Asparaginezuur	0,1
Threonine	1,5
Serine	1,5
Asparagine + Glutamine	2,0
Proline	0,4
Glutaminezuur	0,6
Citrulline	0,1
Glycine	1,8
Alanine	1,8
Valine	0,6
Methionine	<0,1
Isoleucine	0,4
Leucine	0,8
Tyrosine	0,3
Phenylalanine	0,3
Ornithine	0,5
Lysine	2,2
Histidine	0,3
Tryptophaan	0,3
Arginine	1,0

Hoeveelheden aminozuren in molen per 5 ml serum.

Van een monster mengserum dat op de bovengenoemde wijze was opgeladen met radioactief [ $^{59}Fe$ ] Fe(III)citraat werd 1  $\mu$ l op een celluloseacetaat strip gebracht en geëlectroforeerd. Hierna werd de strip 14 dagen op een Röntgenplaat gelegd, die vervolgens werd ontwikkeld. Steeds bleek dat alle radioactief ijzer zich op de plaats van het transferrine in het electroferogram bevond.

De perfusieopstelling werd op onze afdeling gebouwd naar een ontwerp van Scholz (77). De operatie die werd verricht teneinde de rattelever op het perfusie apparaat te kunnen aansluiten geschiedde volgens Miller (78) en Schimassek (79).

## HOOFDSTUK III

### ISOLATIE VAN FERRITINE

3

tie-methoden voor ferritine maken veelal gebruik van de volgende ook uit hoofdstuk I blijkt.  
en van het orgaan homogenaat tot 80°C.  
tatie van het ferritine met ammoniumsulfaat.  
lisatie met CdSO<sub>4</sub>.  
en de 3e stap is eventueel nog een andere stap toegevoegd, zoals atografie of ultracentrifugatie. Men kan evenwel een aantal vragen gaande dit isolatie-schema. Het verhitten van een ruw homogenaat, neeste eiwitten neerslaan, maar het ferritine in oplossing blijft, is zeer voordelig omdat hierbij een zeer grote verhoging van de Fe/N optreedt. De mogelijkheid bestaat echter dat ook een gedeelte van ige ferritine door de hitte-behandeling precipiteert. Hierover is merknoeg weinig bekend.

Teneinde de hitte-behandeling nader te onderzoeken, vervingen wij de hitte-behandeling door een butanol-extractie. Het ruwe homogenaat werd hiertoe in de koude verzadigd met butanol. Na enige uren staan, werd gecentrifugeerd bij 3000 x g en de waterlaag die het ferritine bevat werd gedialyseerd. De overige bewerkingen, die komen na de hitte-behandeling, teneinde het ferritine verder te zuiveren, staan beschreven in § 2 van dit hoofdstuk. Het op deze wijze geïsoleerde ferritine bleek identiek te zijn met ferritine dat was geïsoleerd volgens de methode beschreven in § 2 (dus met de hitte-behandeling). Als criteria golden

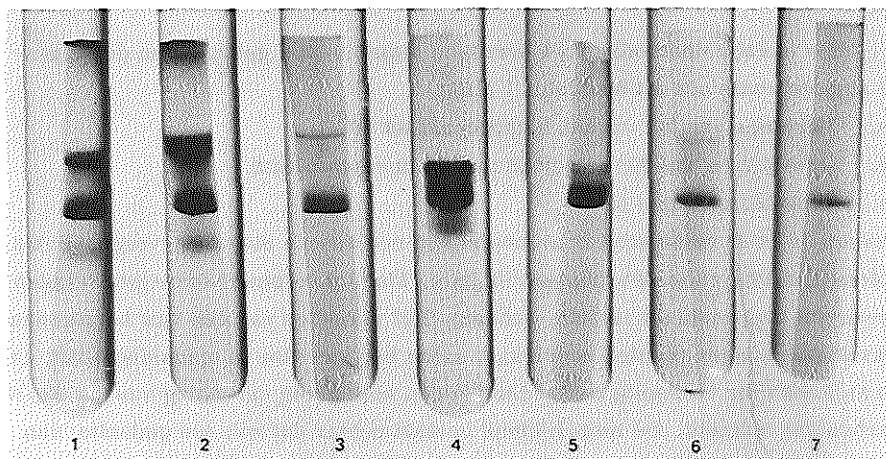
hier Fe/N en Fe/P verhouding, zie tabel III, 1 electroforetische eigenschappen op acrylamide en hitte-resistentie (zie fig. III, 1).

Tabel III, 1.

	I	II
Fe/N	0,32	0,52
Fe/P	13,6	8,1

Analyses van een door middel van butanol-extractie verkregen ferritine-preparaat (I) en een door hitte-behandeling verkregen preparaat (II). Beide preparaten werden bereid uit dezelfde konijnlever. Hoeveelheden Fe, P en N uitgedrukt in  $\mu$ molen.

Fig. III, 1.



Electroforese op 5% polyacrylamide van konijnlever-ferritine geïsoleerd d. m. v. de butanol methode. Buffer 0,05 molair LiOH-Boraat pH 8,6.

Bovenzijde negatieve pool. Onderzijde positieve pool.

1. Na gelfiltratie 3,8  $\mu$ mol N (eiwitkleuring).
2. Na gelfiltratie 1,6  $\mu$ mol N (eiwitkleuring).
3. Na gelfiltratie 1,6  $\mu$ mol N (ijzerkleuring).
4. Na preparatieve acrylamide gelelectroforese 2,4  $\mu$ mol N (eiwitkleuring).
5. Na preparatieve acrylamide gelelectroforese 2,4  $\mu$ mol N (ijzerkleuring).
6. Na preparatieve acrylamide gelelectroforese 0,24  $\mu$ mol N (eiwitkleuring).
7. Na preparatieve acrylamide gelelectroforese 0,24  $\mu$ mol N (ijzerkleuring).

Uit het feit dat de door middel van de butanolbehandeling geïsoleerde ferritine bij verhitten tot  $80^{\circ}\text{C}$  geen precipitatie te zien geeft, concluderen wij dat de hitte-behandeling geen effect heeft op het ferritine. Wij besloten op grond van deze resultaten de hitte-behandeling als 1e stap te handhaven.

Indien men het homogenaat, dat een hitte-behandeling heeft ondergaan, op 50% ammoniumsulfaatverzadiging brengt, slaat het ferritine neer. Het neerslag is echter moeilijk weer in oplossing te brengen. Wij besloten daarom deze stap niet in de isolatie-procedure op te nemen.

Ook aan het incorporeren van de 3e stap van de in het begin van de paragraaf vermelde isolatie-methode zijn bezwaren verbonden. Zoals in hoofdstuk I reeds ter sprake kwam, blijft na kristallisatie van ferritine een moederloog achter met eenzelfde Fe/N verhouding als het gekristalliseerde ferritine. Waaraan dit verschijnsel is toe te schrijven, is niet bekend. Zeker is dat de hoeveelheid "non crystallizable ferritin" aanzienlijk is, zodat dit de opbrengst van de isolatie nadelig beïnvloedt. We besloten daarom ook deze stap niet te incorporeren in ons isolatie-schema.

Met betrekking tot de ultracentrifuge-techniek moeten wij het volgende opmerken. Aangezien wij het ferritine willen isoleren om de metabole activiteit van de ferritine-fracties met oplopende Fe/N verhoudingen te bestuderen, moet de gebruikte isolatie-methode hierbij aangepast zijn, d. w. z. de isolatie-methode moet een redelijke opbrengst geven voor alle "soorten" ferritine vanaf apoferritine tot volledig met Fe opgeladen ferritine.

De eerder door onze afdeling gepubliceerde isolatie-methode volgens Penders, die gebruik maakt van centrifugatie gedurende relatief korte tijd (69), is snel en kan een goede opbrengst geven voor ferritine met een hoge Fe/N verhouding. Apoferritine wordt door middel van deze procedure niet verkregen. Deze isolatie-methode kan na stimulatie van de ferritine-synthese door intraveneuze ijzer-inspuiting waarbij vooral ferritine met een hoge Fe/N verhouding ontstaat, uitstekende diensten bewijzen indien men b. v. ferritine behoeft voor het maken van antilichamen. Voor ons doel is de methode echter niet zonder meer geschikt. Centrifugatie is echter wel bruikbaar indien aanzienlijk langer wordt gedraaid.

Kolomchromatografie, met name gelfiltratie, leek ons een goede methode om in ons isolatie-schema op te nemen. Een aantal gels werd door ons onderzocht. Resultaten van dit onderzoek staan beschreven in § 2 van dit hoofdstuk.

Als laatste stap in het isolatie-schema werd preparatieve acrylamide-gel elektroforese genomen vanwege het bijzonder groot scheidend vermogen van

deze methode.

We kunnen de door ons gevolgde isolatie-procedure als volgt samenvatten:

- 1e stap verhitten van het leverhomogenaat;
- 2e stap centrifugatie van het door de hitte-behandeling verkregen supernatans gedurende lange tijd;
- 3e stap gelfiltratie van het residu verkregen door centrifugatie;
- 4e stap preparatieve acrylamidegel-electroforese van het ferritine bevattende eluaat ontstaan door gelfiltratie.

De opbrengst die verkregen wordt indien men gebruik maakt van de door ons ontwikkelde isolatie-procedure is 47%. Een uitvoerige bespreking van dit probleem treft men aan in § 3 van dit hoofdstuk. Opmerkelijk is dat in de literatuur geen gegevens te vinden zijn betreffende de opbrengst die werd gevonden indien een bepaalde isolatie-procedure werd gevolgd. Wel werd in sommige gevallen opgegeven hoeveel ferritine uit een orgaan werd verkregen. Voor de konijnlever werden door Muraoka (45) de volgende waarden gevonden: 300 mg ferritine uit 4 kg konijnlevers; neemt men aan dat 38% van het gewicht aan ferritine afkomstig is van de micel (10) dan volgt hieruit dat uit 4 kg konijnlever 185 mg ferritine-eiwit kan worden geïsoleerd, hetgeen overeenkomt met 4,6 mg ferritine-eiwit per 100 g lever.

Zoals blijkt uit § 3 van dit hoofdstuk, is de opbrengst bij gebruikmaken van de door ons ontwikkelde isolatie-procedure 7,5 mg ferritine-eiwit per 100 g lever. Uitgaande van een opbrengst van 50% (zie § 3 van dit hoofdstuk) komt dit neer op 15 mg ferritine-eiwit dat zich in 100 g lever bevindt.

## § 2. WERKWIJZE

Als eerste stap (I) wordt de lever van het proefdier, onder toevoeging van boraatbuffer (0,05 molair pH 8,6) gehomogeniseerd in een Braun mixer. Hierbij wordt 3 x zoveel buffer in ml toegevoegd als het orgaan in grammen weegt. Het verkregen homogenaat wordt vervolgens in een waterbad tot 80°C verhit en 5 min. bij die temperatuur gehouden, waarna wordt afgedraaid bij 3000 x g om het hitte coagulaat te scheiden van de heldere oplossing waarin zich het ferritine bevindt. De heldere bovenstaande oplossing wordt afgeschonken en het precipitaat nog eenmaal gewassen met buffer. Na centrifugatie wordt dit supernatans gevoegd bij het reeds verkregen supernatans.

De tweede stap (II) bestaat uit ultracentrifugatie van het verkregen extract. Hiertoe worden buizen van de rotor 30 (Beckman preparatieve ultracentrifuge



L2 65B) gevuld met ongeveer 5 ml van een Sephadex G25 suspensie. Vervolgens worden de buizen gevuld met de door hitte-behandeling verkregen oplossing. Tot deze werkwijze kwamen wij op grond van de waarneming dat door het toevoegen van de Sephadex voorkomen kan worden dat er een moeilijk oplosbare "pellet" ontstaat ten gevolge van de centrifugatie. De gevulde buizen worden nu gedurende 12 uur bij 78.000 xg (temperatuur 20°C) gecentrifugeerd. Men komt tot deze centrifugetijd door de volgende berekening: De algemene vergelijking die voor centrifugatie van een bepaald macromolecuul geldt, is de volgende (zie ook hoofdstuk IV):

$$\frac{dx}{dt} = S_{w20} \cdot \omega^2 \cdot x \cdot \frac{\eta_{20,w}}{\eta_{T,c}} \frac{\rho_p - \rho_{T,c}}{\rho_p - \rho_{20,w}}$$

Neemt men als temperatuur waarbij gedraaid wordt 20°C en stelt men de viscositeit van de af te draaien oplossing gelijk aan de viscositeit van zuiver water bij 20°C, dan kan deze formule tot de volgende vorm herleid worden:

$$\frac{dx}{dt} = S_{w20} \cdot \omega^2 \cdot x$$

Integratie van deze differentiaal vergelijking levert de volgende formule op:

$$\Delta t = \frac{\ln \frac{R_{\max}}{R_{\min}} \cdot 10^3}{\omega^2} \times \frac{3600}{S}$$

waarbij  $\Delta t$  de tijd is die een deeltje met sedimentatieconstante  $S$  nodig heeft om van de bovenkant van de buis geheel naar de bodem te migreren.

$\omega$  in rad/sec.  $\Delta t$  in uren.

Voor de rotor 30 komt dit neer op het volgende:  $\Delta t = \frac{209}{S}$  uren.

Uit de literatuur blijkt dat apoferritine een sedimentatieconstante heeft van 18 S bij 20°C, zodat er dus  $\frac{209}{18} = 12$  uur nodig zijn om apoferritine (de fractie van ferritine met de kleinste sedimentatieconstante) volledig af te draaien. Na de centrifugatie wordt het supernatans afgezogen en wordt het ferritine uit de sephadex gewassen, waarna de verkregen ferritine-oplossing wordt geconcentreerd, d.m.v. ultrafiltratie tot een volume van  $\pm 5$  ml (zie voor technische details hoofdstuk II).

De derde stap (III) bestaat uit een gelfiltratie over Sephadex G200 (Pharmacia). Ook andere gelfiltratie media werden onderzocht, met name Sepharose 2B en 4B. Sephadex G200 gaf echter de scherpste ferritine-piek, zodat dit medium werd gekozen voor de gelfiltratie. Het ferritine verschijnt vlak achter

een dextran blue fractie. Het dextran blue is niet in staat in de poriën van de sephadex binnen te dringen, zodat men hieruit kan besluiten dat ook het ferritine hier toe nauwelijks in staat is. Voor een beschrijving van de opstelling zij verwezen naar hoofdstuk II § 3. Van het eluaat werd continu de extinctie bij 260 nm gemeten en na de chromatografie werd het ijzergehalte der fracties bepaald. Zie voor een representatief chromatogram fig. II, 1. De ijzerhoudende fracties waarin zich ook het apoferritine bevindt, werden bijeengevoegd en geconcentreerd door middel van ultrafiltratie tot een volume van 1 à 2 ml.

Hierna volgt de vierde (en laatste) stap (IV). Hiertoe wordt de helft van de verkregen ferritine in een volume van 1 ml op de preparatieve acrylamidegel-electroforese kolom gebracht. Een beschrijving van dit apparaat is te vinden in ref (76). Het ferritine laat zich in 1 à 2 fracties opvangen en deze fracties worden weer bijeen gedaan en vervolgens tot precies 2 ml geconcentreerd met behulp van ultrafiltratie.

### § 3. OPBRENGST

Teneinde de opbrengst van de door ons gevolgde isolatie-procedure te toetsen, werd een konijn (A) ingespoten met ongeveer 150  $\mu\text{C}$   $^{59}\text{Fe}$  en een hoeveelheid Mohr's zout overeenkomend met 0,2 mmol Fe. Een dag hierna werd het konijn (A) opgeofferd en werd het ferritine geïsoleerd (analyse van dit ferritine (A): 34  $\mu\text{mol N/ml}$ ; 12  $\mu\text{mol Fe/ml}$ ; 995.000 cp 100 s/ml).

Vervolgens werd een ander konijn (B) opgeofferd en werd 1,0 ml van het radioactief ferritine, afkomstig van konijn (A), aan het leverhomogenaat van het ander niet radioactief gemaakt konijn (B) toegevoegd. Na toevoeging van deze "interne standaard" werd de isolatie-procedure gevolgd en werd na iedere stap de radioactiviteit gemeten. Op deze wijze is na te gaan hoe groot de opbrengst is van iedere stap. De resultaten van dit experiment zijn samengevat in tabel

Tabel III, 2.

Stap	Totale radioactiviteit	% opbrengst
I. Hittebehandeling	995.000 cp 100 sec.	100 %
II. Ultracentrifugatie	880.000 cp 100 sec.	92 %
III. Sephadex G 200	650.000 cp 100 sec.	68 %
IV. Electroforese	448.000 cp 100 sec.	47 %

Opbrengst van de isolatie van ferritine berekend door het toevoegen van gemerkt ferritine aan het homogenaat.

III, 2, (analyse van dit ferritine: 97  $\mu\text{mol N}/2\text{ ml}$ ; 46  $\mu\text{mol Fe}/2\text{ ml}$ ; 448.000 cp 100 s/2 ml).

De relatief grote verliezen die optreden na de stappen II en III zijn voornamelijk toe te schrijven aan het noodzakelijke concentreren van het ferritine na ultracentrifugatie, dat nodig is voordat het ferritine op de Sephadex-kolom en op de electroforese-kolom kan worden gebracht. De gevolgde isolatie-methode geeft dus een opbrengst te zien van 47%. Indien men aanneemt dat alle ferritine die zich in de lever bevindt, wordt geëxtraheerd bij de eerste stap dan kan men dit getal benutten om het ferritine-gehalte van de lever te berekenen. In dit geval vindt men het ferritine-gehalte van de lever van konijn (B) op de volgende manier: De hoeveelheid N na de isolatie van het ferritine uit konijn (B) en toevoeging van een hoeveelheid extra ferritine bedraagt 97  $\mu\text{mol}$ , zodat zich  $97 \times \frac{100}{47} = 206 \mu\text{mol N}$  in de lever zou bevinden. De hoeveelheid toegevoegd ferritine (34  $\mu\text{mol N}$ ) wordt hier van afgetrokken, zodat zich in feite 172  $\mu\text{mol ferritine N}$  in de lever bevindt, hetgeen overeenkomt met 15 mg ferritine eiwit per 100 gram lever.

De op deze wijze bepaalde opbrengst is echter een "overall" opbrengst. Zoals in de inleiding reeds werd besproken, moet de isolatie-methode ook voor de fracties met een verschillende Fe/N verhouding een vergelijkbare opbrengst geven. Teneinde dit na te gaan werden 0,3 ml van het ferritine A (afkomstig van konijn (A)) en 0,3 ml van het ferritine B (afkomstig van konijn (B), waaraan toegevoegd ferritine A) op een iso-kinetische gradient gebracht. Na 3 uur centrifugeren bij 198.000 xg werden de gradiënten geëluëerd en in fracties opgevangen. Van deze fracties werd de radioactiviteit gemeten en het gehalte aan Fe en N werd bepaald. Aangezien het ferritine B (waaraan 1,0 ml ferritine A was toegevoegd) een totaalvolume heeft van 2,0 ml, moeten de resultaten van ferritine A door een factor 2 gedeeld worden om de opbrengst in diverse ferritine B fracties te kunnen berekenen. De resultaten van de experimenten zijn samengevat in tabel III, 3.

Aan de hand van tabel III, 3 kan men de opbrengst berekenen in de ferritine-fracties die een Fe/N verhouding hebben van respectievelijk 0 tot 0,25; 0,25 tot 0,50; 0,50 tot 0,75.

De resultaten zijn in tabel III, 4 weergegeven.

Zoals uit tabel III, 4 blijkt is de opbrengst voor fracties met een lage Fe/N verhouding weliswaar kleiner dan voor de fracties met een hoge Fe/N verhouding, maar dit verschil is niet zo groot dat de techniek daarvoor voor ons onbruikbaar zou worden.

Tabel III, 3.

fractie nummer	Ferritine A				Ferritine B		
	$\mu\text{mol N}$	$\mu\text{mol Fe}$	$\frac{\text{dpm}^{59}\text{Fe}}{2}$	$\frac{\text{dpm}^{59}\text{Fe}}{\mu\text{mol Fe}}$	$\mu\text{mol N}$	$\mu\text{mol Fe}$	$\text{dpm}^{59}\text{Fe}$
1	0,15	-	-	-	0,60	-	-
2	-	-	-	-	0,62	-	-
3	-	-	-	-	0,38	-	-
4	-	-	600	-	0,37	-	-
5	0,76	0,05	15.000	600.000	0,28	-	-
6	1,25	0,15	53.300	710.600	0,21	-	1.900
7	1,34	0,25	92.400	739.200	0,42	0,03	9.100
8	1,25	0,27	109.000	807.400	0,60	0,09	19.800
9	0,93	0,28	110.700	790.700	0,69	0,13	30.800
10	0,76	0,27	109.500	811.100	0,75	0,18	36.500
11	0,63	0,27	111.800	828.100	0,73	0,22	38.800
12	0,66	0,28	116.500	832.100	0,85	0,28	40.600
13	0,56	0,36	121.500	675.000	0,97	0,42	48.000
14	0,58	0,40	119.400	597.000	0,98	0,49	50.900
15	0,54	0,40	110.300	551.500	0,92	0,56	51.300
16	0,48	0,32	85.200	532.500	0,92	0,66	53.300
17	0,32	0,24	50.600	421.600	1,00	0,70	49.600
18	0,23	0,12	22.500	375.000	1,11	0,71	63.600
19	0,10	0,06	9.600	320.000	0,72	0,65	34.100
20	0,16	-	5.800	-	0,59	0,50	22.100
21	-	-	8.000	-	0,31	0,30	11.600
22	-	-	-	-	0,17	0,13	5.700
23	-	-	-	-	0,10	0,05	3.200
24	-	-	-	-	0,10	0,03	2.500

Het N en Fe gehalte in  $\mu\text{molen}$  en de radioactiviteit in dpm's fracties verkregen door gradientcentrifugatie van ferritine A en B.

Tabel III, 4.

Fracties	$\frac{\text{aantal dpm}}{2}$ Gradient A	aantal dpm Gradient B	Opbrengst
Fe/N; 0 tot 0,25	270.300	98.100	36 %
Fe/N; 0,25 tot 0,50	448.500	178.300	39 %
Fe/N; 0,50 tot 0,75	532.900	297.000	55 %

Opbrengst van de isolatie van ferritine berekend door het toevoegen van gemerkt ferritine aan het aan het homogenaat, onderverdeeld in ferritine fracties met een opklimmende Fe/N verhouding.

#### § 4. DE AARD EN DE ZUIVERHEID VAN HET GEÏSOLEERDE FERRITINE

Voor de zuiverheid van het geïsoleerde ferritine kan men de volgende criteria gebruiken:

De Fe/N verhouding van het ferritine zal over het algemeen tussen de 0,36 en 0,50 moeten liggen. Zie hiervoor ook hoofdstuk I.

Indien ferritine wordt onderworpen aan acrylamide disk-electroforese, zullen al naar gelang de gebruikte isolatie-procedure één band ( $\alpha$ -ferritine) of

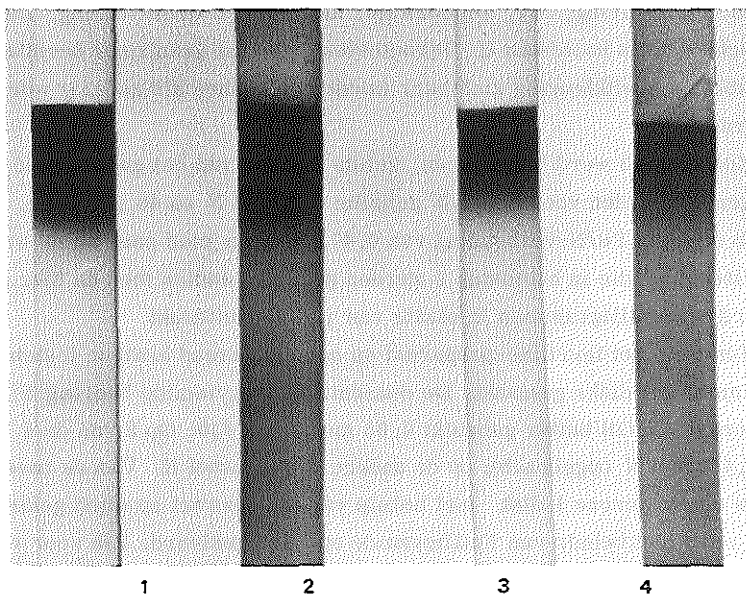
2 banden ( $\alpha$ -en  $\beta$ -ferritine) zichtbaar te maken zijn. Zowel  $\alpha$ -als  $\beta$ -ferritine kleurt met een eiwitkleuring, b.v. amidozwart, als met een ijzerkleuring. Zie voor technische details hoofdstuk II. Verontreinigingen die geen ijzer bevatten, zullen alleen met de eiwitkleuring zichtbaar worden en kunnen als zodanig worden opgespoord.

Zoals in §3 werd beschreven, gaf de analyse van het geïsoleerde ferritine de volgende waarden voor Fe en N gehalte: 97  $\mu\text{mol N}$  en 46  $\mu\text{mol Fe}$ . Dit komt overeen met een Fe/N-verhouding van 0,47, hetgeen goed past bij de waarden uit de literatuur die in hoofdstuk I werden gegeven, indien men de hier genoemde waarden in milligrammen in plaats van  $\mu\text{molen}$  uitdrukt.

Teneinde het ferritine-preparaat op contaminerend eiwit te testen, werden 4 acrylamidegel disks gemaakt. De concentratie acrylamide bedroeg 5%, verder werd boraat - LiOH buffer gebruikt 0,05 molair pH 8,6. Op 2 van de 4 disks werd 2,4  $\mu\text{mol N}$  opgebracht; op de andere 2 1,2  $\mu\text{mol N}$ . Van de twee series werd na elektroforese 1 disk met behulp van amidozwart op eiwit gekleurd. De andere werd met behulp van Fe(II)cyanide op ijzer gekleurd. Zie voor verdere technische details hoofdstuk II. De resultaten van deze kleuringen zijn te zien in figuur III, 2. In beide gevallen is slechts één band te zien, die zowel met de ijzerkleuring als met de eiwitkleuring zichtbaar werd. Men kan hieruit de conclusie trekken, dat het ferritine alleen contaminerend eiwit kan bevatten, wat dezelfde elektroforetische eigenschappen bezit als ferritine.

Zoals in hoofdstuk I reeds werd besproken gedraagt het ferritine zich als een inhomogeen eiwit indien het aan ultracentrifugatie wordt onderworpen. Bij elektroforese op acrylamide ontstaan in het algemeen 3 banden  $\alpha$ -,  $\beta$ - en  $\gamma$ -ferritine. Deze banden zouden volgens de literatuur (42) uit mono-, di- en trimeren van ferritine bestaan. Hierbij werden het  $\alpha$ -,  $\beta$ - en  $\gamma$ -ferritine geïsoleerd d.m.v. zetmeel-gel elektroforese, waarna door reductie het ijzer aan deze preparaten werd onttrokken. Na deze behandeling gedragen  $\alpha$ -,  $\beta$ - en  $\gamma$ -ferritine zich als mono-, di- en trimeren indien zij worden onderworpen aan centrifugatie in de analytische ultracentrifuge. Wij waren in staat d.m.v. een door ons ontworpen preparatief polyacrylamide-gel elektroforese apparaat (zie hoofdstuk II) het  $\alpha$ -,  $\beta$ - en  $\gamma$ -ferritine te isoleren. Een analyse van het ijzer-, stikstof- en fosfaat-gehalte geeft als uitkomst dat de Fe/P en Fe/N verhouding in het  $\alpha$ -,  $\beta$ - en  $\gamma$ -ferritine dezelfde waarde heeft. Dit is in overeenstemming met de veronderstelling dat hier sprake is van mono-, di- en trimeren van ferritine. Voor relatieve hoeveelheden van  $\alpha$ -,  $\beta$ - en  $\gamma$ -ferritine zie tabel III, 5.

Fig. III, 2.



Electroforese op 5% polyacrylamide van konijnlever-ferritine geïsoleerd volgens de beschreven methode, waarin de hitte behandeling voorkomt. Buffer 0,05 molair LiOH-Boraaat pH 8,6. Bovenzijde positieve pool. Onderzijde negatieve pool.

1. 2,4  $\mu\text{mol N}$  (eiwitkleuring).
2. 2,4  $\mu\text{mol N}$  (ijzerkleuring).
3. 1,2  $\mu\text{mol N}$  (eiwitkleuring).
4. 1,2  $\mu\text{mol N}$  (ijzerkleuring).

De stikstofbepaling geschiedde niet op de in hoofdstuk II beschreven wijze, omdat stikstof bevattende stoffen uit de acrylamide gel in de fracties terecht komen en zo de N-bepaling storen. I. p. v. de N-bepaling volgens Moore en Stein (73) werd de eiwitbepaling volgens Lowry (88) verricht, waarbij een ferritine-preparaat als standaard werd genomen.

Behalve de inhomogeniteit die ferritine vertoont in de ultracentrifuge en

Tabel III, 5.

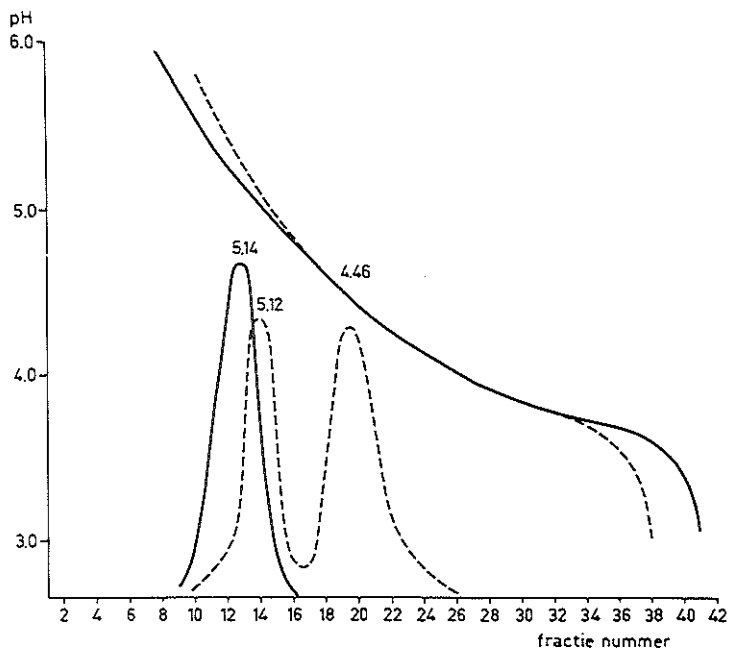
	$\mu\text{mol Fe}$	$\mu\text{mol N}$	$\mu\text{mol P}$	%	Fe/P	Fe/N
Ferritine opgebracht	42,50	106,00	10,20	100	4,1	0,40
$\alpha$ -ferritine	37,60	96,00	9,25	90	4,1	0,39
$\beta$ -ferritine	2,04	6,18	0,50	5	4,1	0,33
$\gamma$ -ferritine	0,59	--	0,13	1	4,5	--

Relatief voorkomen en Fe/N benevens Fe/P verhouding van  $\alpha$ -,  $\beta$ - en  $\gamma$ -ferritine (paardemilt).

bij electroforese in acrylamide gel, bleek ferritine zich ook op te splitsen in een aantal banden indien het werd onderworpen aan iso-electric focussing. Hier-  
toe werd het ampholine electrofocussing apparaat type 8101 van LKB gebruikt. De pH gradient werd gekozen in het gebied van pH 3 tot pH 6. Een uitvoerige beschrijving van de experimenten is door ons gepubliceerd (90).

Ferritine van 6 verschillende konijnen werd geïsoleerd volgens de methode beschreven in hoofdstuk III. Van vijf ferritine preparaten, verder te noemen A, B, C, D en E werd alleen het  $\alpha$ -ferritine geïsoleerd. Van ferritine preparaat F werd zowel het  $\alpha$ - als het  $\beta$ -ferritine geïsoleerd. Na iso-electrische fractionering in een pH gradient van pH 3 tot pH 6, gaven de preparaten A, B, D, E en F een enkele piek. De iso-electrische punten van deze ferritine preparaten varieerden tussen pH 5,14 en pH 5,12. Echter preparaat C gaf behalve deze piek bij pH 5,14 een 2e piek te zien bij pH 4,46, figuur III, 3.

Fig. III, 3.



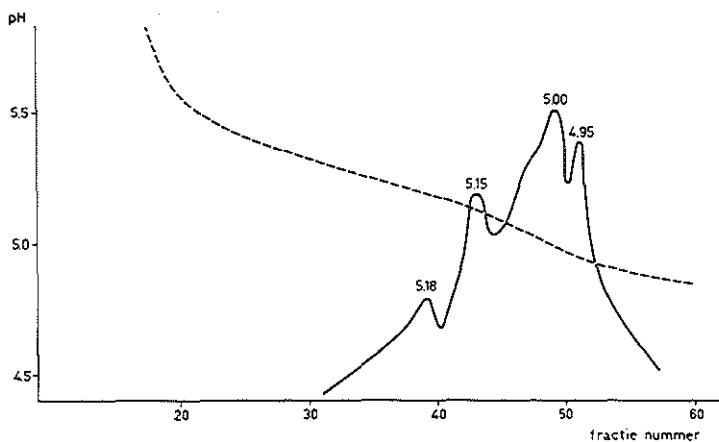
Absis: — Extinctie bij 350 nm van fracties van ferritine preparaat A en pH waarde van deze fracties.

Absis: - - - - Extinctie bij 350 nm van fracties van ferritine preparaat C en pH waarde van deze fracties.

Ordinaat: Fractienummer van fracties met een volume van 40 druppels.

Alhoewel door elutie een microheterogeniteit zichtbaar was in de kolom, verdween deze tijdens de elutie doordat de verschillende bandjes zich te dicht op elkaar bevonden. Wij brachten nu ferritine preparaat A weer op de kolom, dit keer in een hoeveelheid ampholine die 4 x zo geconcentreerd was. Na elutie werden de gekleurde fracties bijeen gevoegd, en met deze fracties werd een nieuwe iso-electric focussing uitgevoerd. Op deze manier bleven de banden ook na elutie bestaan en kon het ferritine in tenminste 4 subfracties worden gesplitst, figuur III, 4.

Fig. III, 4.

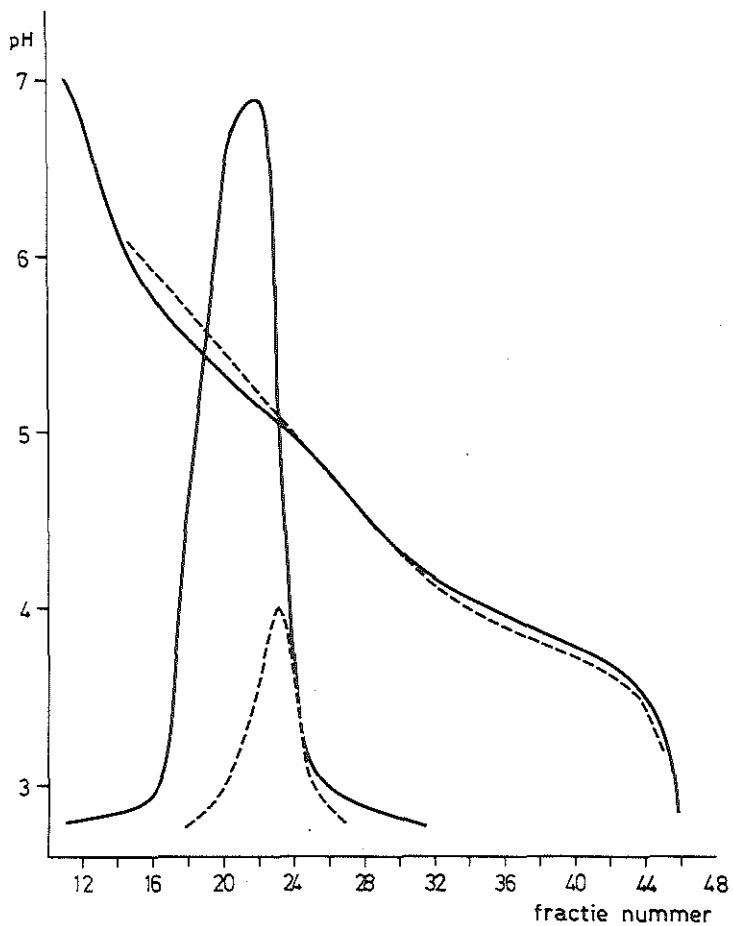


Absis: — Extinctie bij 350 nm van fracties van ferritine preparaat A.  
 - - - - pH waarde van deze fracties.  
 Ordinaat: Fractienummer van fracties met een volume van 20 druppels.

Tenslotte werd ook de  $\beta$  fractie van ferritine F aan iso-electric focussing onderworpen. Het bleek ook dat het  $\beta$ -ferritine een iso-electrisch punt van pH 5,12 bezit, figuur III, 5. Dit is in overeenstemming met zeer recente gegevens van Urushizaki (87).



Fig. III, 5.



Absis: — Extinctie bij 350 nm van fracties van ferritine preparaat F  $\alpha$  en de pH waarde van deze fracties.

----- Extinctie bij 350 nm van ferritine preparaat F  $\beta$  en pH waarde van deze fracties.

Ordinaat: Fractienummer van fracties met een volume van 40 druppels.

## HOOFDSTUK IV

### SCHEIDING VAN FERRITINE EN APOFERRITINE DOOR MIDDEL VAN CENTRIFUGATIE IN EEN ISOKINETISCHE SUCROSE-GRADIENT

#### § 1. INLEIDING

Een bekende scheidingsmethode, die berust op een verschil in deeltjes-grootte en - massa is de centrifugatie. In zijn eenvoudigste vorm bestaat deze centrifugatie uit het homogeen vullen van een centrifugebuis. Na de centrifugatie is dan de bodemfractie verrijkt met zwaar materiaal, terwijl de topfractie het lichte materiaal bevat. Deze methode is te verfijnen door het te scheiden materiaal niet homogeen over de buis te verdelen, maar bovenop een van te voren in de buis aangebrachte sucrose-gradient te brengen. Tijdens de centrifugatie bewegen de deeltjes met verschillende sedimentatieconstanten zich met verschillende snelheid door de gradient, wat tot gevolg heeft dat de oorspronkelijk opgebrachte zône zich in meerdere zônes splitst. Na de centrifugatie zijn de afzonderlijke zônes gescheiden te isoleren door de gradient te elueren. Bij dit soort gradientcentrifugatie maakt men meestal gebruik van een zogenaamde "swing out rotor" en een lineaire gradient. De taak die een gradient in een dergelijk experiment vervult berust op een stabilisatie van de verkregen zônes. Het nadeel van deze methode is echter dat, indien men een lineaire gradient gebruikt, deze gradient wel een goede stabilisatie oplevert, maar door de sterk oplopende viscositeit van sucrose met de concentratie, zullen de deeltjes die in een gebied met grotere sucrose-concentratie aankomen, hierin sterk worden geremd, zodat een boven in de buis optredende scheiding tussen twee soorten deeltjes weer teniet gaat als de zônes onder in de buis aankomen. Dit nadelig

effect van een lineaire gradient kon worden vermeden door in plaats van een lineaire gradient gebruik te maken van een exponentiële gradient die zodanig is gekozen dat deeltjes met één bepaalde sedimentatieconstante een constante sedimentatiesnelheid hebben in het gehele concentratiegebied van de gradient. Een dergelijk gradient wordt dan ook een isokinetische gradient genoemd.

Wil men met een isokinetische gradient werken, dan moet eerst de vorm die deze gradient moet hebben voor een bepaald deeltje, worden uitgerekend. Op de berekening van een dergelijke gradient wordt in § 2 nader ingegaan. Vervolgens moet de berekende gradient worden gerealiseerd. Aangezien een isokinetische gradient een exponentieel verloop heeft, kan voor de bereiding van een dergelijke exponentiële gradient gebruik worden gemaakt van een constant volume gradient apparaat. Een beschrijving hiervan treft men aan in § 3. Door het veranderen van twee parameters kan de vorm van de exponent worden gewijzigd. Wil men nu een bepaalde gradient met behulp van dit apparaat realiseren, dan moeten dus de waarden van beide parameters bekend zijn. Bij het berekenen van deze parameters kan worden gebruik gemaakt van het feit dat het gedrag van een constant volume apparaat kan worden gesimuleerd door een eenvoudig R. C. -circuit. Deze simulatie wordt nader toegelicht in § 4.

## § 2. BEREKENING VAN EEN ISOKINETISCHE GRADIENT VOOR DE FRACTIONERING VAN FERRITINE

De sedimentatiesnelheid van een macromolecuul, dat zich in een gravitatieveld bevindt op een afstand  $x$  van de rotatie-as, wordt weergegeven door de volgende formule (1) (80, 81).

$$\frac{dx}{dt} = S_{20,w} \cdot \omega^2 \cdot x \cdot \frac{\eta_{20,w}}{\eta_{T,c}} \frac{\rho_p - \rho_{T,c}}{\rho_p - \rho_{20,w}} \quad (1)$$

$x$  : Afstand tot de rotatie-as in cm.

$t$  : tijd in minuten.

$S_{20,w}$  : Sedimentatie coëfficiënt in water bij 20° C.

$\omega$  : Hoeksnelheid in radialen per min.

$\eta_{20,w}$  : Viscositeit van water bij 20° C in m. poise.

$\eta_{T,c}$  : Viscositeit van een sucrose-oplossing met concentratie  $c$  bij T° C.

$\rho_{T,c}$  : Dichtheid van een sucrose-oplossing met concentratie  $c$  bij T° C in gram/ml.

$\rho_p$  : Dichtheid van het deeltje.

$\rho_{20,w}$  : Dichtheid van water bij 20° C.

De sedimentatiesnelheid blijft constant gedurende de gehele ultracentrifugatie-tijd, als het volgende product constant blijft:

$$x \cdot \frac{\rho_p - \rho_{T,c}}{\eta_{T,c}} \equiv K \quad (2)$$

Het is nu mogelijk voor macromoleculen met een bekende deeltjes-dichtheid een sucrosegradient te berekenen, die voldoet aan vergelijking (2). Dit is mogelijk omdat de functie  $\eta_{T,c}$  en  $\rho_{T,c}$  bekend zijn voor sucrose. Zij zijn beschikbaar in tabelvorm (82).

Het samenstellen van een dergelijke gradient die voldoet aan vergelijking (2) en die we in het vervolg isokinetische gradient zullen noemen, heeft zekere voordelen, zoals reeds in §1 werd besproken. In overeenstemming met de dichtheid van de te onderzoeken macromoleculen wordt nu een passende sucroseconcentratie gekozen als beginconcentratie. Omdat de afstand  $x$  van het begin van de gradient tot de as van rotatie en de beginconcentratie bekend zijn, kan de isokinetische gradient worden berekend met behulp van vergelijking (2) en de getabuleerde waarden van  $\rho$  en  $\eta$ .

De bekende beginwaarde van de sucroseconcentratie en de bekende afstand  $x$  van de top van de gradient tot de rotatie-as geven de waarde van  $K$  in vergelijking (2). Variatie van  $x$  in vergelijking (2) geeft dan de waarde van de sucroseconcentratie die aanwezig moet zijn om het quotient  $K$  constant te houden. Het gevonden verband tussen  $x$  en de sucroseconcentratie is exponentieel.

De centrifuge die werd gebruikt, was de Beckman ultra-centrifuge L2 65B. Gedraaid werd in de SW 40 Ti rotor, waarvan de volgende gegevens bekend zijn:  $R_{\min} = 6,34$  cm;  $R_{\max} = 15,80$  cm; volume buizen 14,2 ml. Als beginconcentratie werd 5% sucrose gekozen en voor de dichtheid van een volledig met ijzer verzadigd ferritine-molecuul werd 1,8 g/ml aangenomen. De gekozen temperatuur bedroeg 5°C. Door gebruik te maken van deze en eerder genoemde gegevens, kan de isokinetische gradient worden berekend. De resultaten van deze berekening zijn weergegeven in tabel IV, 1.

De kolommen I, II en III ontstaan door gebruik te maken van gegevens in ref. (82) vermeld en door een deeltjes-dichtheid van 1,8 g/ml aan te nemen. De waarde  $K$  wordt berekend uit vergelijking (2)

$$K = x \cdot \frac{\rho_p - \rho_{T,c}}{\eta_{T,c}} = 0,449 \times 7,34 = 3,29.$$

Tabel IV, 1.

I	II	III	IV	V	VI	VII
% sucrose	$\rho_p - \rho_{T,c}$	$\frac{\rho_p - \rho_{T,c}}{\eta(T,c)}$	x	x <sup>1</sup>	vol.	% sucrose
5,0	0,7799	0,449	7,34	0	0	5,0
6,0	0,7759	0,428	7,69	0,35	0,53	5,9
7,0	0,7718	0,412	7,99	0,65	0,98	6,9
8,0	0,7677	0,397	8,31	0,97	1,46	8,0
9,0	0,7635	0,381	8,65	1,31	1,47	8,9
10,0	0,7594	0,366	9,00	1,66	2,49	9,7
11,0	0,7552	0,351	9,39	2,05	3,08	10,9
12,0	0,7509	0,386	9,80	2,46	3,69	11,6
13,0	0,7466	0,321	10,25	2,91	4,37	12,9
14,0	0,7423	0,307	10,72	3,38	5,07	13,9
15,0	0,7380	0,293	11,23	3,89	5,84	14,9
16,0	0,7346	0,280	11,78	4,44	6,66	16,0
17,0	0,7302	0,266	12,40	5,06	7,59	17,0
18,0	0,7257	0,253	13,04	5,70	8,55	18,0
19,0	0,7212	0,240	13,75	6,41	9,62	19,2
20,0	0,7167	0,228	14,47	7,13	10,70	20,0
21,0	0,7121	0,216	15,27	7,93	11,90	21,0

Berekening van de isokinetische sucrose gradient. Verklaring der tekens in de tekst.

Deze waarde voor K wordt gebruikt om kolom IV te berekenen met behulp van vergelijking (2).

$$x = 3,29 \frac{\rho_p - \rho_{T,c}}{\eta_{T,c}}$$

In kolom V wordt de waarde van x omgerekend in de meer praktische waarde x<sup>1</sup>, de afstand van een punt in de buis tot de top van de gradient (x = x<sup>1</sup> + 7,34). Het volume dat zich bevindt tussen een punt x<sup>1</sup> in de buis en de top van de gradient, wordt gegeven door de volgende formule:

$$\text{Vol.} = \frac{14,2}{15,8 - 6,34} \cdot x^1 \text{ ml.}$$

De met behulp van deze formule verkregen waarden zijn in kolom VI uitgezet.

### § 3. HET CONSTANT VOLUME "GRADIENT MAKEND" APPARAAT

Indien men gebruik maakt van een constant volume gradient apparaat, wordt de ontstane gradient beschreven door de volgende formule (83):

$$C = C_{\text{mix}} \cdot e^{-\frac{V}{V_{\text{mix}}}} + C_{\text{res}} \cdot (1 - e^{-\frac{V}{V_{\text{mix}}}}) \quad (3)$$

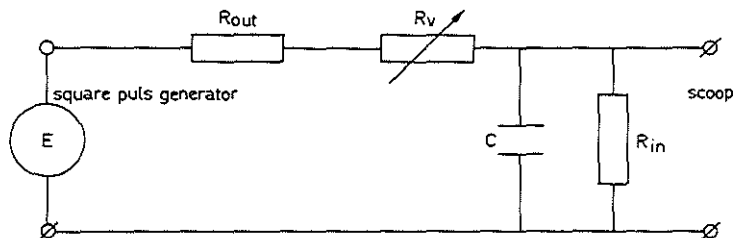
- $C_{\text{mix}}$  : sucrose-concentratie in het mengvat  
 $C_{\text{res}}$  : sucrose-concentratie in het reservoirvat  
 $V_{\text{mix}}$  : volume van de sucrose-oplossing in het mengvat  
 $V$  : uit het mengvat gestroomd volume.

Door nu de parameters  $V_{\text{mix}}$  en  $C_{\text{res}}$  te variëren, kan men de vorm van de gradient veranderen. De waarden die men voor  $V_{\text{mix}}$  en  $C_{\text{res}}$  moet kiezen ten einde een berekende gradient te produceren, zijn op eenvoudige wijze te verkrijgen zoals in de inleiding werd opgemerkt door simulatie van dit type gradient-maker, met behulp van een eenvoudig R-C circuit.

#### § 4. BEREKENING VAN DE PARAMETERS $V_{\text{mix}}$ EN $C_{\text{res}}$ DOOR SIMULATIE VAN EEN CONSTANT VOLUME GRADIENT APPARAAT MET BEHULP VAN EEN R-C CIRCUÏT

Het R-C circuit wordt schematisch weergegeven door fig. IV, 1. Door

Fig. IV, 1.



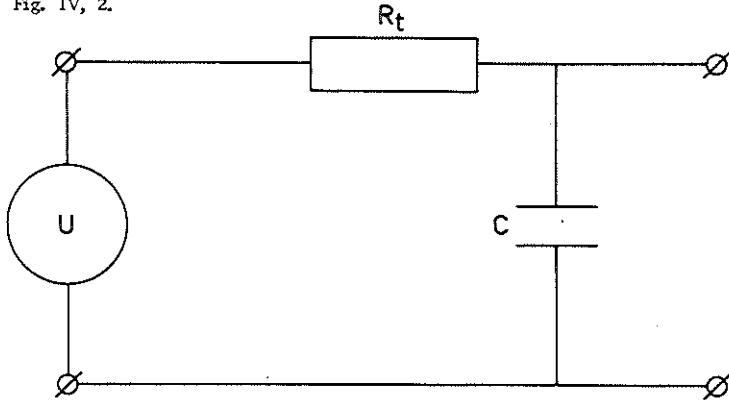
Schema van het oscillator circuit.

$R_v$ : variabele weerstand;  $R_{\text{out}}$ : uitgangsweerstand van de puls-generator;  $R_{\text{in}}$ : ingangsweerstand van de oscilloscoop; C: capaciteit; E: pulsgenerator.

middel van het Theorema van Thevenin (84) kan men dit schema vereenvoudigen tot fig. IV, 2.

Voor dit circuit berekent men de volgende tijdsconstante:

Fig. IV, 2.



Vervangingschema van het oscillator circuit.

$$U = \frac{R_{in}}{R_{out} + R_v + R_{in}} \quad R_t = \frac{R_{in} (R_v + R_{out})}{R_{out} + R_{in} + R_v}$$

$$\tau = C \frac{R_{in} (R_{out} + R_v)}{(R_{in} + R_{out} + R_v)}$$

De uitgangsspanning van een dergelijk circuit wordt, indien men een "step function U" aan de ingang toevoert, gegeven door de volgende formule:

$$V_t = U(1 - e^{t/\tau}) \quad (4)$$

- t : tijd in seconden  
 $\tau$  : tijdconstante van het R-C circuit  
 $V_t$  : uitgangsspanning  
 U : ingangsspanning (step function).

Omvormen van vergelijking (3) §3 die het gedrag van het gradient apparaat beschrijft, leidt tot de volgende gedaante:

$$C = (C_{res} - C_{mix}) \cdot (1 - e^{V/V_{mix}}) + C_{mix} \quad (5)$$

Men ziet nu dat formule (5) die het gradient apparaat beschrijft, identiek is aan formule (4) die het gedrag van een R-C circuit weergeeft, indien men de volgende grootheden met elkaar correleert:

$$(C_{res} - C_{mix}) \approx U; \quad V/V_{mix} \approx t/\tau; \quad V_t \approx C.$$

Het resultaat hiervan is dat men voor het berekenen van de  $V_{mix}$  en  $C_{res}$ , die

men moet gebruiken om een bepaald gevormde gradient te realiseren, nu gebruik kan maken van de overeenkomstige elektrische grootheden  $U$  en  $\tau$ . Men heeft dan alleen een oscilloscoop en een square pulse generator nodig. Door het variëren van de pulshoogte  $U$  van de swaare pulse generator en het variëren van de tijdconstante van het R-C circuit kan iedere exponentiële kromme op het scherm van de oscilloscoop zichtbaar worden gemaakt.

De vereiste kromme, die in tabel IV, 1 wordt gegeven door de kolommen I en IV tekent men op een schaal die overeenkomt met de schaal van de oscilloscoop. Nu wordt door variatie van  $U$  en  $\tau$  de door het R-C circuit gegenereerde kromme uit de gewenste kromme tot dekking gebracht.

#### § 5. PRAKTISCHE UITVOERING VAN DE BEREKENING VAN $V_{\text{mix}}$ EN $C_{\text{res}}$

Wij namen  $C_{\text{mix}}$  als referentie horizontaal (0 Volt op het scherm van de oscilloscoop) en stelden  $(C_{\text{res}} - C_{\text{mix}})$  gelijk aan  $U$  (vergl. 4) en  $V_{\text{mix}}$  gelijk aan  $\tau$  (vergl. 4). Vervolgens bepaalden wij  $U$  en  $\tau$ , waarbij de op de oscilloscoop gegenereerde curve samenviel met de getekende curve. Het resultaat was  $\tau = 1,15$  msec en  $U = 13,0$  Volt. Door het vergelijken van de schaal van de getekende kromme en de schaal en ingestelde waarden van de oscilloscoop konden de volgende correlaties gevonden worden:  $1$  msec  $\equiv 10$  ml  $8$  Volt  $\equiv 15\%$  sucrose. Door gebruik te maken van deze waarden vindt men de volgende waarden voor  $V_{\text{mix}}$  en  $C_{\text{res}}$ :

$$\frac{V_{\text{mix}}}{10 \text{ msec (ml}^{-1}\text{)}} = \frac{1,15 \text{ msec}}{10 \text{ msec (ml}^{-1}\text{)}} = 11,5 \text{ ml}$$

$$(C_{\text{res}} - C_{\text{mix}}) = \frac{13,0 \text{ Volt}}{15/8 \text{ Volt (\%)}^{-1}} = 24,4\% \quad C_{\text{res}} = 5\% + 24,4\% = 29,4\%$$

Tenslotte berekenden wij met behulp van de gevonden waarden voor  $V_{\text{mix}}$  en  $C_{\text{res}}$  en door gebruik te maken van vergelijking (5) en kolom VI van tabel IV, 1 de vorm van de gradient die op deze wijze ontstaat. De resultaten hiervan zijn weergegeven in kolom VII van tabel IV, 1.

Indien men de waarden van kolom I vergelijkt met die van kolom VII blijkt dat een goede overeenkomst bestaat tussen de gewenste gradient en de door middel van het gradient apparaat gevormde gradient.



§ 6. SCHEIDING VAN EEN PAARDEMILT-FERRITINE PREPARAAT IN APO-FERRITINE EN FERRITINEFRACTIES MET EEN OPKLIMMENDE Fe/N VERHOUDING

Teneinde het scheidend vermogen van de in de vorige paragraaf beschreven isokinetische gradient te testen, werd een paardemilt-ferritine preparaat onderworpen aan centrifugatie. De 10% paardemilt-ferritine oplossing werd 4 keer verdund en 0,2 ml van deze oplossing werd op een isokinetische gradient gebracht. Voor het maken van de gradient werd gebruik gemaakt van de volgende sucrose-oplossingen.

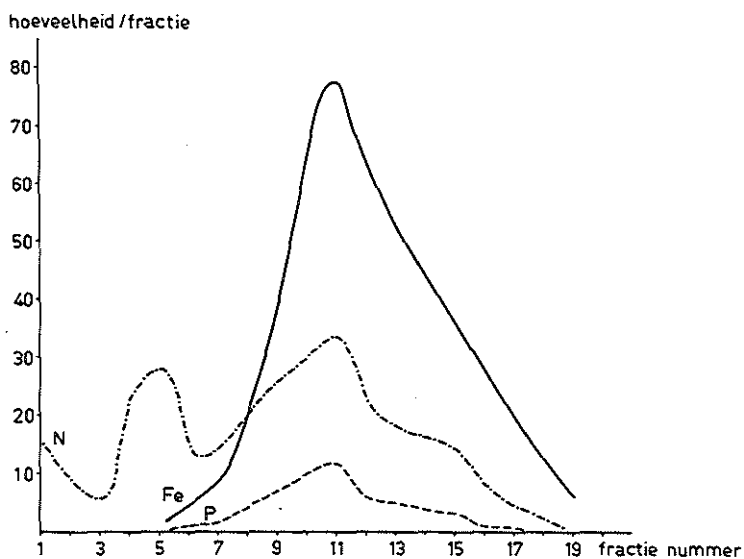
- A. Beginconcentratie 5%:  $\frac{x \text{ g sucrose}}{x \text{ g sucrose} + 100 \text{ g water}} = \frac{5}{100}$  5,3 g sucrose +  
+ 100 ml buffer.
- B. Reservoirconcentratie 29,4%: 41,6 g sucrose +  
+ 100 ml buffer.

Als buffer werd een 0,05 molair boraatbuffer gebruikt pH 8,6. Oplossing B wordt in het reservoir van de gradientmaker gedaan. Terwijl men het mengvat voorziet van 11,5 ml oplossing A. De buizen worden tot 1 cm onder de rand gevuld met de gradient, waarna de ferritine-oplossing op de gradient wordt aangebracht.

Na 3 uur centrifugatie bij  $198 \times 10^3$  g (rotor SW 40 Ti) worden de fracties geëluëerd. Bij deze techniek worden de centrifugebuizen van onderen gepuncteerd. Vervolgens wordt chloroform onder in de buis gepompt. Hierdoor wordt de gehele gradient naar boven gedrukt.

Van de op deze manier verkregen fracties werden de concentratie van Fe, N en  $\text{PO}_4^{3-}$  bepaald. Het resultaat van een dergelijk experiment is weergegeven in fig. IV, 3.

Fig. IV, 3.



Scheiding van ferritine en apoferritine d. m. v. isokineticische gradientcentrifugatie.

----- N gehalte in  $\mu\text{g}$

————— Fe gehalte in  $\mu\text{g}$

----- P gehalte in  $\mu\text{g}$

## HOOFDSTUK V

### DE INBOUW VAN [ $^{59}\text{Fe}$ ] FERRI(III)CITRAAT, [ $^{32}\text{P}$ ] ORTHOFOSFAAT EN AMINOZUREN, [ $^{75}\text{Se}$ ] SELEENMETHIONINE, [ $^{14}\text{C}$ ] ASPARAGINEZUUR EN [ $^3\text{H}$ ] LEUCINE IN KONIJNE- EN RATTELEVER FERRITINE

#### ALGEMENE INLEIDING

Zoals in hoofdstuk I reeds werd opgemerkt, kan ferritine o. a. door middel van ultracentrifugatie gesplitst worden in zware en minder zware fracties. Uit experimenten van o. a. Drysdale (31) is bekend dat, indien radioactief gemerkt ijzer intraveneus in een proefdier wordt gespoten, een gedeelte van deze activiteit in het lever ferritine terecht komt. Ook meenden deze auteurs te kunnen aantonen dat de *de-novo* synthese van het ferritine eiwit door een verhoogd ijzer aanbod wordt geactiveerd. Het bleek namelijk dat bij het inspuiten van grotere hoeveelheden ijzer meer radioactief gemerkte aminozuren in het ferritine werden ingebouwd. Zij ondernamen echter geen poging de specifieke activiteit van de aminozuur "pool" te bepalen, zodat ons inziens de conclusie van een verhoogde aminozuur inbouw in de apoferritine fractie niet geheel vast staat.

In dit hoofdstuk worden experimenten beschreven die tot doel hebben na te gaan hoe de inbouw van ijzer, fosfaat en aminozuren plaats vindt in de verschillende ferritine fracties, die verkregen worden door ultracentrifugatie van ferritine in een sucrose gradient. In het bijzonder wilden wij iets te weten komen omtrent de rol die het fosfaat in het ferritine vervult, aangezien uit literatuur (zie hoofdstuk I) blijkt dat op dit punt ieder gegeven volledig ontbreekt. Ook leek het ons interessant kwantitatieve gegevens te verzamelen met betrekking tot de vernieuwingsnelheden van het eiwit, ijzer en fosfaat in het ferritine. Ook over dit

onderdeel zijn de literatuurgegevens summier.

Als proefdier werd in eerste instantie het konijn gekozen. De inbouw van radioactief gemerkt ijzer (via intraveneuze inspuiting) in het lever ferritine van dit proefdier is goed meetbaar. Het lukte ons echter niet in het intacte proefdier het met  $^{75}\text{Se}$  gemerkte seleenmethionine te incorporeren in het ferritine. Ook de incorporatie van radioactief gemerkt fosfaat was niet aantoonbaar. Zelfs indien wij  $1 \text{ mC } ^{32}\text{P}$  door middel van een drie uur durend infuus in de vena porta, aan een konijn toedienden kon na isolatie van het lever ferritine hierin geen radioactief fosfaat worden aangetoond.

Deze resultaten dwongen ons, voor de bestudering van de incorporatie van aminozuren en fosfaat een andere proefopzet te kiezen. Wij besloten daarom de incorporatie van radioactief gemerkte aminozuren [ $^{75}\text{Se}$ ] seleenmethionine, [ $^{14}\text{C}$ ] asparaginezuur, [ $^3\text{H}$ ] leucine en fosfaat [ $^{32}\text{P}$ ] orthofosfaat door middel van een leverperfusie-techniek te bestuderen.

Aangezien de konijnlever zich in ons geval om technische redenen slecht leende voor perfusiedoeleinden, werden de perfusies met rattelevens uitgevoerd. Ter oriëntatie werden eerst enkele experimenten met een enkel isotoop uitgevoerd, waarna één experiment met drie isotopen tegelijk werd gedaan. Tenslotte werden in het raam van de experimenten betreffende de ijzer inbouw in konijnlever ferritine enige oriënterende proeven gedaan aangaande de rol die het ferritine ijzer speelt bij een door bloedverlies optredend ijzergebrek. Dit naar aanleiding van de opvatting van Mazur en Schorr (18) dat ijzer afkomstig van lever ferritine verantwoordelijk is voor de stijging van het serum ijzer in de beschreven toestand.

#### § 1. DE INBOUW VAN INTRAVENEUS TOEGEDIEND IJZER, GEMERKT MET [ $^{59}\text{Fe}$ ] Fe(III) CHLORIDE IN HET FERRITINE VAN DE KONIJNELEVER

Allereerst werd nagegaan welke ferritine fracties, te weten de lichte of de zware, het meeste ijzer incorporeren na intraveneuze toediening van radioactief gemerkt ijzer. Hiertoe werd een konijn ingespoten met 3 ml van een fysiologische zoutoplossing, die  $150 \mu\text{C } ^{59}\text{Fe}$  s. a.  $0,8 \mu\text{C}/\mu\text{mol Fe}$  bevatte. Na 24 uur werd het konijn opgeofferd en het ferritine werd uit de lever geïsoleerd volgens de in hoofdstuk III beschreven methode. Vervolgens werden het N en het Fe gehalte bepaald en werd de radioactiviteit gemeten. Uit de resultaten van deze analyses volgde dat het geïsoleerde ferritine  $67,2 \mu\text{mol N}$ ,  $24 \mu\text{mol Fe}$  en  $1,14 \times 10^6 \text{ dpm } ^{59}\text{Fe}$  bevatte.

Van deze hoeveelheid ferritine werd de voor de gradient benodigde hoeveelheid, in dit geval 15% van het totaal, door middel van ultracentrifugatie in een sucrose gradient volgens de methode, beschreven in hoofdstuk IV, gefractioneerd. Van de afzonderlijke ferritine fracties werd weer het N en het Fe gehalte bepaald, en werd de radioactiviteit der fracties gemeten. De resultaten van deze analyses staan vermeld in tabel V, 1.

Tabel V, 1.

fractie nummer	$\mu\text{mol N}$	$\mu\text{mol Fe}$	dpm $^{59}\text{Fe}$	$\frac{\text{dpm } ^{59}\text{Fe}}{\mu\text{mol Fe}}$
1	0,15	-	-	-
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	-	-	$1 \cdot 10^3$	-
5	0,76	0,05	$30 \cdot 10^3$	$560 \cdot 10^3$
6	1,25	0,15	$106 \cdot 10^3$	$710 \cdot 10^3$
7	1,34	0,25	$185 \cdot 10^3$	$745 \cdot 10^3$
8	1,25	0,27	$218 \cdot 10^3$	$795 \cdot 10^3$
9	0,93	0,28	$221 \cdot 10^3$	$795 \cdot 10^3$
10	0,76	0,27	$219 \cdot 10^3$	$795 \cdot 10^3$
11	0,63	0,27	$222 \cdot 10^3$	$795 \cdot 10^3$
12	0,66	0,28	$233 \cdot 10^3$	$795 \cdot 10^3$
13	0,56	0,36	$243 \cdot 10^3$	$680 \cdot 10^3$
14	0,58	0,40	$238 \cdot 10^3$	$590 \cdot 10^3$
15	0,54	0,40	$220 \cdot 10^3$	$550 \cdot 10^3$
16	0,48	0,32	$170 \cdot 10^3$	$520 \cdot 10^3$
17	0,32	0,24	$101 \cdot 10^3$	$420 \cdot 10^3$
18	0,23	0,12	$45 \cdot 10^3$	$370 \cdot 10^3$
19	0,10	0,06	$19 \cdot 10^3$	$290 \cdot 10^3$
20	0,16	-	$11 \cdot 10^3$	-
21	-	-	$16 \cdot 10^3$	-
22	-	-	-	-
23	-	-	-	-
24	-	-	-	-

Het N en Fe gehalte in  $\mu\text{molen}$  en de radioactiviteit in dpm's van  $^{59}\text{Fe}$  benevens de s. a. in fracties verkregen door ultracentrifugatie van konijnlever ferritine geïsoleerd na intraveneuze injectie van  $[^{59}\text{Fe}] \text{Fe(III)chloride}$ .

Uit de gegevens van tabel V, 1 blijkt dat na 24 uur het ingebouwde ijzer zich niet homogeen over de fracties heeft verdeeld. Dit volgt uit de waarde van de s. a. in dpm  $^{59}\text{Fe}/\mu\text{mol Fe}$  die niet constant is voor alle fracties.

Teneinde na te gaan hoeveel tijd er nodig is om de s. a. der fracties wel constant te doen zijn, werd een konijn intraveneus ingespoten met  $96 \times 10^6$  dpm  $[^{59}\text{Fe}] \text{FeCl}_3$  s. a.  $0,8 \mu\text{C}/\mu\text{mol Fe}$ . Deze dosis werd gedurende drie dagen her-

haald. Vier dagen na de eerste injectie werd het konijn opgeofferd en het ferritine werd geïsoleerd en geanalyseerd. Het ferritine bevatte 56  $\mu\text{mol N}$ , 24  $\mu\text{mol Fe}$  en 3,4  $\mu\text{mol P}$ . Ook nu werd weer een gedeelte van het ferritine door middel van gradient centrifugatie gefractioneerd. De resultaten hiervan staan vermeld in tabel V, 2.

Tabel V, 2.

fractie nummer	$\mu\text{mol N}$	$\mu\text{mol Fe}$	$\mu\text{mol P}$	dpm $^{59}\text{Fe}$	$\frac{\text{dpm } ^{59}\text{Fe}}{\mu\text{mol Fe}}$
1	11,4	-	-	-	-
2	6,9	-	-	-	-
3	2,1	-	-	-	-
4	0,7	-	-	-	-
5	0,9	-	-	-	-
6	1,8	0,16	-	$45 \cdot 10^3$	$28 \cdot 10^3$
7	2,8	0,36	0,104	$147 \cdot 10^3$	$408 \cdot 10^3$
8	2,9	0,61	0,135	$280 \cdot 10^3$	$459 \cdot 10^3$
9	3,3	0,89	0,173	$400 \cdot 10^3$	$449 \cdot 10^3$
10	3,0	1,12	0,232	$540 \cdot 10^3$	$482 \cdot 10^3$
11	3,5	1,48	0,300	$707 \cdot 10^3$	$477 \cdot 10^3$
12	3,7	1,90	0,326	$907 \cdot 10^3$	$477 \cdot 10^3$
13	3,8	2,30	0,378	$1173 \cdot 10^3$	$510 \cdot 10^3$
14	4,5	2,64	0,430	$1437 \cdot 10^3$	$544 \cdot 10^3$
15	4,2	3,24	0,460	$1825 \cdot 10^3$	$563 \cdot 10^3$
16	5,1	3,68	0,514	$2157 \cdot 10^3$	$586 \cdot 10^3$
17	4,2	3,68	0,475	$2105 \cdot 10^3$	$572 \cdot 10^3$
18	3,5	2,95	0,358	$1684 \cdot 10^3$	$570 \cdot 10^3$
19	1,8	2,06	0,210	$922 \cdot 10^3$	$447 \cdot 10^3$
20	0,6	0,98	0,116	$466 \cdot 10^3$	$455 \cdot 10^3$
21	-	0,53	0,090	$239 \cdot 10^3$	$450 \cdot 10^3$
22	-	0,69	0,070	$397 \cdot 10^3$	$575 \cdot 10^3$

Het N, Fe en P gehalte in  $\mu\text{molen}$  en de radioactiviteit in dpm's van  $^{59}\text{Fe}$  benevens de s. a. in fracties verkregen door ultracentrifugatie van konijnlever ferritine geïsoleerd na intraveneuze injectie van  $^{59}\text{Fe}$  Fe(III)chloride. De resultaten zijn betrokken op een fractionering van 1000  $\gamma$  ferritine stikstof.

Uit deze tabel blijkt dat na drie keer 24 uur de s. a. (dpm  $^{59}\text{Fe}/\mu\text{mol Fe}$ ) der fracties constant is. De beschreven experimenten werden in duplo verricht. De resultaten van de duplo's komen overeen. In de tabellen is daarom slechts het resultaat van de eerste proef opgenomen.

Voor de technische details betreffende de uitvoering van de proeven zij verwezen naar hoofdstuk II.

Uit deze experimenten blijkt dat van een intraveneus ingespoten dosis  $^{59}\text{Fe}$  na een dag de lichte ferritine fracties het meeste label hebben geïncorporeerd.

Na een tijdsverloop van drie dagen is het label homogeen over de ijzerhoudende ferritine fracties verdeeld.

## § 2. IJZERAFGIFTE UIT KONIJNELEVER-FERRITINE ALS GEVOLG VAN EEN DOOR BLOEDVERLIES ONTSTANE ANAEMIE

Zoals in hoofdstuk I reeds werd besproken, berichtten Mazur en Schorr (18) experimenten betreffende de ijzermobilisatie uit lever ferritine bij anaemisch gemaakte honden. Zij namen waar dat bij herhaald bloed aftappen het serumijzer niveau steeg en concludeerden hieruit dat het voor deze stijging benodigde ijzer rechtstreeks uit het lever ferritine afkomstig was. Deze veronderstelling zou inhouden dat een sterk verlaagd Hb-gehalte een voldoende prikkel zou zijn om het ferritine ijzer te doen mobiliseren. Teneinde deze hypothese te toetsen verrichtten wij het volgende experiment.

Aan een konijn werd intraveneus  $\text{FeCl}_3$  toegediend dat met radioactief  $^{59}\text{Fe}$  gemerkt was. Hiertoe werd gedurende drie achtereenvolgende dagen per dag  $96 \times 10^6$  dpm [ $^{59}\text{Fe}$ ]  $\text{FeCl}_3$  (s. a.  $0,8 \mu\text{C}/\mu\text{mol Fe}$ ), opgelost in 3 ml fysiologisch zout, toegediend. Hierna werd op drie achtereenvolgende dagen 15 ml bloed per venepunctie afgenomen en vervolgens werd op de zevende dag na het begin van het experiment 55 ml bloed door middel van een hartpunctie afgenomen. Op de 8e dag werd het konijn opgeofferd en het lever ferritine geïsoleerd en geanalyseerd. Dit ferritine bevatte  $79 \mu\text{mol N}$ ;  $36 \mu\text{mol Fe}$ ;  $4,4 \mu\text{mol P}$ . Hierna werd wederom een gedeelte van het ferritine op een sucrose gradient gebracht en door middel van ultracentrifugatie gefractioneerd. De analyse-resultaten zijn samengevat in tabel V, 3. Aangezien het proefdier dat in dit experiment werd gebruikt eenzelfde hoeveelheid gemerkt ijzer kreeg toegediend als het proefdier dat werd gebruikt voor het in § 1 beschreven experiment, levert een vergelijken van tabel V, 2 met tabel V, 3 ons informatie betreffende de vraag of het ferritine zijn ijzer aan de circulatie afgeeft indien door bloedafnemen een anaemie wordt opgewekt. Aangezien er geen verschil bestaat tussen de hoeveelheid lever ferritine in het dier dat niet en het dier dat wel gebloed heeft en er ook geen kwalitatief verschil bestaat tussen de ferritine monsters van beide dieren is van een duidelijke afgifte van ijzer uit het lever ferritine geen sprake. Ook een duplo experiment dat door ons werd verricht leidde tot hetzelfde resultaat.

Tijdens de periode van bloedafname werden het serum ijzer en de Totale IJzer Bindings Capaciteit (T. Y. B. C.) bepaald op vier achtereenvolgende

Tabel V, 3.

fractie nummer	$\mu\text{mol N}$	$\mu\text{mol Fe}$	$\mu\text{mol P}$	dpm <sup>59</sup> Fe	$\frac{\text{dpm}^{59}\text{Fe}}{\mu\text{mol Fe}}$
1	12,1	-	-	-	-
2	8,5	-	-	-	-
3	4,8	-	-	-	-
4	3,2	-	-	-	-
5	1,6	-	-	-	-
6	1,3	-	-	-	-
7	1,7	0,18	-	$54 \cdot 10^3$	$290 \cdot 10^3$
8	2,1	0,36	0,09	$121 \cdot 10^3$	$336 \cdot 10^3$
9	2,4	0,64	0,11	$199 \cdot 10^3$	$310 \cdot 10^3$
10	2,6	0,74	0,15	$280 \cdot 10^3$	$378 \cdot 10^3$
11	2,5	0,98	0,10	$370 \cdot 10^3$	$377 \cdot 10^3$
12	2,6	1,30	0,20	$494 \cdot 10^3$	$380 \cdot 10^3$
13	2,4	1,63	0,24	$638 \cdot 10^3$	$391 \cdot 10^3$
14	3,3	1,98	0,32	$801 \cdot 10^3$	$404 \cdot 10^3$
15	3,3	2,34	0,25	$986 \cdot 10^3$	$421 \cdot 10^3$
16	3,3	2,74	0,32	$1188 \cdot 10^3$	$433 \cdot 10^3$
17	3,5	2,91	0,33	$1329 \cdot 10^3$	$456 \cdot 10^3$
18	2,9	2,80	0,29	$1332 \cdot 10^3$	$475 \cdot 10^3$
19	2,7	2,57	0,29	$1124 \cdot 10^3$	$437 \cdot 10^3$
20	1,5	1,88	0,19	$775 \cdot 10^3$	$412 \cdot 10^3$
21	1,1	1,16	0,13	$453 \cdot 10^3$	$390 \cdot 10^3$
22	0,5	0,64	0,11	$260 \cdot 10^3$	$406 \cdot 10^3$
23	-	0,29	-	$123 \cdot 10^3$	$424 \cdot 10^3$

Het N, Fe en P gehalte in  $\mu\text{molen}$  en de radioactiviteit in dpm's van <sup>59</sup>Fe benevens de s. a. in fracties verkregen door ultracentrifugatie van konijnle-  
 ver ferritine geïsoleerd na intraveneuze injectie van [<sup>59</sup>Fe] Fe(III)chloride.  
 De resultaten zijn betrokken op een fractionering van 1000  $\gamma$  ferritine stilstof.

dagen. De resultaten hiervan waren als volgt:

- 1e dag 28  $\mu\text{mol Fe/L}$ ; T.Y.B.C. 93  $\mu\text{mol/L}$ ;
- 2e dag 32  $\mu\text{mol Fe/L}$ ; T.Y.B.C. 80  $\mu\text{mol/L}$ ;
- 3e dag 36  $\mu\text{mol Fe/L}$ ; T.Y.B.C. 83  $\mu\text{mol/L}$ ;
- 4e dag 33  $\mu\text{mol Fe/L}$ . T.Y.B.C. 70  $\mu\text{mol/L}$ .

Er is dus sprake van een geringe stijging van het serum ijzer overeenkomstig de experimenten van Mazur en Schorr (18).

Gemiddeld bevat een konijnle-  
 ver 80  $\mu\text{mol}$  ferritine ijzer (zie hoofdstuk III).  
 Een stijging van het serum ijzer van 5  $\mu\text{mol/L}$  zou dus neerkomen op 1  $\mu\text{mol Fe}$   
 die door het ferritine geleverd zou worden volgens Mazur en Schorr indien men  
 als bloedvolume 200 ml aanneemt. Dit valt met onze proefopzet niet te bewijzen.  
 De hoeveelheid ijzer die volgens Mazur en Schorr zou overgaan van lever fer-  
 ritine naar bloed transferrine valt binnen de bepalingfouten.

Als secundair effect van het bloeden treedt een versnelde Hb synthese op.



Door ons werd nagegaan hoeveel Hb werd gesynthetiseerd gedurende de periode waarin het proefdier anaemisch werd gemaakt. Allereerst werd hiertoe het bloedvolume bepaald op het moment dat met bloedafnemen werd begonnen. Dit gebeurde door de verdunning na te gaan van een met  $^{125}\text{I}$  gemerkt albumine preparaat. Vervolgens werd steeds na iedere keer bloed aftappen het Hb gehalte in het afgenomen bloed bepaald en tenslotte werd op de dag waarop het konijn zou worden op geofferd nogmaals het bloedvolume bepaald. De resultaten van deze bepalingen zijn gerangschikt in tabel V, 4. Aan de hand van deze tabel berekenen wij een netto Hb synthese van 139  $\mu\text{mol}$  Hb (Fe).

Tabel V, 4.

tijd	bloed volume	Hb (Fe)m. mol/1	afgenomen volume bloed	hoeveelheid Hb afgenomen
1e dag	190 ml	6,5	15 ml	97 $\mu\text{mol}$
2e dag	-	6,0	15 ml	90 "
3e dag	-	5,6	15 ml	84 "
4e dag	-	4,8	55 ml	264 "
5e dag	195 ml	4,3	-	-
			Totaal afgenomen	535 $\mu\text{mol}$

De totale hoeveelheid Hb die door venepunctie en hartpunctie aan het proefdier werd onttrokken.

Het is duidelijk dat indien het lever ferritine in eerste instantie het voor deze Hb synthese benodigde ijzer levert, dit wel degelijk aantoonbaar zou moeten zijn met onze proefopzet. Uit onze resultaten blijkt dus dat er geen sprake is van het afgeven van ijzer uit het lever ferritine onder deze omstandigheden. Naar alle waarschijnlijkheid bevindt zich voldoende ijzer in de bloedvormende organen om 139  $\mu\text{mol}$  Fe te kunnen leveren zonder dat het lever ferritine hoeft te worden aangesproken.

Uiteraard lieten onze resultaten de mogelijkheid open dat ferritine het ijzer levert voor de Hb synthese in een later stadium. Teneinde dit te onderzoeken zullen experimenten moeten worden gedaan die zich over een langere tijdsduur dan 8 dagen uitstrekken.

### § 3. DE BESCHRIJVING VAN DE BIJ DE PERFUSIE EXPERIMENTEN GEVOLGDE WERKWIJZE

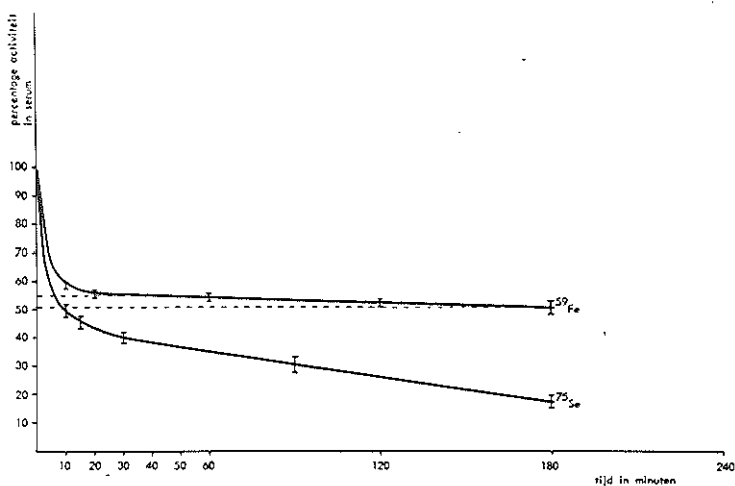
Zoals in § 1 van dit hoofdstuk reeds werd opgemerkt verrichtten wij onze perfusie experimenten met rattelevers die zich uit technisch oogpunt beter voor deze experimenten lenen dan de veel grotere konijnevers. Door middel van een in hoofdstuk II beschreven opstelling, werd geoxygeneerd ratteserum via de vena porta door de geïsoleerde rattelever gepompt. Het serum verlaat de lever via een canule door het rechter atrium in de vena cava geplaatst. De ductus cholecochus is tijdens de perfusie afgebonden. Het normaal functioneren van de lever werd nagegaan door het zuurstof verbruik te meten. Over het algemeen werd volstaan met een circa drie uur durende perfusie. Gebruik werd gemaakt van een mengserum, bereidt uit de sera van een groot aantal ratten zodat iedere perfusie weliswaar met verschillende levers doch met eenzelfde mengserum plaatsvond. Per perfusie werd ongeveer 50 ml van dit mengserum waaraan 25 ml Krebs-Ringer oplossing was toegevoegd gebruikt. Alvorens het mengserum werd verdeeld in porties van 50 ml werd het transferrine in het serum voor 80% met ijzer verzadigd. Voor het opladen werd Fe(III)citraat gebruikt. Zie voor bijzonderheden betreffende de gevolgde werkwijze hoofdstuk II.

Steeds werd per experiment bestaande uit 5 perfusies ongeveer 250 ml van het mengserum afgezonderd. Deze 250 ml onderging de noodzakelijke voorbehandeling zoals het op 80% verzadiging brengen van het transferrine met Fe(III)-citraat en het toevoegen van radioactieve stoffen. Na het beëindigen van de perfusies werden de levers samengevoegd, en werd hieruit het ferritine geïsoleerd volgens de in hoofdstuk III beschreven methode. Het aldus geïsoleerde zuivere ferritine werd door middel van gradientcentrifugatie zoals beschreven in hoofdstuk IV gefractioneerd. Hierbij dient te worden opgemerkt dat bij de experimenten beschreven in de paragrafen 4 en 7 van dit hoofdstuk de gradient zodanig werd geëluëerd dat ongeveer 20 fracties werden opgevangen. Bij de experimenten beschreven in de paragrafen 5 en 6 werden 2 keer zo grote fracties opgevangen. Het aantal fracties bedroeg hier dan ook ongeveer 10. Van de fracties werd het N, Fe en PO<sub>4</sub> gehalte bepaald en de radioactiviteit van het gebruikte isotoop werd gemeten. Zie hiervoor hoofdstuk II.

#### § 4. INCORPORATIE VAN [ $^{59}\text{Fe}$ ] Fe(III)CITRAAT EN [ $^{75}\text{Se}$ ] SELEENMETHIONINE IN RATTELEVER FERRITINE

Aan 225 ml van het in § 3 genoemde mengserum, dat met Fe(III)citraat tot 80% verzadiging was opgeladen, werd 100  $\mu\text{C}$  [ $^{59}\text{Fe}$ ] Fe(III)citraat (1000  $\mu\text{C}/\mu\text{mol}$  Fe) en 100  $\mu\text{C}$  [ $^{75}\text{Se}$ ] seleenmethionine (s. a. onbekend) toegevoegd. Hierna werd het serum in 5 porties verdeeld en werden 5 perfusies uitgevoerd. Tijdens de perfusies werd de radioactiviteit van het  $^{59}\text{Fe}$  en het  $^{75}\text{Se}$  in serum gemeten. De gemiddelden van deze waarden zijn in figuur V, 1 uitgezet.

Fig. V, 1.



Het verloop tijdens de leverperfusies van de  $^{59}\text{Fe}$  en  $^{75}\text{Se}$  activiteit in serum uitgedrukt in procenten van de activiteit voor de perfusie. Het  $^{59}\text{Fe}$  werd voorafgaande aan de perfusie in de vorm van Fe(III)citraat aan transferrine gebonden waarbij tevens de verzadiging van het transferrine op 80% werd gebracht. Het  $^{75}\text{Se}$  werd als [ $^{75}\text{Se}$ ]seleenmethionine aan het serum toegevoegd. De punten waardoor de lijnen zijn getrokken zijn het gemiddelde van 5 waarnemingen. De spreidingsbreedte is aangegeven.

Teneinde na te gaan of het transferrinegehalte en de s. a. van het serum-ijzer verandert door de perfusie, werden na de perfusie de sera opgevangen. Het transferrinegehalte en de s. a. van de sera werden bepaald en vergeleken met het transferrinegehalte en de s. a. van hetzelfde serum voordat de perfusie plaatsvond. De resultaten van deze bepalingen zijn in tabel V, 5 ondergebracht.

Het ferritine dat uit de levers werd geïsoleerd en geanalyseerd bevatte 17,4  $\mu\text{mol}$  N; 8,1  $\mu\text{mol}$  Fe; 1,25  $\mu\text{mol}$  P en  $1,57 \times 10^6$  dpm  $^{59}\text{Fe}$ . Van deze hoeveelheid ferritine werd 15,5  $\mu\text{mol}$  N op de gradient gebracht. De resultaten van

Tabel V, 5.

Serum	Volume ml	transfer- rine conc.	Fe $\mu\text{mol/l}$	Fe totaal $\mu\text{mol}$	$^{59}\text{Fe}$ dpm/ml	$^{59}\text{Fe}$ totaal dpm	S. A. totaal dpm $^{59}\text{Fe}$ totaal $\mu\text{mol Fe}$
uitgang	225 (5x)	100%	85	19,1	$0,348 \cdot 10^6$	$78 \cdot 10^6$	$4,08 \cdot 10^6$
perfusie 1	44	82%	43	1,89	$0,198 \cdot 10^6$	$8,7 \cdot 10^6$	$4,60 \cdot 10^6$
perfusie 2	40	76%	41	1,64	$0,168 \cdot 10^6$	$6,7 \cdot 10^6$	$4,08 \cdot 10^6$
perfusie 3	42	94%	55	2,30	$0,208 \cdot 10^6$	$8,7 \cdot 10^6$	$3,80 \cdot 10^6$
perfusie 4	60	100%	45	2,70	$0,181 \cdot 10^6$	$10,8 \cdot 10^6$	$4,00 \cdot 10^6$
perfusie 5	50	97%	51	2,54	$0,208 \cdot 10^6$	$10,4 \cdot 10^6$	$4,10 \cdot 10^6$

De incorporatie van  $^{59}\text{Fe}$  in leverweefsel tengevolge van leverperfusie met serum waarvan het transferrine tot 80% verzadiging was opgeladen met [ $^{59}\text{Fe}$ ] Fe(III)citraat.

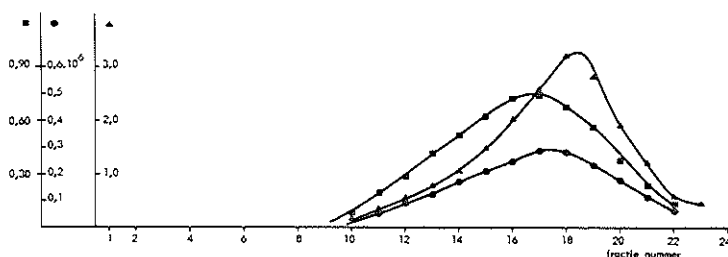
de analyses van de fracties verkregen door gradient centrifugatie zijn weergegeven in tabel V, 6, terwijl een gedeelte van de gegevens uit deze tabel in grafiek is gebracht (grafiek V, 2).

Tabel V, 6.

fractie nummer	$\mu\text{mol N}$	$\mu\text{mol Fe}$	$\mu\text{mol P}$	dpm $^{59}\text{Fe}$	$\frac{\text{dpm } ^{59}\text{Fe}}{\mu\text{mol Fe}}$	cpm $^{75}\text{Se}$	$\frac{\text{cpm } ^{75}\text{Se}}{\mu\text{mol N}}$
1	3,00	-	-	-	-	522	182
2	3,88	-	-	-	-	2470	630
3	3,40	-	-	-	-	2777	798
4	2,56	-	-	-	-	1872	728
5	1,86	-	-	-	-	1184	630
6	0,86	-	-	-	-	609	700
7	0,54	-	-	-	-	366	672
8	0,43	-	-	-	-	322	742
9	0,50	-	-	$26 \cdot 10^3$	-	-	-
10	0,74	0,15	-	$64 \cdot 10^3$	$429 \cdot 10^3$	-	-
11	1,16	0,26	0,101	$137 \cdot 10^3$	$523 \cdot 10^3$	-	-
12	1,34	0,49	0,174	$196 \cdot 10^3$	$402 \cdot 10^3$	-	-
13	1,64	0,77	0,180	$286 \cdot 10^3$	$371 \cdot 10^3$	-	-
14	2,06	1,04	0,270	$351 \cdot 10^3$	$337 \cdot 10^3$	-	-
15	2,44	1,52	0,320	$428 \cdot 10^3$	$280 \cdot 10^3$	-	-
16	2,76	2,08	0,370	$484 \cdot 10^3$	$231 \cdot 10^3$	-	-
17	3,48	2,55	0,450	$501 \cdot 10^3$	$197 \cdot 10^3$	-	-
18	3,28	3,20	0,438	$445 \cdot 10^3$	$138 \cdot 10^3$	-	-
19	2,70	2,80	0,364	$386 \cdot 10^3$	$137 \cdot 10^3$	-	-
20	2,08	1,89	0,271	$256 \cdot 10^3$	$134 \cdot 10^3$	-	-
21	1,24	1,20	0,171	$148 \cdot 10^3$	$122 \cdot 10^3$	-	-
22	0,62	0,55	0,135	$69 \cdot 10^3$	$126 \cdot 10^3$	-	-
23	0,60	0,47	0,135	$65 \cdot 10^3$	$138 \cdot 10^3$	-	-
24	0,38	0,28	-	$18 \cdot 10^3$	$64 \cdot 10^3$	-	-

Het N, Fe en P gehalte in  $\mu\text{molen}$  en de radioactiviteit in dpm's van  $^{59}\text{Fe}$  en  $^{75}\text{Se}$  benevens de s. a. dpm  $^{59}\text{Fe}/\mu\text{mol Fe}$  en cpm  $^{75}\text{Se}/\mu\text{mol N}$  in fracties verkregen door ultracentrifugatie van rattelever ferritine geïsoleerd na perfusie met serum waarvan het transferrine tot 80% verzadiging was opgeladen met [ $^{59}\text{Fe}$ ] Fe(III)citraat en waaraan [ $^{75}\text{Se}$ ] selenmethionine was toegevoegd. De resultaten zijn betrokken op het in de 5 levers aanwezige ferritine terwijl de isolatie een opbrengst van 40% heeft.

Fig. V, 2.



Verband tussen de hoeveelheid geïncorporeerd  $^{59}\text{Fe}$  in dpm en het fosfaat en ijzer gehalte in  $\mu\text{mol}$  in de fracties verkregen door gradientcentrifugatie van rattelever ferritine geïsoleerd na perfusie met serum waarvan het transferrine tot 80% verzadiging was opgeladen met [ $^{59}\text{Fe}$ ] Fe(III)citraat. De gegevens uit deze figuur zijn afkomstig uit tabel V, 6.

- ● ●  $\mu\text{mol P}$
- ■ ■ dpm Fe
- ▲ ▲ ▲  $\mu\text{mol Fe}$

Uit grafiek V, 1 blijkt dat de curve die de opname van ijzer uit het serum beschrijft, een bifasisch verloop heeft. De eerste 15 à 20 minuten vindt een snelle opname plaats (fase I) waarna het serumijzer langzaam blijft dalen (fase II). Hoewel dit verschijnsel voor ijzer niet bekend was is het voor verschillende andere stoffen wel beschreven en staat het in de literatuur bekend als hepatische extractie (85).

Wij veronderstellen dat de daling van het serumijzer in de 2e fase een gevolg is van incorporatie van radioactief ijzer in het lever ferritine. Gedurende de 2e fase wordt de hoeveelheid precursor in de levercellen door de overgang van het ijzer vanuit het serum naar de lever constant gehouden. Zo gesteld is dus de gemeten afname van de activiteit van het serumijzer in de 2e fase gelijk te stellen met de incorporatie van ijzer in het lever ferritine. Uitgaande van deze veronderstelling volgt uit de gegevens die grafiek V, 1 bevat dat  $4,0 \times 10^6$  dpm  $^{59}\text{Fe}$  in het ferritine wordt geïncorporeerd.

Deze incorporatie van ijzer in het ferritine kan ook op een geheel andere wijze worden berekend. Uitgaande van een opbrengst van 40% voor de isolatie van ferritine (zie hoofdstuk III) zouden de 5 levers in totaal  $43,5 \mu\text{mol N}$ ;  $20 \mu\text{mol Fe}$ ;  $3,2 \mu\text{mol P}$  bevatten, terwijl  $3,9 \times 10^6$  dpm  $^{59}\text{Fe}$  in totaal zou zijn geïncorporeerd. De op deze manier berekende hoeveelheid geïncorporeerd ijzer, nl.  $3,9 \times 10^6$  komt nagenoeg overeen met de hoeveel-

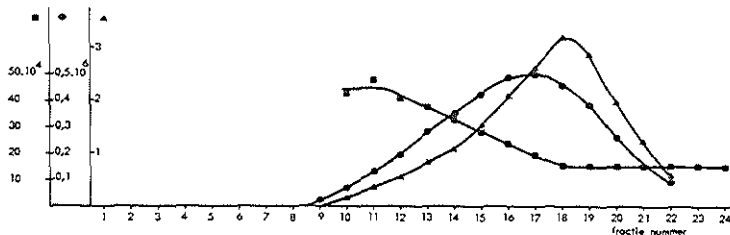
heid van  $4,0 \times 10^6$  dpm die berekend werd door van de gegevens van grafiek V, 5 gebruik te maken.

De hoogste s.a. (dpm  $^{59}\text{Fe}/\mu\text{mol Fe}$ ) in de ferritine fracties bedraagt  $0,4 \times 10^6$ , terwijl de s.a. van het serumijzer een factor 10 hoger is, zoals uit tabel V, 5 blijkt. Op dit verschijnsel wordt in § 7 van dit hoofdstuk en in hoofdstuk VI nader ingegaan.

Indien men grafiek V, 2 bekijkt valt het op dat er een verband bestaat tussen de incorporatie van  $^{59}\text{Fe}$  en fosfaatgehalte van de ferritine-fracties. Zoals af te leiden is uit tabel V, 6 is de verhouding dpm  $^{59}\text{Fe}/\mu\text{mol P}$  voor alle fracties van de gradient constant. Dit zou men kunnen verklaren door aan te nemen dat het geïncorporeerde ijzer het in het ferritine aanwezige fosfaat nodig heeft om zich in de micel te kunnen vastzetten.

De s.a. (dpm  $^{59}\text{Fe}/\mu\text{mol Fe}$ ) der fracties heeft een merkwaardig verloop. Ter illustratie hiervan zijn deze gegevens uit tabel V, 6 in een grafiek uitgezet (Fig. V, 3). Hierop wordt in § 7 van dit hoofdstuk teruggeko-  
men. Ook blijkt uit tabel V, 6 dat de s.a. dpm  $^{75}\text{Se}/\mu\text{mol N}$  in de apoferritine fracties constant is. In de fracties waar ook ijzer is geïncorporeerd zijn echter door de relatief grote hoeveelheid geïncorporeerd  $^{59}\text{Fe}$  t.o.v. de hoeveelheid geïncorporeerd  $^{75}\text{Se}$  geen conclusies betreffende de s.a. van het  $^{75}\text{Se}$  mogelijk, omdat het aantal dpm's  $^{75}\text{Se}$ , dat volgens de in hoofdstuk II beschreven methode werd berekend, onbetrouwbaar is.

Fig. V, 3.



Verband tussen de hoeveelheid geïncorporeerd  $^{59}\text{Fe}$  in dpm en het Fe gehalte in  $\mu\text{molen}$  in de fracties verkregen door gradientcentrifugatie van rattelever ferritine geïsoleerd na perfusie met serum waarvan het transferrine tot 80% verzadiging was opgeladen met [ $^{59}\text{Fe}$ ] Fe(III)citraat.

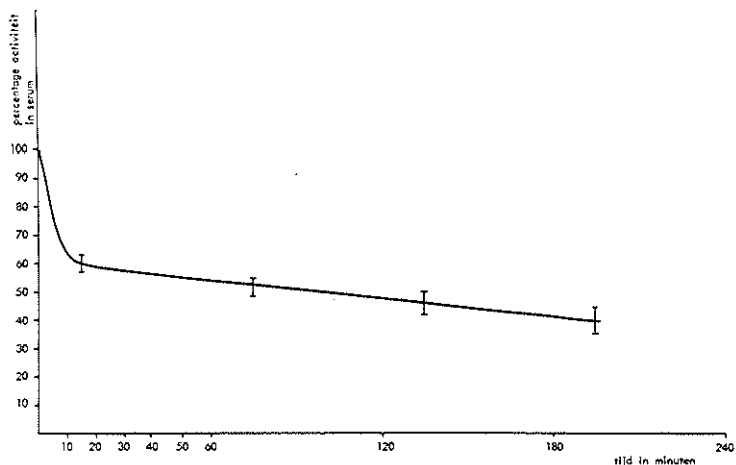
De gegevens zijn afkomstig uit tabel V, 6.

- ▲▲▲  $\mu\text{mol Fe}$
- ■ ■ dpm  $^{59}\text{Fe}/\text{mol Fe}$
- ● ● dpm  $^{59}\text{Fe}$

## § 5. INCORPORATIE VAN [ $^{32}\text{P}$ ] ORTHOFOSFAAT IN RATTELEVER FERRITINE

Aan 250 ml ratteserum, dat, zoals in alle perfusie experimenten tot 80% verzadiging met Fe(III)citraat was opgeladen werd 1 mC [ $^{32}\text{P}$ ] orthofosfaat (s.a. 1mC/ $\mu\text{mol P}$ ) dat in 1 ml fysiologisch zout was opgelost, toegevoegd. Hierna werd deze portie serum in 5 delen gesplitst en met iedere deelportie werd een perfusie uitgevoerd. Tijdens de perfusies werden monsters genomen van het serum, en de radioactiviteit hiervan werd bepaald. De gemiddelden van deze waarden zijn in een grafiek uitgezet (grafiek V, 4).

Fig. V, 4.



Verloop tijdens de leverperfusies van de  $^{32}\text{P}$  activiteit in serum uitgedrukt in procenten van de activiteit voor de perfusie. Het serum transferrine was met Fe(III)citraat tot 80% verzadiging opgeladen. Het  $^{32}\text{P}$  werd als orthofosfaat aan het serum toegevoegd. De punten waardoor de lijn is getrokken zijn het gemiddelde van 5 waarnemingen. De spreidingsbreedte is aangegeven.

Na het beëindigen van de perfusies werd het ferritine uit de 5 levers geïsoleerd, volgens de in hoofdstuk III beschreven methode. Van het supernatans dat ontstaat na de hitte-behandeling werd een gedeelte met ijskoude 10% T.C.A. onteiwit, waarna het anorganisch fosfaat werd bepaald en de radioactiviteit hiervan werd gemeten. Zie voor de fosfaatbepaling hoofdstuk II. Tevens werd een gedeelte van het supernatans gedestruëerd, het anorganisch

fosfaat dat zodoende ontstaat werd bepaald en de radioactiviteit hiervan werd gemeten. De aldus verkregen waarde is een maat voor de som van anorganisch en organisch fosfaat in het supernatans. Het gehalte aan organisch fosfaat berekent men door het gevonden anorganisch fosfaat van de hoeveelheid totaal fosfaat af te trekken. Op deze wijze vinden wij als s.a. voor anorganisch fosfaat in het lever weefsel na 3 uur perfusie  $0,10 \times 10^6$  dpm/ $\mu$ mol P. De s.a. van organisch fosfaat bedraagt  $0,07 \times 10^6$  dpm/ $\mu$ mol P.

Uit grafiek V, 4 blijkt dat de levers in staat zijn in een tijdsverloop van 3 uur 60% van het aangeboden anorganisch fosfaat op te nemen. Tweederde van deze hoeveelheid wordt binnen een tijd van circa 15 minuten opgenomen volgens een patroon dat sterke overeenkomst vertoont met dat van de opname van serum ijzer door de lever (zie grafiek V, 1). Ook de opname van fosfaat is een proces dat zich in 2 fasen afspeelt. Bij de ijzer incorporatie konden wij de daling van het serum ijzer in de 2e fase exclusief toeschrijven aan incorporatie van het uit het serum opgenomen ijzer in het ferritine. Van een dergelijke aanname kunnen wij voor de daling van het serum fosfaat in de 2e fase echter niet a priori uitgaan. Dit als gevolg van het feit dat anorganisch fosfaat de precursor is voor zeer veel andere fosfaat verbindingen naast het ferritine. Het onttrekken van anorganisch fosfaat aan het serum in de 2e fase zou dus intensiever kunnen geschieden dan bij ijzer het geval is. Voor deze opvatting zijn in onze waarnemingen aanknopingspunten te vinden.

De resultaten verkregen na de fractionering van het geïsoleerde ferritine zijn samengevat in tabel V, 7. Uit deze tabel blijkt dat de s.a. (dpm  $^{32}\text{P}/\mu\text{mol P}$ ) constant is voor alle fosfaat houdende fracties. Ook is de s.a. van het ferritine fosfaat van dezelfde orde van grootte als de s.a. van het organisch- en anorganisch fosfaat in de lever. Het ligt voor de hand aan te nemen dat het fosfaat in het ferritine een vernieuwingsnelheid heeft die van dezelfde orde van grootte is als de doorsnee fosfaat "pool" in leverweefsel. Dit is een zeer onverwacht resultaat, waarop in de algemene discussie nader wordt ingegaan. Tenslotte werd uit de gegevens van tabel V, 7 grafiek V, 5 samengesteld. Uit deze grafiek leiden wij af dat het fosfaat daar wordt geïncorporeerd waar reeds ijzer aanwezig is. Deze aanname is in overeenstemming met het feit dat zich geen fosfaat bevindt in de ijzerloze apoferritine fracties! Er is echter een discrepantie met het feit dat in § 2 werd gesignaleerd dat  $^{59}\text{Fe}$  zich blijkbaar afzet op die plaatsen waar reeds fosfaat aanwezig is. In hoofdstuk VI wordt hierop nader ingegaan.

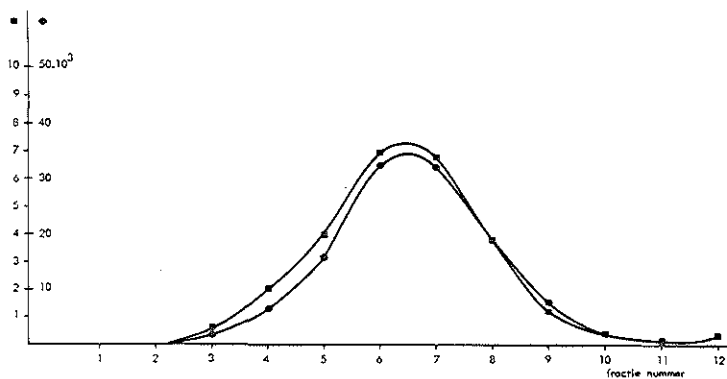


Tabel V, 7.

fractie nummer	$\mu\text{mol N}$	$\mu\text{mol Fe}$	$\mu\text{mol P}$	dpm <sup>32</sup> P	$\frac{\text{dpm}^{32}\text{P}}{\mu\text{mol F}}$
1	13,0	-	-	-	-
2	4,6	-	-	-	-
3	3,3	0,30	0,12	2888	$24 \cdot 10^3$
4	5,0	1,24	0,17	10724	$63 \cdot 10^3$
5	6,8	3,24	0,27	20011	$74 \cdot 10^3$
6	8,9	6,50	0,45	35137	$77 \cdot 10^3$
7	8,3	6,50	0,42	34038	$81 \cdot 10^3$
8	4,8	3,90	0,25	19148	$76 \cdot 10^3$
9	1,5	1,52	0,07	5936	$84 \cdot 10^3$
10	0,5	0,41	-	1909	-
11	0,2	0,16	-	956	-
12	0,7	0,34	-	1788	-

Het N, Fe en P gehalte in  $\mu\text{molen}$  en de radioactiviteit in dpm's van <sup>32</sup>P benevens de s. a. van fosfaat in fracties verkregen door ultracentrifugatie van rattelever ferritine geïsoleerd na perfusie met serum waarvan het transferrine tot 80% verzadiging was opgeladen met Fe(III)citraat en waaraan [<sup>32</sup>P] orthofosfaat was toegevoegd.

Fig. V, 5.



Verband tussen de hoeveelheid geïncorporeerd <sup>32</sup>P in dpm en het Fe gehalte in  $\mu\text{molen}$  in de fracties verkregen door gradientcentrifugatie van rattelever ferritine geïsoleerd na perfusie met serum waarvan het transferrine tot 80% verzadiging was opgeladen met Fe(III)citraat en waaraan [<sup>32</sup>P] orthofosfaat was toegevoegd. De gegevens zijn afkomstig uit tabel V, 7.

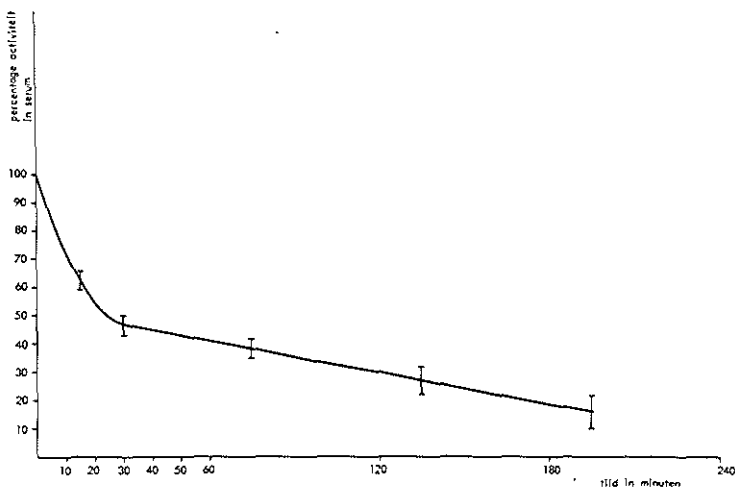
- $\mu\text{mol Fe}$
- dpm<sup>32</sup>P

## § 6. INCORPORATIE VAN [ $^{14}\text{C}$ ] ASPARAGINEZUUR IN RATTELEVER FERRITINE

Aan 250 ml ratteserum, dat met Fe(III)citraat tot 80% was verzadigd, werd 250  $\mu\text{C}$  [ $^{14}\text{C}$ ] asparaginezuur (s.a. 2,8 mC/mmol) toegevoegd. Het isotoop was opgelost in 1 à 2 ml fysiologisch zout. Hierna werd het serum in 5 porties verdeeld en werden achtereenvolgens 5 perfusies uitgevoerd.

Tijdens de perfusies werden serum monsters genomen en de radioactiviteit hiervan bepaald. De gemiddelden van deze waarden zijn in grafiek V, 6 uitgezet. Ook hier speelt de opname van de radioactiviteit uit het serum zich weer in 2 fasen af (zie grafiek V, 1 en V, 4).

Fig. V, 6.



Het verloop tijdens de leverperfusies van de  $^{14}\text{C}$  activiteit in serum uitgedrukt in procenten van de activiteit voor de perfusies. Het serum transferrine was met Fe(III)citraat tot 80% verzadiging opgeladen. Het  $^{14}\text{C}$  werd als [ $^{14}\text{C}$ ] asparaginezuur toegevoegd. De punten waardoor de lijn is getrokken zijn het gemiddelde van 5 waarnemingen. De spreidingsbreedte is aangegeven.

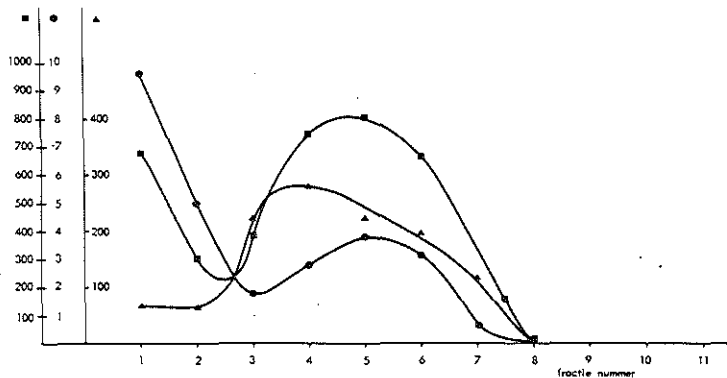
Na de perfusies werd het ferritine uit de levers geïsoleerd, gefractioneerd en geanalyseerd. De resultaten hiervan staan vermeld in tabel V, 8, terwijl een gedeelte van de gegevens uit deze tabel in grafiek V, 7 is weergegeven. Uit deze gegevens blijkt dat de s.a. (dpm  $^{14}\text{C}/\mu\text{mol N}$ ) in de apoferritine fracties constant is, waarna de s.a. snel stijgt, een maximum be-

Tabel V, 8.

fractie nummer	$\mu\text{mol N}$	$\mu\text{mol Fe}$	$\mu\text{mol P}$	dpm $^{14}\text{C}$	$\frac{\text{dpm } ^{14}\text{C}}{\mu\text{mol N}}$
1	9,7	-	-	660	68
2	5,1	-	-	300	60
3	1,7	0,05	-	380	220
4	2,7	1,26	0,09	750	280
5	3,8	3,00	0,17	810	220
6	3,2	2,85	0,15	660	200
7	0,5	0,60	0,03	60	120
8	0,1	0,17	-	-	-
9	-	0,06	-	-	-
10	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-

Het N, Fe en P gehalte in  $\mu\text{molen}$  en de radioactiviteit in dpm's van  $^{14}\text{C}$  benevens de s.a. dpm  $^{14}\text{C}/\mu\text{mol N}$  in fracties verkregen door ultracentrifugatie van rattelever ferritine na perfusie met serum waarvan het transferrine tot 80% verzadiging was opgeladen met Fe(III)citraat en waaraan [ $^{14}\text{C}$ ] asparaginezuur was toegevoegd.

Fig. V, 7.



Verband tussen de hoeveelheid geïncorporeerd  $^{14}\text{C}$  in dpm en het N gehalte in  $\mu\text{molen}$  in de fracties verkregen door gradientcentrifugatie van rattelever ferritine geïsoleerd na perfusie met serum waarvan het transferrine tot 80% was opgeladen met Fe(III)citraat en waaraan [ $^{14}\text{C}$ ] asparaginezuur was toegevoegd. De gegevens zijn afkomstig uit tabel V, 8.

- $\mu\text{mol N}$
- ▲▲▲  $\frac{\text{dpm } ^{14}\text{C}}{\mu\text{mol N}}$
- ■ ■ dpm  $^{14}\text{C}$

reikt en vervolgens weer daalt. Deze resultaten bevestigen de in § 4 gevonden constante s.a. der apoferritine fracties. Opmerkelijk is dat het maximum der s.a. zich op een plaats in de gradient bevindt, waar ferritine met een laag ijzergehalte aanwezig is. Het is duidelijk dat de s.a. der apoferritine fracties veel lager is dan de s.a. van het maximum. Hierdoor ontstaat twijfel aan de gangbare theorie van o.a. Drysdale (31) dat eerst apoferritine zou worden gesynthetiseerd en vervolgens in dit nieuw gevormde apoferritine het ijzer zou worden ingebouwd. In de algemene discussie zal hierop nader worden ingegaan.

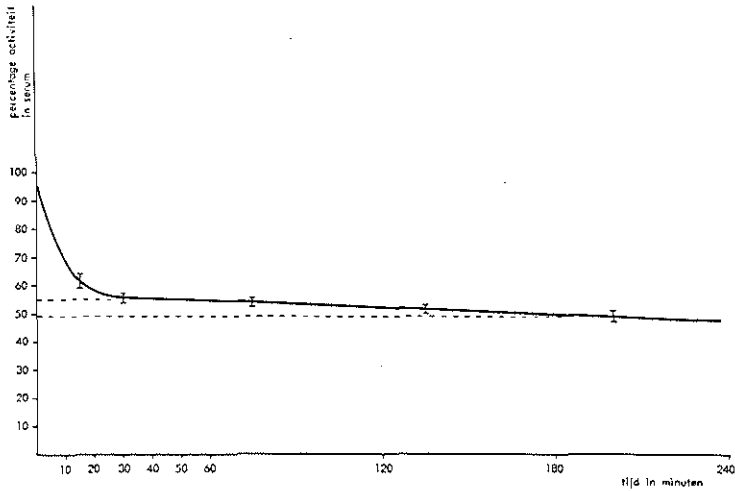
#### § 7. INCORPORATIE VAN [ $^{59}\text{Fe}$ ] Fe(III)CITRAAT. [ $^{32}\text{P}$ ] ORTHOFOSFAAT EN [ $^3\text{H}$ ] LEUCINE IN RATTELEVER FERRITINE

Teneinde de resultaten verkregen in de voorgaande proeven waarbij met een enkel isotoop werd gewerkt, te bevestigen en een direct verband tussen de incorporaties van Fe, fosfaat en de eiwitsynthese te kunnen vaststellen, werd een experiment gedaan waarbij drie isotopen gelijktijdig in ferritine geïncorporeerd werden. Een beschrijving van de methode die ons in staat stelde de drie isotopen nauwkeurig naast elkaar te kunnen bepalen wordt gegeven in hoofdstuk II.

Aan 300 ml serum waarvan het transferrine tot 80% verzadiging was opgeladen met Fe(III)citraat waaraan 200  $\mu\text{C}$  [ $^{59}\text{Fe}$ ] Fe(III)citraat (s.a. 1 mC/ $\mu\text{mol}$ ) was toegevoegd, werd na 1 uur incubatie bij 37°C vervolgens 1 mC [ $^3\text{H}$ ] leucine (s.a. 0,125 mC/ $\mu\text{mol}$ ) en 2 mC [ $^{32}\text{P}$ ] orthofosfaat (s.a. 1 mC/ $\mu\text{mol}$ ) toegevoegd. Hierna werd het serum in 6 gelijke porties verdeeld en vonden achtereenvolgens 6 perfusies plaats.

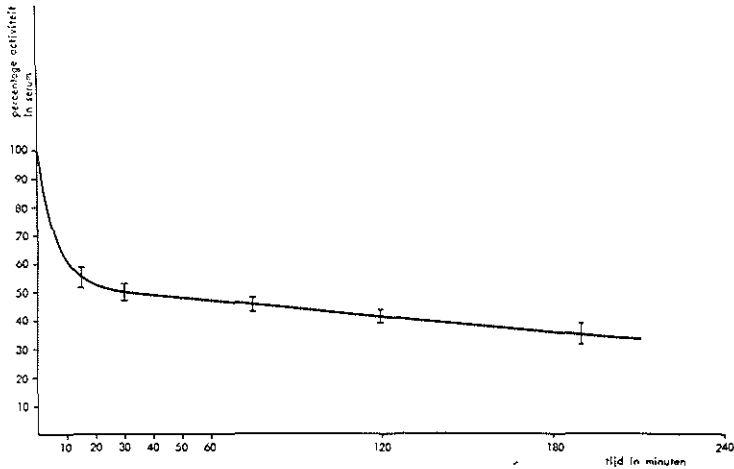
Tijdens de perfusies werden van het serum monsters genomen. Van deze monsters werden de activiteiten van het  $^{59}\text{Fe}$  en het anorganisch  $^{32}\text{P}$  bepaald, terwijl tevens de hoeveelheid anorganisch fosfaat in het serum werd bepaald. De gemiddelden van deze bepalingen werden in de grafieken V, 8 en V, 9 uitgezet, terwijl de s.a. van het anorganisch fosfaat in grafiek V, 10 werd uitgezet. Het dalen van de s.a. zoals wordt weergegeven in grafiek V, 10 is ons inziens te verklaren door aan te nemen dat niet gemerkt anorganisch fosfaat tijdens de perfusie de lever verlaat. De s.a. daalt tijdens een 4 uur durende perfusie van  $850 \times 10^3$  dpm/ $\mu\text{mol}$  P tot  $250 \times 10^3$  dpm/ $\mu\text{mol}$  P.

Fig. V, 8.



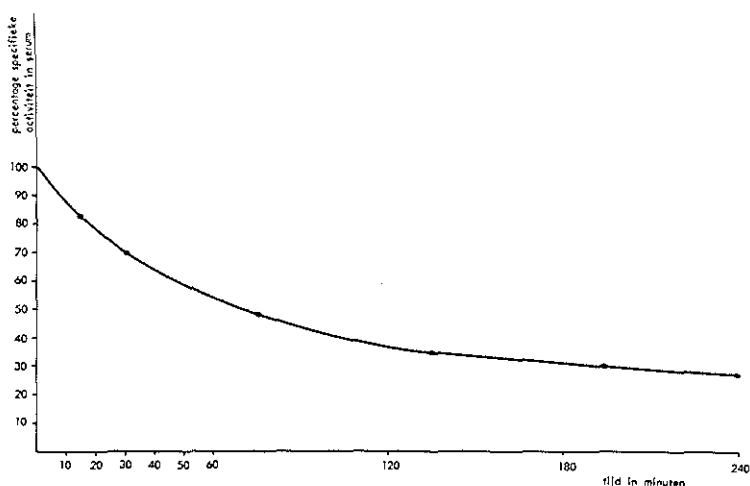
Verloop tijdens de leverperfusies van de  $^{59}\text{Fe}$  activiteit in serum uitgedrukt in procenten van de activiteit voor de perfusies.  $^{59}\text{Fe}$  werd voorafgaande aan de perfusies in de vorm van  $\text{Fe(III)citraat}$  aan transferrine gebonden, waarbij tevens de verzadiging van het transferrine op 80% werd gebracht. Aan het serum waren tevens [ $^{32}\text{P}$ ] orthofosfaat en [ $^3\text{H}$ ] leucine toegevoegd. De punten waardoor de lijn is getrokken zijn het gemiddelde van 5 waarnemingen. De spreidingsbreedte is aangegeven.

Fig. V, 9.



Verloop tijdens de leverperfusies van de  $^{32}\text{P}$  activiteit in serum uitgedrukt in procenten van de activiteit voor de perfusie. Het serum transferrine was met  $\text{Fe(III)citraat}$  tot 80% verzadiging opgeladen. Het  $^{32}\text{P}$  werd als orthofosfaat aan het serum toegevoegd. De punten waardoor de lijn is getrokken zijn het gemiddelde van 5 waarnemingen. De spreidingsbreedte is aangegeven.

Fig. V, 10.



Verloop tijdens de leverperfusies van de s. a. (dpm  $^{32}\text{P}/\mu\text{mol P}$ ) van het anorganisch fosfaat in serum uitgedrukt in procenten van de s. a. voor de perfusie.

$^{59}\text{Fe}$  werd voorafgaande aan de perfusie in de vorm van  $\text{Fe(III)citraat}$  aan transferrine gebonden waarbij tevens de verzadiging van het transferrine op 80% werd gebracht. Aan het serum waren tevens [ $^{32}\text{P}$ ] orthofosfaat en [ $^3\text{H}$ ] leucine toegevoegd. De punten waardoor de lijn is getrokken zijn de gemiddelden van 5 waarnemingen.

Wederom werd na het beëindigen der perfusies het ferritine uit de levers geïsoleerd, tevens werd de s.a. van het anorganisch fosfaat bepaald in het supernatans dat tijdens de isolatie van het ferritine ontstaat. De s.a. van het anorganisch fosfaat bedroeg  $141 \times 10^3$  dpm/ $\mu\text{mol P}$  zodat het anorganisch fosfaat in het serum na 4 uur perfusie nog niet in evenwicht is met het anorganisch fosfaat in de lever. Het geïsoleerde ferritine had de volgende samenstelling: 53  $\mu\text{mol N}$ ; 21  $\mu\text{mol Fe}$ ; 1,9  $\mu\text{mol P}$ ;  $161 \times 10^3$  dpm  $^3\text{H}$ ;  $65 \times 10^5$  dpm  $^{59}\text{Fe}$ ;  $230 \times 10^3$  dpm  $^{32}\text{P}$ . Hiervan werd 40  $\mu\text{mol N}$  op een sucrose gradient gebracht en gefractioneerd. De analyse resultaten van deze fractionering staan vermeld in tabel V, 9, terwijl uit gegevens van deze tabel de grafieken V, 11, V, 12 en V, 13 werden geconstrueerd.

Uit tabel V, 9 blijkt dat de s.a. van het fosfaat in de fosfaat houdende fracties constant is. Als gemiddelde waarde vindt men voor deze s.a.  $140 \times 10^3$  dpm/ $\mu\text{mol P}$ . Deze waarde is nagenoeg gelijk aan de s.a. van het anorganisch fosfaat in de lever. Hierdoor wordt ons inziens aannemelijk dat anorganisch fosfaat een directe precursor is voor het fosfaat in het ferritine.

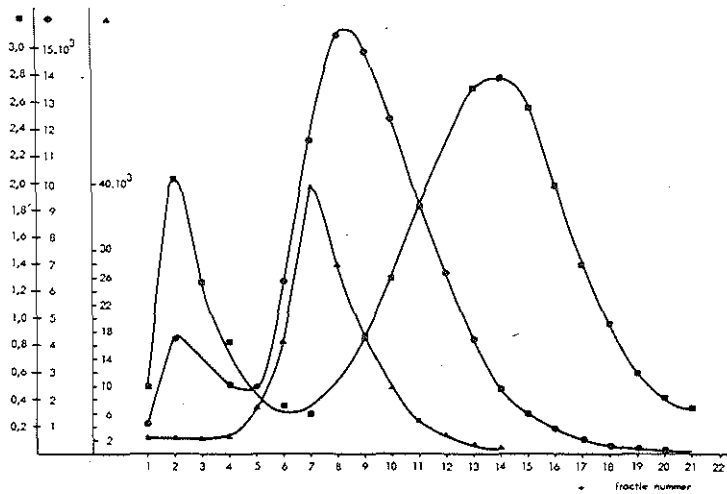
Uit grafiek V, 11 blijkt dat de maximale inbouw van het [ $^3\text{H}$ ] leucine

Tabel V, 9.

fractie nummer	$\mu\text{mol N}$	$\mu\text{mol Fe}$	$\mu\text{mol P}$	dpm $^3\text{H}$	dpm $^{59}\text{Fe}$	dpm $^{32}\text{P}$	$\frac{\text{dpm } ^3\text{H}}{\mu\text{mol N}}$	$\frac{\text{dpm } ^{59}\text{Fe}}{\mu\text{mol Fe}}$	$\frac{\text{dpm } ^{32}\text{P}}{\mu\text{mol P}}$
1	0,50	-	-	1176	-	-	2300	-	-
2	2,05	-	-	4304	-	-	2100	-	-
3	1,26	-	-	3619	-	-	2900	-	-
4	0,84	-	-	2637	-	-	3000	-	-
5	0,34	-	-	2408	$4 \cdot 10^3$	-	7000	-	-
6	0,38	0,030	-	6326	$18 \cdot 10^3$	490	16500	$60 \cdot 10^4$	-
7	0,28	0,079	0,014	11674	$53 \cdot 10^3$	1120	41500	$67 \cdot 10^4$	-
8	0,68	0,167	0,020	15684	$108 \cdot 10^3$	2140	26000	$65 \cdot 10^4$	-
9	0,73	0,278	0,035	15000	$188 \cdot 10^3$	3740	20500	$67 \cdot 10^4$	$125 \cdot 10^3$
10	1,31	0,490	0,050	12556	$265 \cdot 10^3$	6140	9600	$54 \cdot 10^4$	$124 \cdot 10^3$
11	1,84	0,830	0,058	9369	$376 \cdot 10^3$	8750	5060	$45 \cdot 10^4$	$145 \cdot 10^3$
12	2,30	1,311	0,104	6732	$495 \cdot 10^3$	12900	3280	$38 \cdot 10^4$	$125 \cdot 10^3$
13	2,74	1,848	0,121	4204	$537 \cdot 10^3$	17300	1530	$29 \cdot 10^4$	$143 \cdot 10^3$
14	2,79	2,352	0,148	2489	$537 \cdot 10^3$	19600	900	$23 \cdot 10^4$	$132 \cdot 10^3$
15	2,59	2,602	0,150	1510	$462 \cdot 10^3$	17300	580	$17 \cdot 10^4$	$120 \cdot 10^3$
16	1,98	1,680	0,091	941	$310 \cdot 10^3$	12500	470	$18 \cdot 10^4$	$138 \cdot 10^3$
17	1,40	1,053	0,038	566	$192 \cdot 10^3$	7200	400	$18 \cdot 10^4$	$190 \cdot 10^3$
18	0,96	0,597	0,023	367	$102 \cdot 10^3$	3960	370	$17 \cdot 10^4$	$164 \cdot 10^3$
19	0,59	0,294	0,014	279	$52 \cdot 10^3$	2000	-	$18 \cdot 10^4$	$142 \cdot 10^3$
20	0,38	0,181	-	187	$32 \cdot 10^3$	-	-	$18 \cdot 10^4$	-
21	0,33	0,152	-	246	$32 \cdot 10^3$	-	-	$20 \cdot 10^4$	-
22	0,67	0,332	-	607	$75 \cdot 10^3$	-	-	$22 \cdot 10^4$	-

Het N, Fe en P gehalte in  $\mu\text{molen}$  en de radioactiviteit in dpm's van  $^{59}\text{Fe}$ ,  $^{32}\text{P}$  en  $^3\text{H}$  benevens de s. a. dpm  $^{59}\text{Fe}/\mu\text{mol Fe}$ , dpm  $^{32}\text{P}/\mu\text{mol P}$ , dpm  $^3\text{H}/\mu\text{mol N}$  in fracties verkregen door ultracentrifugatie van rattelever ferritine geïsoleerd na perfusie met serum waarvan het transferrine tot 80% verzadiging was opgeladen met [ $^{59}\text{Fe}$ ] Fe(III)citraat en waaraan [ $^{32}\text{P}$ ] orthofosfaat en [ $^3\text{H}$ ] leucine was toegevoegd.

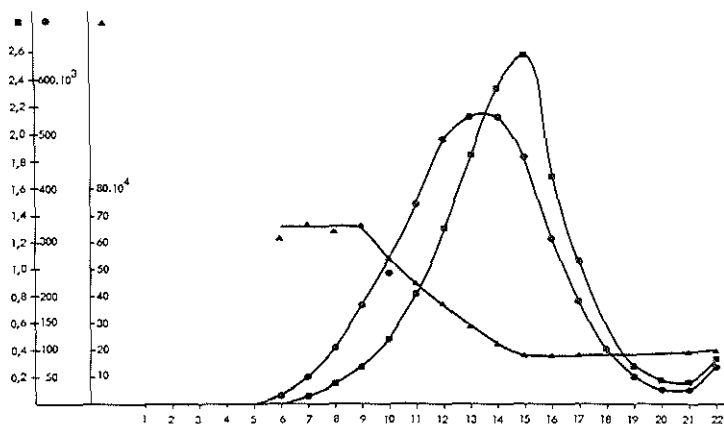
Fig. V, 11.



Het verband tussen de hoeveelheid geïncorporeerd [ $^3\text{H}$ ] leucine in dpm en het stikstofgehalte in  $\mu\text{molen}$  in fracties verkregen door ultracentrifugatie van rattelever ferritine geïsoleerd na perfusie met serum waarvan het transferrine tot 80% verzadiging was opgeladen met [ $^{59}\text{Fe}$ ] Fe(III)citraat en waaraan [ $^3\text{H}$ ] leucine en [ $^{32}\text{P}$ ] orthofosfaat was toegevoegd. De gegevens zijn ontleend aan tabel V, 9.

■ ■ ■  $\mu\text{mol N}$ , ▲ ▲ ▲ dpm  $^3\text{H}/\mu\text{mol N}$ , ● ● ● dpm  $^3\text{H}$ .

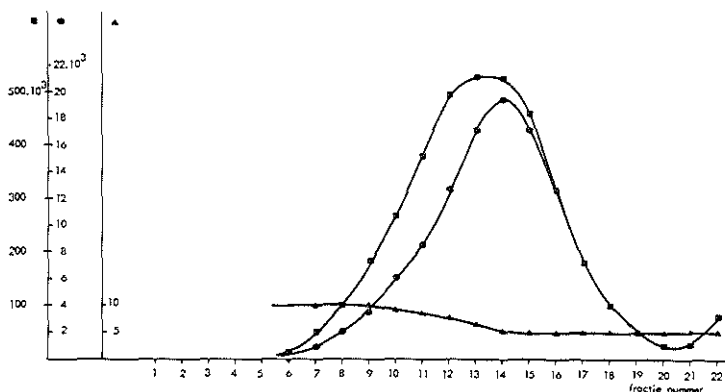
Fig. V, 12.



Het verband tussen de hoeveelheid geïncorporeerd <sup>59</sup>Fe in dpm en het ijzergehalte in molen in fracties verkregen door ultracentrifugatie van rattelever ferritine geïsoleerd met serum waarvan het transferrine tot 80% verzadiging met [<sup>59</sup>Fe] Fe(III)-citraat en waaraan [<sup>3</sup>H] leucine en [<sup>32</sup>P] orthofosfaat was toegevoegd. De gegevens zijn ontleend aan tabel V, 9.

- ■ ■ μmol Fe
- ▲ ▲ ▲ dpm <sup>59</sup>Fe/μmol Fe
- ● ● dpm <sup>59</sup>Fe

Fig. V, 13.



De hoeveelheden <sup>59</sup>Fe en <sup>32</sup>P in dpm's fracties verkregen door ultracentrifugatie van rattelever ferritine geïsoleerd na perfusie met serum waaraan het transferrine tot 80% verzadiging was opgeladen met [<sup>59</sup>Fe] Fe(III)citraat en waarvan [<sup>3</sup>H] leucine en [<sup>32</sup>P] orthofosfaat was toegevoegd. De gegevens zijn ontleend aan tabel V, 9.

- ■ ■ dpm <sup>59</sup>Fe
- ▲ ▲ ▲ μmol Fe geïncorporeerd/μmol P geïncorporeerd
- ● ● dpm <sup>32</sup>P



evenals van het [ $^{14}\text{C}$ ] asparaginezuur niet in de apoferritine plaatsvindt, doch in die fracties waarin inbouw van  $^{59}\text{Fe}$  plaatsvindt. Dit laatste valt te constateren indien men de grafieken V, 11 en V, 12 vergelijkt.

Grafiek V, 12 komt geheel overeen met grafiek V, 3. die ook de verandering der s.a. dpm  $^{59}\text{Fe}/\mu\text{mol Fe}$  in de fracties weergeeft. Deze s.a. curve valt duidelijk uitéén in 3 delen; een constant deel met hoge s.a., een deel waarin de s.a. vrijwel lineair daalt en een deel van wederom constante maar lage s.a. Volledigheidshalve werd de s.a. van het serumijzer bepaald vóór de perfusie en ook er na. Ook ditmaal bleek de s.a. van het serumijzer vóór en na de perfusie dezelfde waarde te hebben. De s.a. bedroeg  $6,0 \times 10^6$  dpm/ $\mu\text{mol Fe}$ .

Geheel analoog aan de in § 4 gevolgde procedure berekenden wij aan de hand van grafiek V, 8 dat 6% van de totale activiteit van het serum  $^{59}\text{Fe}$  in het ferritine is geïncorporeerd. De totale activiteit van het serum  $^{59}\text{Fe}$  bedraagt  $280 \times 10^6$  dpm zodat  $168 \times 10^5$  dpm  $^{59}\text{Fe}$  in het ferritine moet zijn geïncorporeerd. Indien wij de  $^{59}\text{Fe}$  incorporatie in het ferritine berekenen door uit te gaan van een opbrengst van 40% voor de isolatie, dan volgt hieruit dat  $162 \times 10^5$  dpm  $^{59}\text{Fe}$  is geïncorporeerd. Overeenkomstig de resultaten uit § 4 blijkt dus opnieuw dat de incorporatie van  $^{59}\text{Fe}$  in het ferritine te berekenen is uit de afname van de  $^{59}\text{Fe}$  activiteit in het serum.

Opvallend is dat de s.a. van het serumijzer een factor 10 hoger is dan de hoogste s.a. van de ferritine fracties. Dit verschijnsel werd ook waargenomen in het experiment beschreven in § 4. Dit zou erop kunnen wijzen dat geïncorporeerd  $^{59}\text{Fe}$  voor de incorporatie zou worden verdund met een factor 10. Een incorporatie van  $160 \times 10^5$  dpm  $^{59}\text{Fe}$  met een s.a. van  $60 \times 10^5$  dpm/ $\mu\text{mol Fe}$  in het serum zou dan worden geïncorporeerd in ferritine met een s.a. van  $6 \times 10^5$  dpm/ $\mu\text{mol Fe}$ , hetgeen dus neerkomt op een incorporatie van 26  $\mu\text{mol Fe}$  in het ferritine van de 6 levers. Dit betekent dat, indien deze hypothese juist is, in 4 uur meer dan de helft van het ijzer in het ferritine zou zijn gemerkt. Tegen deze redenering zijn ernstige bezwaren aan te voeren o.a. dat de s.a. van het serumijzer niet daalt, hetgeen bij een zo intensieve vernieuwing wel in de lijn der verwachtingen zou liggen. Een alternatieve hypothese is de volgende: De 10-voudige daling in s.a. van Fe in het ferritine compartiment t.o.v. het serum compartiment zou ook kunnen worden verklaard doordat het met  $^{59}\text{Fe}$  gemerkt ijzer wordt ingebouwd in bepaalde ferritine fracties die reeds gevormd zijn, voordat de perfusie begon. In hoofdstuk VI zal op dit vraagstuk nader worden ingegaan.

## HOOFDSTUK VI

### ALGEMENE DISCUSSIE

Met de door ons ontwikkelde isolatie-methode waarbij de hitte-behandeling was vervangen door een extractie met butanol, kon worden aangetoond dat de hitte-behandeling geen denaturatie van ferritine tot gevolg heeft. Vanwege het gemak van de hitte-behandeling bleef deze stap in het uiteindelijk isolatieschema dat wij uitwerkten gehandhaafd.

In hoofdstuk III werd aangetoond dat de door ons gevolgde isolatie van ferritine-fracties met verschillende Fe/N verhoudingen een redelijke opbrengst te zien geeft. Deze bleek ongeveer 50% te zijn. In de literatuur zijn hierover merkwaardigerwijze geen gegevens te vinden.

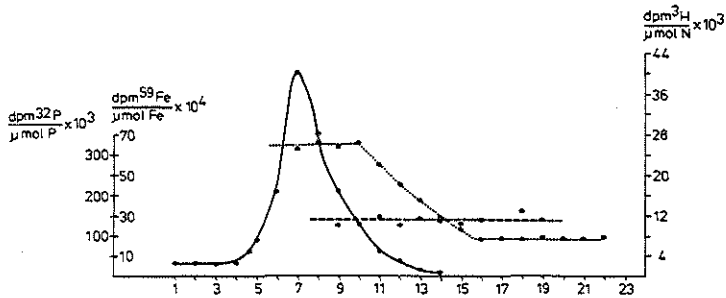
Onderzoek van de  $\alpha$ -,  $\beta$ - en  $\gamma$ -ferritine-fracties verricht met paardemilt ferritine gaf een Fe/N verhouding van 0.40 en een Fe/P verhouding van 4.2 te zien voor zowel  $\alpha$ -,  $\beta$ - als  $\gamma$ -ferritine. Deze resultaten zijn in overeenstemming met de gangbare opvatting dat het  $\beta$ - en  $\gamma$ -ferritine di resp. trimeren van het  $\alpha$ -ferritine zijn. Wij bepaalden tevens de relatieve hoeveelheden waarin deze oligomeren in een ferritine preparaat voorkomen. Vanwege de grote overmaat waarin het  $\alpha$ -ferritine voorkomt zijn wij bij de overige experimenten van dit  $\alpha$ -ferritine uitgegaan.

Bij experimenten met de iso-electrische focuseringstechniek verricht kwam vast te staan dat konijnelever  $\alpha$ -ferritine bestaat uit 4 soorten ferritinen met een verschillend iso-electrisch punt (90). Het bleek, dat de vier fracties ongeveer even groot zijn, indien men de extinctie bij 350 nm als maat voor de hoeveelheid ferritine hanteert. Door I. Urushizaki (87) werd dit resultaat bevestigd. Het feit dat deze auteur meent 8 fracties te kunnen

aantonen valt ons inziens toe te schrijven aan het gebruik van foutieve golflengten bij het doormeten der fracties. Bij de door deze auteur gebruikte golflengte van 260 nm absorberen ook de ampholyten zodat foutieve uitkomsten kunnen worden verkregen. Over de aard van de met de iso-electrische focuseringstechniek verkregen ferritine fracties is op het ogenblik moeilijk een oordeel te geven. In het bijzonder kan de vraag wat de Fe/N verhouding van deze vier fracties is niet beantwoord worden, omdat de ampholyten die zich in deze fracties bevinden een stikstofbepaling in de weg staan.

Fig. VI, 1 geeft een samenvatting van enkele belangrijke resultaten met betrekking tot de incorporatie van ijzer, fosfaat en aminozuren in het ferritine tijdens een rattelever perfusie. Deze gegevens kunnen slechts geëvalueerd worden, indien inzicht bestaat in het proces van de uitwisseling van genoemde stoffen tussen serum en leverweefsel tijdens de perfusie.

Fig. VI, 1.



De s.a. van  $^{59}\text{Fe}$ ,  $^{32}\text{P}$  en  $^3\text{H}$  in fracties verkregen door ultracentrifugatie van rattelever ferritine geïsoleerd na perfusie met serum waarvan het transferrine tot 80% verzadiging was opgeladen met  $[^{59}\text{Fe}] \text{Fe(III)citraat}$  en waaraan  $[^{32}\text{P}]$  orthofosfaat en  $[^3\text{H}]$  leucine was toegevoegd.

----- dpm  $^{32}\text{P}/\mu\text{mol P}$   
 ————— dpm  $^3\text{H}/\mu\text{mol N}$   
 ..... dpm  $^{59}\text{Fe}/\mu\text{mol Fe}$

De s.a. van het serum ijzer verandert niet tijdens de perfusie, terwijl ook het transferrinegehalte van het serum onveranderd blijft. Dit kan verklaard worden door er vanuit te gaan dat het ijzer tijdens de perfusie zich van het serum naar de lever begeeft en dat het ijzer dat zich in de lever bevindt niet in het serum kan geraken. Voor het serum ijzer is dus sprake van éénrichtingsverkeer.

Geheel anders dan ijzer gedraagt zich het anorganisch fosfaat. De s.a. van deze stof daalt tijdens de perfusie in het serum en stijgt diëntengevolge in de lever. Aan het einde van de perfusie is de s.a. van het anorganisch fosfaat in het serum nog een factor 2 groter dan in het leverweefsel. Er bestaat dus hier een duidelijke uitwisseling tussen het anorganisch fosfaat in serum en anorganisch fosfaat in de lever.

Wat betreft het gedrag van toegevoegd [ $^3\text{H}$ ] leucine kan men eenzelfde mechanisme aannemen als voor het anorganisch fosfaat (89), de s.a. van het [ $^3\text{H}$ ] leucine in de lever is echter na ongeveer 2 uur reeds gelijk aan de s.a. van het plasma [ $^3\text{H}$ ] leucine.

Indien de s.a. van het serum ijzer vergeleken wordt met de s.a. van de ferritine fracties die een maximale s.a. vertonen (zie fig. VI, 1) dan valt het op dat de s.a. van het serum ijzer een factor 10 hoger is dan de s.a. van deze fracties. Wanneer wij aannemen dat genoemde ferritine fracties ontstaan door de *de-novo* synthese van het eiwitgedeelte en een daaraan gekoppelde ijzer inbouw, dan dient de s.a. van het ijzer in deze fracties gelijk te zijn aan de s.a. van het ijzer in de precursor-pool. Hieruit volgt dat het serum ijzer niet de directe precursor van het ferritine kan zijn, zoals algemeen wordt aangenomen. Er moet een ijzer "pool" bestaan tussen het serum ijzer en het ferritine ijzer, waarin een 10-voudige verdunning van het serum ijzer kan plaatsvinden.

De opname van het serum ijzer in deze pool geschiedt in de eerste 15 minuten van de perfusie. Reeds eerder (hoofdstuk V, § 4) hebben wij dit fase I genoemd. Na deze 15 minuten verdwijnt in fase II nog maar weinig ijzer uit het serum. Wij stelden reeds dat de hoeveelheid ijzer die in fase II uit het serum verdwijnt zou corresponderen met de ijzer inbouw in het leverferritine. Indien wij aannemen dat de uitwisseling tussen ijzer uit de levercel en ferritine ijzer zeer langzaam is zal de s.a. van de precursor pool gedurende de perfusie nagenoeg constant blijven, indien ook de overgang van ijzer uit de precursor pool naar het ferritine een éénrichtingsverkeer is gedurende de tijd die de perfusie duurt. Deze laatste aanname wordt gesteund door de experimenten die in hoofdstuk V, § 1 en § 2 staan beschreven. Uit deze experimenten bleek dat het ferritine-ijzer zelfs bij een geïnduceerd ijzergebrek het ferritine niet of langzaam verlaat, gemeten over een periode van 8 dagen.

In hoofdstuk V, § 4 berekenden wij dat per lever ongeveer 4  $\mu\text{mol}$  ferritine ijzer aanwezig is. Het ijzergehalte van de rattelever bedraagt onge-

veer 18  $\mu\text{mol}$ , zoals door ons werd bepaald. Ongeveer 14  $\mu\text{mol}$  van dit ijzer moet dus in een andere vorm dan ferritine ijzer voorkomen. Per lever wordt in fase I 1,5  $\mu\text{mol}$  gemerkt ijzer opgenomen. Om deze hoeveelheid 10 keer te verdunnen is 13,5  $\mu\text{mol}$  ijzer nodig. Deze hoeveelheid komt overeen met de hoeveelheid niet aan ferritine gebonden ijzer. Wij zijn ons ervan bewust dat deze zienswijze waarmee onze resultaten op ongedwongen wijze kunnen worden verklaard afwijkt van de gangbare (9, 10).

De inbouw van fosfaat verschilt in vele opzichten sterk van die van ijzer. Zoals reeds ter sprake kwam daalt de s.a. van het anorganisch fosfaat in het serum tijdens de perfusie. Ook werd aangetoond dat de s.a. van het anorganisch fosfaat in de lever na 4 uur perfunderen nog niet gelijk is aan de s.a. van het anorganisch fosfaat in het serum. Tot onze verrassing bleek de s.a. van het anorganisch fosfaat in het leverweefsel gelijk te zijn aan de s.a. van het fosfaat in alle ferritine fracties. Deze resultaten kunnen alleen verklaard worden door aan te nemen dat ferritine fosfaat snel uitwisselt met de anorganische fosfaatpool van de lever. Een fundamenteel andere gang van zaken dus als bij het ijzer. Zoals in de inleiding en de probleemstelling werd opgemerkt is ons geen onderzoek bekend betreffende de fosfaat incorporatie in het ferritine. Onze gegevens zijn slecht te rijmen met het algemeen gangbare beeld van de ijzerfosfaat micel in het ferritine. Dit beeld is volgens onze opvatting veel te statisch.

Zoals algemeen wordt aangenomen, en hierbij sluiten onze gegevens zich wel aan, wordt het ijzer ingebouwd in het eiwit deel van het ferritine totdat alle beschikbare plaatsen zijn bezet. Dit laatste is het geval bij een molaire Fe/N verhouding van 0,9. De molaire Fe/P verhouding bedraagt voor de lichtere fracties ongeveer 9 en kan oplopen tot ongeveer 25 voor de zwaardere fracties. Zoals in fig. V, 13 te zien is wordt bij de *de-novo* synthese op iedere 9 moleculen ijzer 1 molecuul fosfaat geïncorporeerd. De molaire Fe/P verhouding bedraagt voor deze fracties dan ook 9.

De maximale inbouw van aminozuren in het ferritine gebeurt in dezelfde ferritine fracties waar ook het ijzer maximaal wordt ingebouwd. Wij verklaren dit door aan te nemen dat deze fracties door *de-novo* synthese ontstaan zijn. Kwantitatieve gegevens omtrent de *de-novo* synthese zijn echter niet uit onze experimenten te verkrijgen. Dit is een gevolg van het feit dat de s.a. van de precursorpool in de lever een sterk veranderende waarde heeft tijdens de synthese. De s.a. stijgt eerst om dan via een maximum weer sterk te dalen, een verloop dat wij niet konden vervolgen. Op grond

hiervan zijn wij ook niet in staat een oordeel uit te spreken over de opvatting van Drysdale dat de apoferritine synthese aan de vorming van ferritine vooraf gaat. Uit fig. V, 1 blijkt dat het door ons geïsoleerde apoferritine een veel lager s.a. heeft met betrekking tot  $^3\text{H}$  dan de eerste ferritine fracties. Dit suggereert op het eerste gezicht dat de apoferritine synthese niet vooraf gaat aan de ijzer inbouw. Het apoferritine dat wij in tegenstelling met Drysdale gescheiden van ferritine konden isoleren door toepassing van isokinetische gradient centrifugatie zou dan als een bijproduct van de isolatie van de ferritine-fracties als geheel moeten worden opgevat. Als bijproduct van de isolatie is de lage s.a. wel verklaarbaar. Echter het is ook mogelijk dat door een sterke daling van de s.a. van het [ $^3\text{H}$ ] leucine in de precursorpool de s.a. van dit apoferritine zoveel lager is dan de s.a. van het gesynthetiseerde ferritine dat reeds ijzer bevat en dat gevormd werd op een vroeger tijdstip toen de s.a. van het precursor [ $^3\text{H}$ ] leucine een hoge waarde had.

Door ons werd gevonden (hoofdstuk V, § 4) dat in 5 levers  $4 \times 10^6$  dpm  $^{59}\text{Fe}$  in 3 uur tijd werd ingebouwd. Nemen wij aan dat het gemerkte ijzer is ingebouwd met een s.a. van  $4 \times 10^5$  dpm/ $\mu\text{mol}$  dan komt dit overeen met een inbouw van 2  $\mu\text{mol}$  Fe per lever. De door ons berekende inbouw van 2  $\mu\text{mol}$  Fe per lever in een 3 uur durende perfusie kwam tot stand door aan te nemen dat het serum ijzer met een factor 10 verdund wordt alvorens in het ferritine te worden ingebouwd.

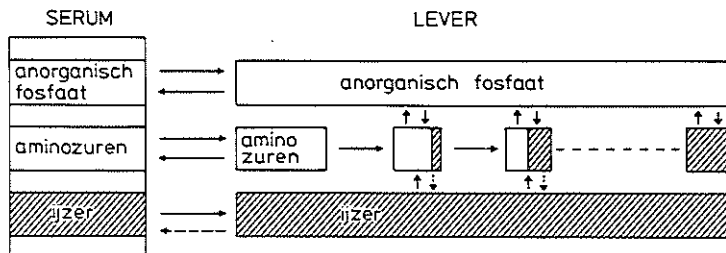
Greenberg en Fineberg (21, 30) berekenden zoals in hoofdstuk I, § 7 werd besproken, dat onder normale omstandigheden 4  $\mu\text{g}$  ferritine N per 8 uur per gram rattelever gesynthetiseerd wordt. Dit komt overeen met 1,5  $\mu\text{mol}$  ferritine N per 3 uur per rattelever (gewicht rattelever ongeveer 10 gram). Indien ratten ijzer kregen toegediend werd deze synthese met een factor 4 verhoogd tot 6  $\mu\text{mol}$  ferritine N per 3 uur per rattelever. Nemen wij aan dat ook een hoeveelheid ijzer wordt ingebouwd gedurende deze tijd en dat de gemiddelde Fe/N verhouding ( $\mu\text{molen}$ ) 0,38 bedraagt, dan zal zonder stimulatie door ijzer 0,6  $\mu\text{mol}$  Fe per 3 uur per rattelever worden ingebouwd. In het geval van stimulatie door toegediend ijzer bedraagt deze inbouw ongeveer 2,2  $\mu\text{mol}$  Fe.

Bij de perfusie experimenten die door ons werden verricht was het transferrine in het serum tot 80% verzadiging met ijzer opgeladen, zodat ook hier sprake zou zijn van een gestimuleerde ferritine synthese. Vermoedelijk zal de stimulatie in het geval van perfusie van de lever met serum

wel niet die waarde bereiken die mogelijk is indien de lever in het intacte proefdier functioneert. De berekeningen gebaseerd op onze gegevens corresponderen goed met de berekeningen die door Greenberg en Fineberg (21, 30) werden uitgevoerd.

De in deze paragraaf geïnterpreteerde resultaten brachten ons ertoe het volgende schema voor de synthese van ferritine op te stellen fig. VI, 2.

Fig. VI, 2.



Schematische voorstelling van de synthese van ferritine tijdens een leverperfusie. De precursors ijzer, aminozuren en fosfaat komen via het serum in de lever. Het ijzer onderscheidt zich van fosfaat en aminozuren doordat geen aantoonbare uitwisseling tussen lever en serum ijzer plaats vindt. Het anorganisch fosfaat van de lever is in evenwicht met het fosfaat in het ferritine, terwijl dit voor ijzer niet het geval is. Terwijl ijzer en fosfaat in alle ferritine fracties geïncorporeerd kunnen worden, worden aminozuren alleen in het apoferritine geïncorporeerd.

In dit schema hebben wij de dynamische rol die het fosfaat vervult bij de ferritinesynthese tot uitdrukking trachten te brengen. Tevens hebben wij in deze figuur aangegeven dat tijdens de door ons gekozen proefomstandigheden wel ijzer vanuit het serum naar de lever getransporteerd wordt, maar dat het omgekeerde proces niet aantoonbaar is. Dit is in de figuur aangegeven door een gestippelde pijl. Het feit dat de s.a. van het ferritine ijzer voor fracties met verschillende Fe/N verhouding niet constant is, geeft aan dat tijdens het experiment geen levendige uitwisseling bestaat tussen het lever ijzer en het ferritine ijzer, zoals voor fosfaat wel blijkt te bestaan. Dat het ferritine ijzer niet gemakkelijk mobiliseerbaar is werd ook duidelijk door de experimenten met anaemische proefdieren. In tegenstelling met de verwachting gaf zelfs een zwaar ijzerverlies geen aanleiding tot het vrijkomen van een aanmerkelijke hoeveelheid ferritine ijzer. Dit is in overeenstemming

met de resultaten van onze perfusie experimenten. Uiteraard bestaan er processen waarmee ijzer uit het ferritine zal worden vrijgemaakt, anders zou immers een steeds toenemende hoeveelheid ferritine in de weefsels ontstaan en dit is normaal niet het geval. Of deze mobilisatie veroorzaakt wordt door een destructie van het ferritine via intracellulaire proteolytische enzymen, of door het vernieuwen van ijzer aanwezig in het ferritine door middel van xanthine oxidase is een open vraag.



## SAMENVATTING

Over de regulatie van het ijzermetabolisme in het lichaam is nog weinig met zekerheid bekend. Algemeen wordt verondersteld dat ferritine bij deze regulatie is betrokken.

In dit proefschrift wordt een onderzoek beschreven dat tot doel heeft de synthese van ferritine in de lever door middel van incorporatie van ijzer, aminozuren en fosfaat te bestuderen. Daarbij is het feit dat ferritine geen homogeen eiwit is, maar m.b.v. ultracentrifugatie te scheiden is in fracties met een opklimmende Fe/N verhouding, in de proefopzet betrokken.

Hoofdstuk I geeft een uitvoerig overzicht van de literatuur betreffende ferritine.

De isolatie-methoden die door diverse onderzoekers worden gebruikt om het ferritine zuiver in handen te krijgen worden besproken. Geen der auteurs blijkt zich uit te laten over de verkregen opbrengst.

Er wordt aandacht geschonken aan het voorkomen van ferritine in diverse diersoorten, de verspreiding over organen en het aanwezig zijn van ferritine in bepaalde cel fracties.

De structuur, de fysische eigenschappen van ferritine en de betekenis van ferritine in het ijzermetabolisme passeren vervolgens de revue. Het mechanisme van de synthese van ferritine blijkt slechts zeer ten dele opgehelderd te zijn, terwijl omtrent de afbraak van ferritine met hypothesen moet worden volstaan.

Hoewel sinds de ontdekking van ferritine bekend is dat fosfaat een belangrijk bestanddeel vormt van deze stof, ontbreekt in de literatuur iedere aanwijzing omtrent de rol die het fosfaat bij de synthese van ferritine vervult.

Hoofdstuk II is gewijd aan de materialen en methoden die bij dit on-

derzoek werden gebruikt. In dit hoofdstuk wordt een methode uitgewerkt om de isotopen  $^{59}\text{Fe}$ ,  $^{32}\text{P}$  en  $^3\text{H}$  naast elkaar te kunnen meten.

De door ons ontwikkelde isolatie-methode voor ferritine wordt beschreven in hoofdstuk III. Door het toevoegen van radioactief gemerkt ferritine aan het begin van de isolatie, kon de opbrengst van de isolatie-procedure berekend worden. Deze opbrengst bleek ongeveer 50% te bedragen. Ook werd nagegaan in hoeverre deze opbrengst afhankelijk is van de Fe/N verhouding van het ferritine. De opbrengst van de lichte en de zware fracties bleek weinig te verschillen.

In hoofdstuk IV wordt een scheiding van ferritine in fracties met een opklimmende Fe/N verhouding uitgewerkt. Voor de fractionering van ferritine is o.a. door Drysdale (31) een lineaire gradient centrifugatie toegepast. Het toepassen van deze techniek brengt echter geen scheiding van het apoferritine en de lichtere ijzerhoudende ferritine fracties teweeg. Op grond van berekeningen werd verwacht dat het gebruik van een isokinetische gradient een betere fractionering van ferritine mogelijk zou maken. Inderdaad blijkt dat door toepassing van deze door ons uitgewerkte techniek apoferritine en ferritine geheel gescheiden kunnen worden.

Hoofdstuk V behandelt de incorporatie van radioactief ijzer, aminozuren en fosfaat in ferritine. Allereerst werd getracht deze incorporatie te bewerkstelligen in het intacte proefdier. De incorporatie van radioactief ijzer in het leverferritine van het proefdier (konijn) leverde geen moeilijkheden op. Incorporatie van radioactieve aminozuren en fosfaat kon echter bij het intacte proefdier niet worden aangetoond. Wij slaagden er in ons doel te bereiken door rattelever perfusies uit te voeren met serum waaraan de isotopen waren toegevoegd.

Door deze perfusie-experimenten werd duidelijk dat vooral de lichtere ferritine fracties veel radioactief ijzer incorporeren, terwijl in deze fracties ook de radioactieve aminozuren worden geïncorporeerd. Het fosfaat dat zich in het ferritine bevindt bleek zich geheel anders te gedragen dan vermoed kon worden, uitgaande van het in de literatuur voorkomende statische beeld van de ijzer fosfaat micel van ferritine.

Het fosfaat in het ferritine is in een zodanig dynamisch evenwicht met het anorganisch fosfaat in de lever dat het verloop van de specifieke activiteit van deze fractie die van het anorganisch fosfaat in lever en bloed op de voet volgt.

In hoofdstuk V worden ook experimenten beschreven waarin de afgifte

van ijzer uit ferritine werd nagegaan. Hiertoe werden proefdieren door bloedafname anaemisch gemaakt en werd gezocht naar een vermindering van de hoeveelheid ferritine ijzer onder deze omstandigheden. Een dergelijke vermindering kon echter niet worden aangetoond. Hieruit wordt geconcludeerd, dat, zo er van een vermindering van het ferritine ijzer sprake is, zoals door Mazur en Schor (8) wordt gesuggereerd, deze vermindering gering moet zijn. Ook de resultaten die m.b.v. de lever perfusies werden verkregen wijzen erop dat geen meetbare hoeveelheid ijzer uit het ferritine van de lever vrijkomt. Tegen de verwachting in blijkt dus ferritine ijzer niet gemakkelijk te kunnen worden gemobiliseerd.

## SUMMARY

Little is known about the regulation of iron metabolism in the body. It is generally assumed that ferritin is involved. In this thesis an investigation is described that is intended to study the incorporation of iron, amino acids and phosphate into liver ferritin. The fact that ferritin is an inhomogeneous protein and can be separated in fractions with an increasing Fe/N ratio by using ultracentrifugation, is taken into account in the design of the experiments.

Chapter one presents a survey of the literature on ferritin. Isolation procedures used by several authors to purify ferritin are discussed. None of these authors give any information regarding the recovery of the ferritin in the methods they used.

Attention is given to the occurrence of ferritin in various animal species and organs. The presence of ferritin in particular cell fractions is also discussed. The structure and physical properties of ferritin and its role in iron metabolism are subsequently considered.

The mechanism of ferritin synthesis is not completely understood and there are only hypotheses about the breakdown of ferritin.

Since the discovery of ferritin it is known that phosphate occurs in the molecule, but the literature is devoid of any indication about its role in the synthesis of ferritin.

Chapter two deals with materials and methods used in this investigation. In this chapter the development of a method for measuring  $^{59}\text{Fe}$ ,  $^{32}\text{P}$  and  $^3\text{H}$  radioactivities separately, is described.

The isolation method for ferritin, developed by us is described in chapter three. By adding radioactive ferritin at the start of the isolation we could calculate a 50% recovery of the isolation procedure. Attention was

given to the relationship between the recovery of ferritin and the Fe/N ratio. The recoveries of the light and heavy fractions were almost equal.

In chapter four the separation of ferritin in fractions with an increasing Fe/N ratio is developed. The fractionation of ferritin by means of centrifugation in a linear sucrose gradient was attempted by the method of Drysdale (31). However, this method does not separate apoferritin and the iron containing ferritin fractions. We calculated that the use of an isokinetic gradient might improve the separation. By application of this method we succeeded to separate apoferritin and ferritin completely.

The incorporation of radioactive iron, amino acids and phosphate into ferritin is described in chapter five. First we tried to incorporate these isotopes in liver ferritin by injection into the intact animal (rabbit). The incorporation of radioactive iron into liver ferritin did not present any difficulties. Incorporation of radioactive amino acids and phosphate however, could not be demonstrated using the intact animal. We succeeded in incorporating iron as well as amino acids and phosphate by carrying out rat liver perfusions with rat serum to which the isotopes were added. These perfusion experiments showed that most of the radioactive iron is incorporated into ferritin fractions with a relatively low Fe/N ratio. The radioactive amino acids were also incorporated in these ferritin fractions. The phosphate occurring in the ferritin behaved quite differently from that anticipated from the static model of the iron-phosphate micel. The phosphate in ferritin is in dynamic equilibrium with the inorganic phosphate from the liver. The s.a. of the phosphate in ferritin closely follows the s.a. of the inorganic phosphate in the liver and blood.

In chapter five the effect of anaemia on the release of iron from ferritin of the liver was investigated. Anaemia was achieved by withdrawing large quantities of blood from the animal. No changes in ferritin iron content of liver, following anaemia were detected. We conclude that if a decrease of ferritin iron does occur it must be small. The results obtained with the liver perfusions indicate that under these circumstances no measurable quantities of iron are released from the liver ferritin. It thus appears that ferritin iron cannot easily be mobilized.

## LITERATUURLIJST

1. L. SCHMIEDENBERG. Arch. für Exp. Path. Pharm. 33, 101, (1894).
2. M. SCAFFIDI. Zeitschr. für Physiol. Chemie 58, 4, (1909).
3. M. V. LAUFBERGER. Bull. Soc. Chim. Biol. 19, 1573, (1937).
4. S. GRANICK. J. Biol. Chem. 146, 451, (1942).
5. A. ROTHEN. J. Biol. Chem. 152, 679, (1944).
6. S. GRANICK. J. Biol. Chem. 147, 91, (1943).
7. L. MICHAELIS. J. Biol. Chem. 148, 463, (1943).
8. S. GRANICK. J. Biol. Chem. 149, 157, (1943).
9. P. F. HAHN and S. GRANICK. J. Biol. Chem. 150, 407, (1943).
10. S. GRANICK and P. F. HAHN. J. Biol. Chem. 155, 661, (1944).
11. R. McCANE WIDDOWSON. The Lancet. 2, 680, (1937).
12. D. M. GREENBERG, D. H. COPP and E. M. CUTHBERTSON. J. Biol. Chem. 147, 743, (1943).
13. S. GRANICK. J. Biol. Chem. 164, 737, (1946).
14. P. T. HAHN. Exp. Med. 78, 169, (1943).
15. S. GRANICK. Chem. Reviews. 38, 379, (1946).
16. TH. ASHER. Zeitschr. für Physiol. Chemie. 220, 97, (1933).
17. S. COOK. J. Biol. Chem. 82, 595, (1929).
18. A. MAZUR and E. SCHORR. J. Biol. Chem. 176, 771, (1948).
19. S. GRANICK. New York Acad. of Med. 25, 403, (1949).
20. A. MAZUR. J. Biol. Chem. 187, 473, (1950).
21. R. A. FINEBERG and D. M. GREENBERG. J. Biol. Chem. 214, 97, (1955).
22. A. MAZUR, S. BAEZ and E. SCHORR. J. Biol. Chem. 213, 147, (1955).
23. E. L. KUFF and A. J. DALTON. J. Ultrastruct. Research. 1, 62 (1957).
24. M. W. LOEWUS and R. A. FINEBERG. Bioch. Bioph. Acta. 26, 441, (1957).
25. H. J. BIELIG and E. BAYER. Naturwissenschaften. 42a, 125, (1955).
26. U. A. ARSTILA. Amer. J. of Pathol. 58, 419, (1970).
27. S. GREEN. J. Biol. Chem. 227, 653, (1957).
28. P. M. HARRISON. J. Mol. Biol. 169, 80, (1959).
29. A. MAZUR, S. GREEN and A. CARLETON. J. Biol. Chem. 235, 595, (1960).
30. R. A. FINEBERG and D. M. GREENBERG. J. Biol. Chem. 214, 107, (1955).
31. J. W. DRYSDALE and H. N. MUNRO. J. Biol. Chem. 241, 3630, (1966).
32. J. W. DRYSDALE and H. N. MUNRO. Federation Proc. 29, 1469, (1970).
33. A. R. MUIR. J. Exp. Physiol. 45, 192, (1960).
34. E. F. VAN BRUGGEN. J. Mol. Biol. 2, 81, (1960).
35. P. M. HARRISON. J. Mol. Biol. 21, 239, (1962).
36. P. M. HARRISON. J. Mol. Biol. 6, 404, (1963).
37. T. HOFMANN and P. M. HARRISON. J. Biol. Chem. 6, 256, (1963).
38. P. M. HARRISON. J. Biol. Chem. 14, 626, (1965).

39. A. E. DAVIS. *The Lancet*. July 7, 6, (1962).
40. F. FRIEDBERG. *Canad. J. of Bioch. and Physiol.* 40, 983, (1962).
41. J. J. THERON. *Clin. Chim. Acta.* 8, 167, (1963).
42. R. KOPP. *Nature*. 202, 1212, (1964).
43. A. SURAN. *Arch. of Bioch. Bioph.* 111, 399, (1965).
44. J. W. DRYSDALE. *Bioch. Journal.* 95, 851, (1965).
45. N. MURAOKA. *J. of Bioch.* 60, 489, (1966).
46. I. LITOWSKI. *Biochemistry.* 6, 1341, (1967).
47. T. G. GABUZDA. *Nature* 220, 1234, (1968).
48. W. N. PEARSON and M. B. REICH. *J. Nutrition.* 99, 137, (1969).
49. A. O. H. MILLER. *Bioch. Bioph. Acta.* 155, 262, (1968).
50. L. PAPE. *Biochemistry.* 7, 606, (1968).
51. L. PAPE. *Biochemistry.* 7, 613, (1968).
52. T. G. GABUZDA. *Bioch. Bioph. Acta.* 194, 50, (1969).
53. C. P. ALFREY. *J. Lab. and Clin. Med.* 70, 419, (1967).
54. J. W. DRYSDALE. *Nature*. 216, 1045, (1968).
55. G. W. RICHTER. *Biochemistry.* 6, 2871, (1967).
56. T. H. BOTHWELL. *J. Lab. and Clin. Med.* 51, 24, (1958).
57. M. BEHRENS. *Hoppe Seyler Z. Phys. Chemie.* 290, 156, (1952).
58. J. W. DRYSDALE. *Bioch. Bioph. Acta.* 194, 43, (1969).
59. R. R. CRICHTON. *Bioch. Bioph. Acta.* 194, 34, (1969).
60. S. GRANICK. *Chem. Reviews.* 38, 379, (1946).
61. P. F. HAHN. *J. Exp. Med.* 178, 164, (1943).
62. A. SHODEN. *Amer. J. Path.* 24, 1134, (1958).
63. A. SHODEN. *Acta Haemat.* 27, 33, (1962).
64. H. N. MUNRO. *Bioch. Bioph. Acta.* 200, 442, (1970).
65. J. P. G. MILLER. *Eur. J. of Bioch.* 10, 146, (1969).
66. KINNEY. *J. of Exp. Med. (USA).* 102, 151, (1955).
67. ERISE and HALLBERG. *Acta Med. Scandinavica.* 171, suppl. 376, 7, (1962).
68. W. F. WILTINK. *Dissertatie Medische Faculteit Rotterdam*, (1967).
69. T. J. PENDERS. *Bioch. Bioph. Acta.* 168, 588, (1968).
70. E. C. LYNCH. *Tex. Rep. Biol. Med.* 28, 189, (1970).
71. S. OSAKI and E. FRIEDEN. *Journ. of Biol. Chem.* 246, 3018, (1971).
72. L. S. ZETTINGER. *Amer. Journ. of Clin. Path.* 45, 533, (1966).
73. S. MOORE and W. H. STEIN. *J. Biol. Chem.* 176, 367, (1948).
74. J. BERENBLUM and E. CHAIN. *Biochem. J.* 32, 295, (1938).
75. M. POLLYCOVE. *Iron Metabolism, Ciba Symposium.* (1963).
76. B. K. VAN KREEL, H. G. VAN EIJK and B. LEIJNSE. *Clin. Chim. Acta.* 32, 103, (1971).
77. W. STAIB and R. SCHOLZ. *Stoffwechsel der isoliert perfundierten. Leber*, Springer Verlag, 38, (1968).
78. L. L. C. G. MILLER. *J. Exp. Med.* 94, 431, (1951).
79. H. SCHIMASSEK. *Biochem. Z.* 336, 460, (1963).
80. T. SVEDBERG and K. O. PEDERSEN. *Die Ultrazentrifuge*, Steinkopf Dresden. (1940).
81. K. S. McCARTY and D. STAFFORD. *Analyt. Biochem.* 24, 314, (1968).
82. *Handbook of Biochemistry.* Chemical Rubber Company. J 248, (1968).
83. C. J. O. R. MORRIS and P. MORRIS. *Separation Methods in Biochemistry*, Pitman Ltd. London, 147, (1962).
84. H. V. MALMSTADT, C. G. ENKE and J. R. TOREN. *Electronics for Scientists.* Benjamin Inc. New York, (1962).
85. W. STAIB and R. SCHOLZ. *Stoffwechsel der isoliert perfundierte Leber*, Springer Verlag 234, (1968).
86. J. W. DRYSDALE. *Bioch. Bioph. Acta.* 207, 256, (1970).
87. I. URUSHIZAKI. *Bioch. Bioph. Acta.* 243, 187, (1971).
88. FOLIN. *J. Biol. Chem.* 193, 265, (1951).
89. A. H. GORDON. *Bioch. Bioph. Acta.* 130, 486, (1966).
90. B. K. VAN KREEL, H. G. VAN EIJK and B. LEIJNSE. *Acta Haematologica.* 47, 59, (1972).

## NASCHRIFT

Gaarne wil ik de personen die aan het tot stand komen van dit proefschrift hebben medegewerkt mijn dank betuigen.

Hooggeleerde Leijnse, hooggeachte promotor. U dank ik voor de tijd die U, ondanks Uw zeer drukke werkzaamheden, mij geschonken hebt bij het schrijven van dit proefschrift en de suggesties die U tijdens het onderzoek hebt gegeven.

Hooggeleerde Hülsmann. U dank ik voor de enthousiaste wijze waarop U als co-referent het proefschrift hebt beoordeeld en van commentaar hebt voorzien.

Zeergeleerde van Eijk. U betuig ik mijn dank voor de nauwgezette wijze waarop U als co-referent het proefschrift hebt beoordeeld en voor de uitstekende samenwerking op de afdeling gedurende de tijd, die ik hier heb doorgebracht.

Veel dank ben ik verschuldigd aan Mej. A.M.C.M. Pijnenburg voor de enthousiaste en kritische wijze waarop zij het vele experimentele werk heeft verricht.

Dr. J.H. Koster ben ik zeer erkentelijk voor de hulp door hem geboden bij het verrichten van de leverperfusies.

Het gehele typewerk van het manuscript werd op deskundige wijze verricht door Mevr. M.C. Koornstra en Mevr. E.M. Schuur, waarvoor mijn hartelijke dank.

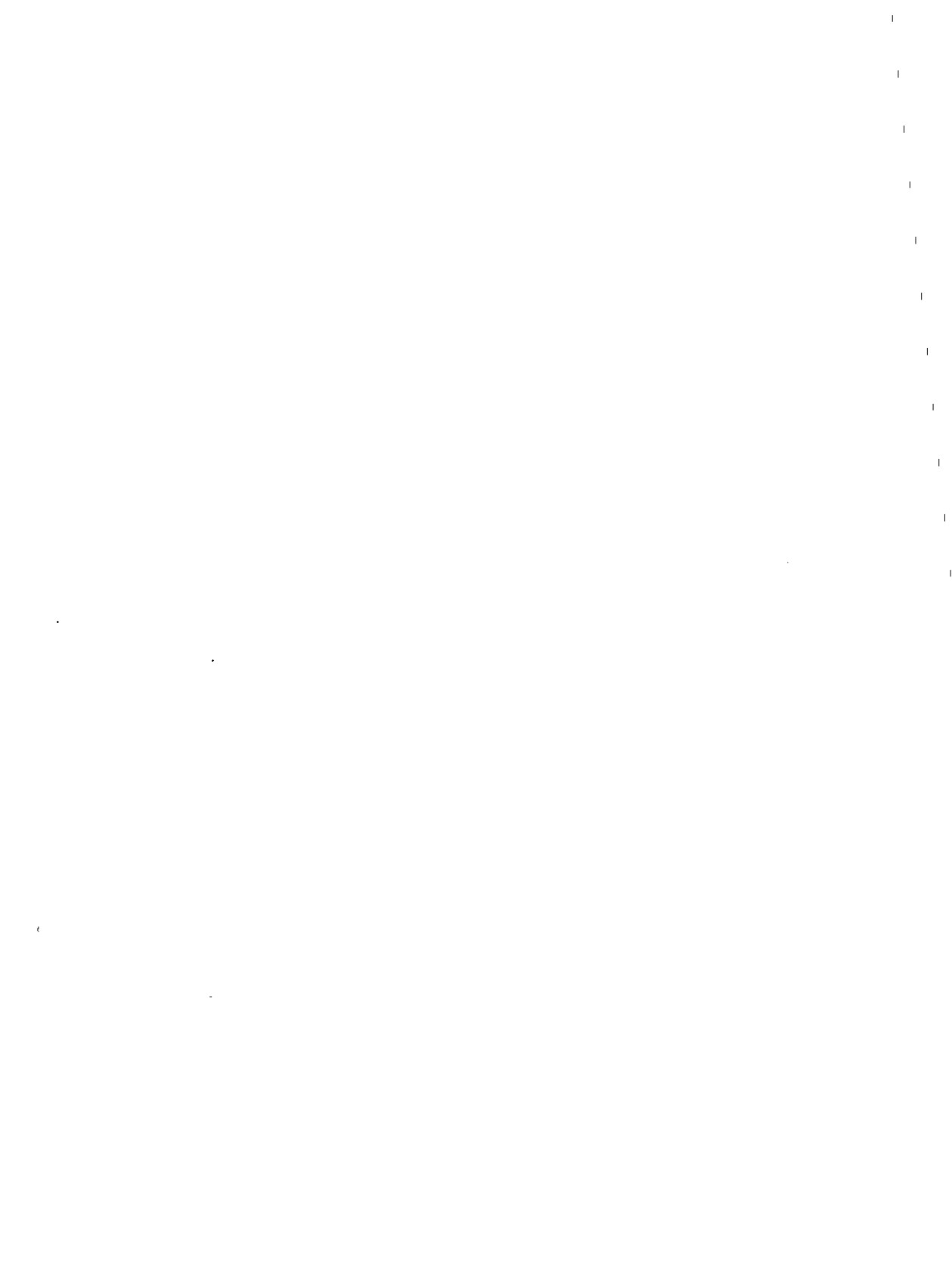
De figuren weergegeven in dit proefschrift werden verzorgd door de audiovisuele dienst van de Medische Faculteit Rotterdam, waarvoor ik de medewerkers van deze dienst bijzonder erkentelijk ben.

De medewerkers van de centrale research werkplaats ben ik dank verschuldigd voor de wijze waarop zij de apparatuur hebben gebouwd die bij het



in dit proefschrift beschreven onderzoek werd gebruikt, terwijl ik tevens de heer Kruis en de heer Backhuys wil danken voor hun bijdrage aan dit onderzoek.

Mijn ouders wil ik dankzeggen voor de gelegenheid die ze mij hebben geboden mijn studie te beginnen en te voltooien.



## CURRICULUM VITAE

Op verzoek van de Medische Faculteit te Rotterdam

In 1959 werd te Amersfoort door mij het examen H.B.S.-B afgelegd. In dit zelfde jaar volgde inschrijving aan de Universiteit te Groningen met als studierichting scheikunde.

Het candidaatsexamen in de scheikunde werd afgelegd in 1962.

Het doctoraalexamen werd in 1965 afgelegd, met als hoofdrichting Biochemie (Prof. Dr. M. Gruber) en als bijvak structuur chemie.

Hierna werd door mij de dienstplicht vervuld bij de Koninklijke Marine. Gedurende deze tijd was ik gedetacheerd bij het Medisch Biologisch Laboratorium van de Rijksverdedigingsorganisatie TNO (Directeur: Prof. Dr. J.A. Cohen).

In 1967 trad ik in dienst als wetenschappelijk medewerker op de Afdeling Chemische Pathologie van de Medische Faculteit Rotterdam, waar onder leiding van Prof. Dr. B. Leijnse het in dit proefschrift beschreven onderzoek werd verricht.

