

Intrazelluläre Lokalisierung von Proteinen des Eisenstoffwechsels in Osteoklasten

Cécile Mosimann, BMA 18-21A

Bildungsgang Biomedizinische Analytik HF

Bone Biology & Orthopaedic Research, Department for BioMedical Research, Universität Bern

1. Zusammenfassung

Anpassung an ständig ändernde Belastung der Knochen erfolgt durch permanenten Umbau von Knochensubstanz, wobei Osteoklasten Aktinringe bilden. Störungen im Eisenstoffwechsel beeinträchtigen das Gleichgewicht zwischen Knochenabbau und -bildung, was die Stabilität des Skeletts mindert.

In dieser Arbeit wurden Proteine des Eisenstoffwechsels bei wechselnder Eisenverfügbarkeit in Osteoklasten lokalisiert. Hierfür wurde Osteoklasten Eisen im Medium entzogen und später teilweise wieder zugeführt. Die Proteinlokalisierung erfolgte mittels Konfokalmikroskopie. Weiter wurde untersucht, ob in vitro generierte Osteoklasten während der Resorption Aktinringe bilden. Hierfür wurden Osteoklasten auf Calciumphosphat (CaP) inkubiert. Nach der Aktinfärbung wurden die Aktinringe mittels Fluoreszenzmikroskopie beobachtet.

Die Resultate der Proteinlokalisierung zeigen keinen Unterschied in Abhängigkeit der Eisenverfügbarkeit, obwohl dies anhand der Literaturrecherche erwartet wurde. Daher sollten weitere Untersuchungen Erklärungsansätze liefern. Weiter bilden in vitro generierte Osteoklasten während der Inkubation auf CaP Aktinringe, da bei der Resorption eine Membrandomäne durch aktinreiche Strukturen abgegrenzt wird.

2. Einleitung

Das menschliche Skelett besteht aus über 200 Knochen, welche sich durch permanenten Umbau von Knochensubstanz ständig neuen Belastungen anpassen. Osteoklasten binden hierbei an die Knochenoberfläche, wodurch sich mittels Aktinring ein Kompartiment abgrenzt, wo Knochensubstanz gelöst und resorbiert wird. Dies erfolgt im Gleichgewicht mit der Knochenbildung und kann durch Störungen im Eisenstoffwechsel beeinträchtigt werden, was die Stabilität des Skeletts mindert. [1]

Im Eisenstoffwechsel sind viele Proteine involviert, wovon 3 von grosser Relevanz sind:

- Transferrin (TF) bringt Eisen vom Blut zu den Zellen.
- Transferrinrezeptoren (TFRC) werden bei Eisenbedarf auf der Zellmembranoberfläche exprimiert.
- Divalente Metalltransporter 1 (DMT1) können Eisen in Zellen ein- und ausschleusen. [2]

Ebenfalls wichtig ist der Golgi-Apparat, der bei der Proteinsynthese und dem Transport von Makromolekülen involviert ist. [3]

3. Ziele und Fragestellungen

- Lokalisierung der Proteine des Eisenstoffwechsels und des Golgi-Apparates bei guter Eisenverfügbarkeit, beziehungsweise -mangel.
- Wo sind die Proteine des Eisenstoffwechsels, TF, TFRC, DMT1 und Golgin97 für den Golgi-Apparat, in Osteoklasten intrazellulär lokalisiert?
- Demonstration von Aktinringen, welche ein Indikator für Resorption darstellen.
- Können in vitro generierte Osteoklasten aktiv das Mineral CaP auflösen?

4. Material, Methodik, Vorgehen

Osteoklasten wurden aus Knochenmarkzellen von Mäusen isoliert und in Nährmedium gehalten.

Für die Proteinlokalisierung wurde durch Zugabe von eisenbindendem Deferoxamin (DFO) ein Eisenmangel induziert. Die Zellen wurden auf Calciumphosphat verteilt und Mangel weitergeführt oder aufgehoben. Durch anschliessende Inkubation mit Antikörpern, welche an die zu lokalisierenden Proteine banden, wurden diese mittels Konfokalmikroskopie erkennbar.

Für die Aktinfärbung wurde bei einigen Zellen DFO hinzugegeben. Die Zellen wurden auf einer Schicht mit oder ohne CaP verteilt und in Medium mit oder ohne DFO und Calcitonin (CT) inkubiert. Die Auswertung erfolgte mittels TRAP-, Aktin- und Kernfärbung der Zellen, sowie Fluoreszenzmikroskopie.

5. Ergebnisse/ Resultate

DMT1 liegt intrazellulär vor (Abb. 1), während der TFRC membrangebunden und intrazellulär ist (Abb. 2). Der Golgi-Apparat ist perinukleär lokalisiert (Abb. 3). Es ist kein Unterschied in Abhängigkeit der Eisenverfügbarkeit festzustellen. Einzig TF dissoziiert unter Eisenmangel vom TFRC.

In Osteoklasten mit Aktinfärbung sind Aktinringe erkennbar (Abb. 4).

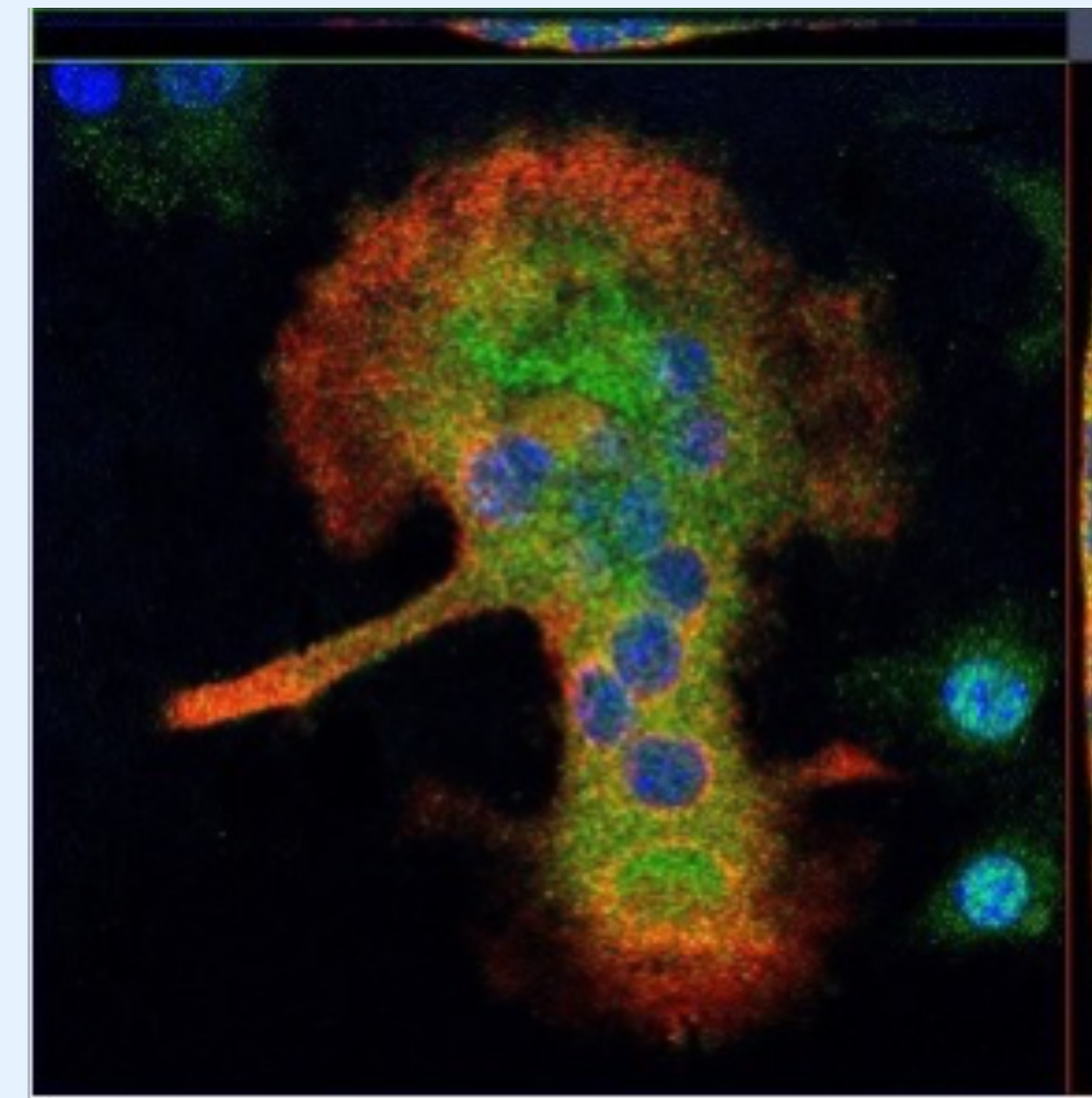


Abb. 1: Osteoklast mit TFRC- und DMT1-Färbung bei guter Eisenverfügbarkeit. Es scheint keine Kolokalisierung von TFRC (rot) und DMT1 (grün) zu geben. Die Zellkerne erscheinen bei dieser Färbung blau.

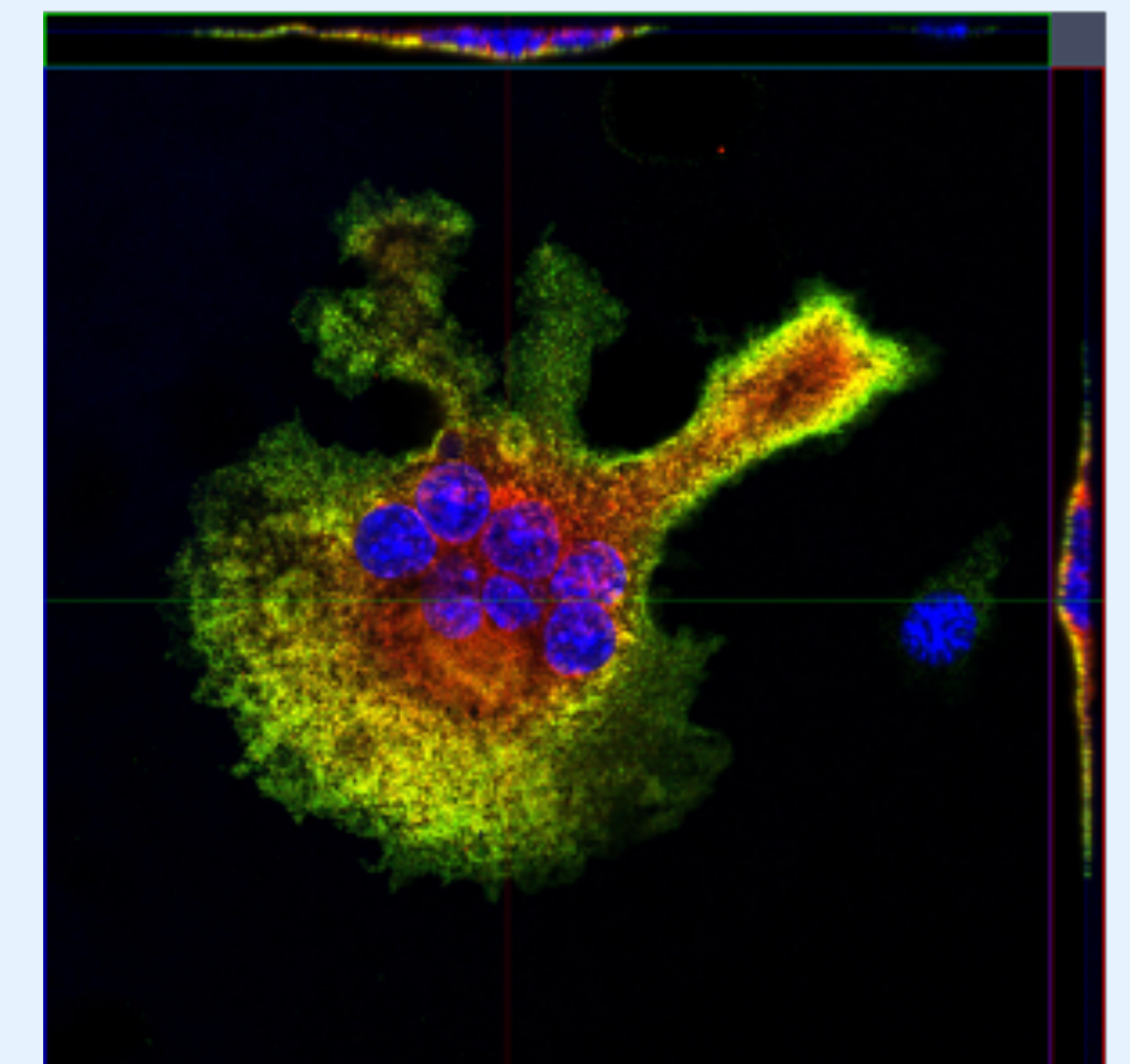


Abb. 2: Osteoklast mit TFRC- und TF-Färbung bei guter Eisenverfügbarkeit. Durch die gelbe Farbe, scheinen TFRC (rot) und TF (grün) an der Membran kolokalisiert zu sein. Die Zellkerne erscheinen bei dieser Färbung blau.

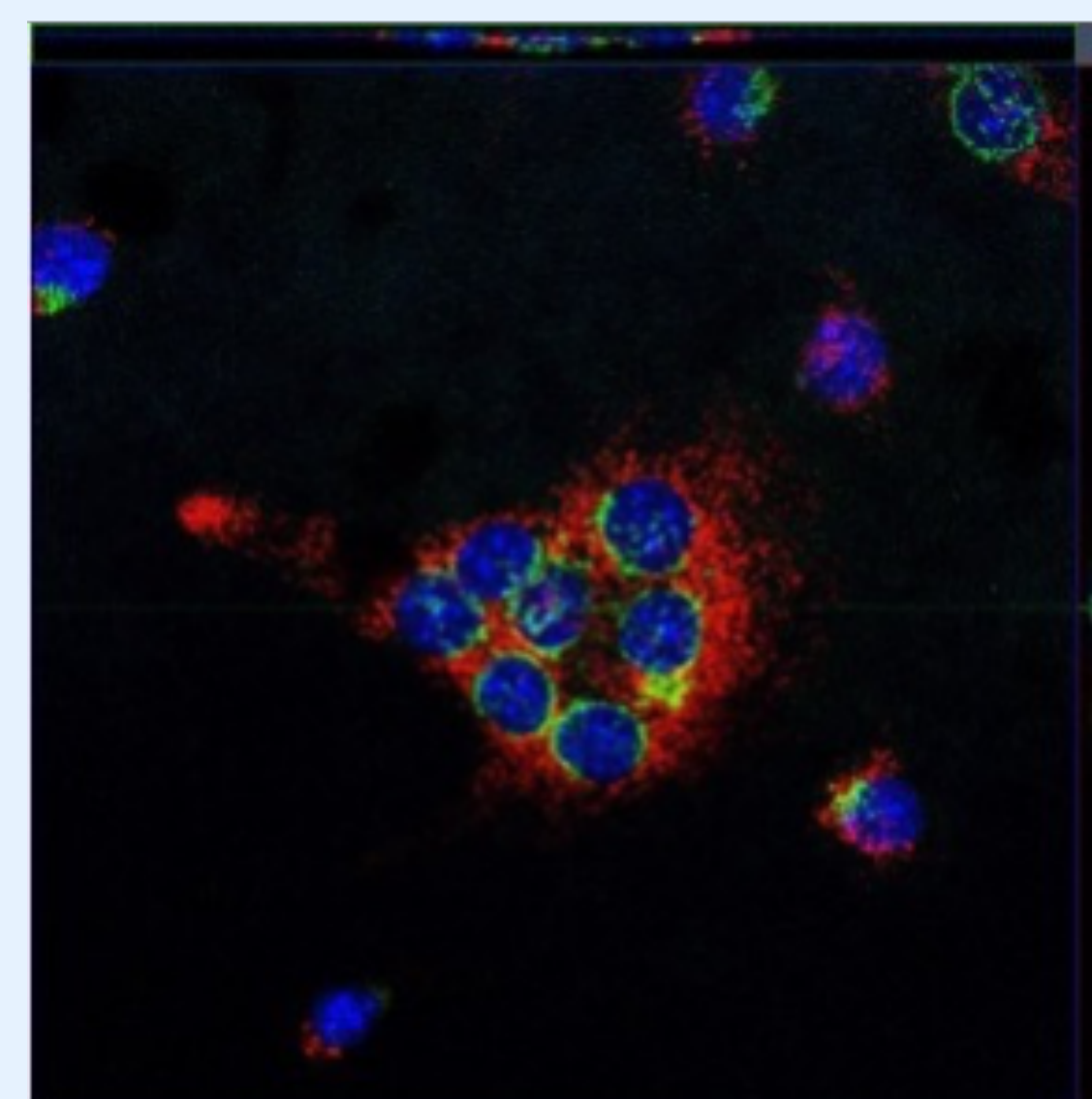


Abb. 3: Osteoklast mit DMT1 und Golgin97-Färbung bei guter Eisenverfügbarkeit. Es scheint keine Kolokalisation von DMT1 (rot) und dem Golgi-Apparat (grün) zu geben. Die Zellkerne erscheinen bei dieser Färbung blau.

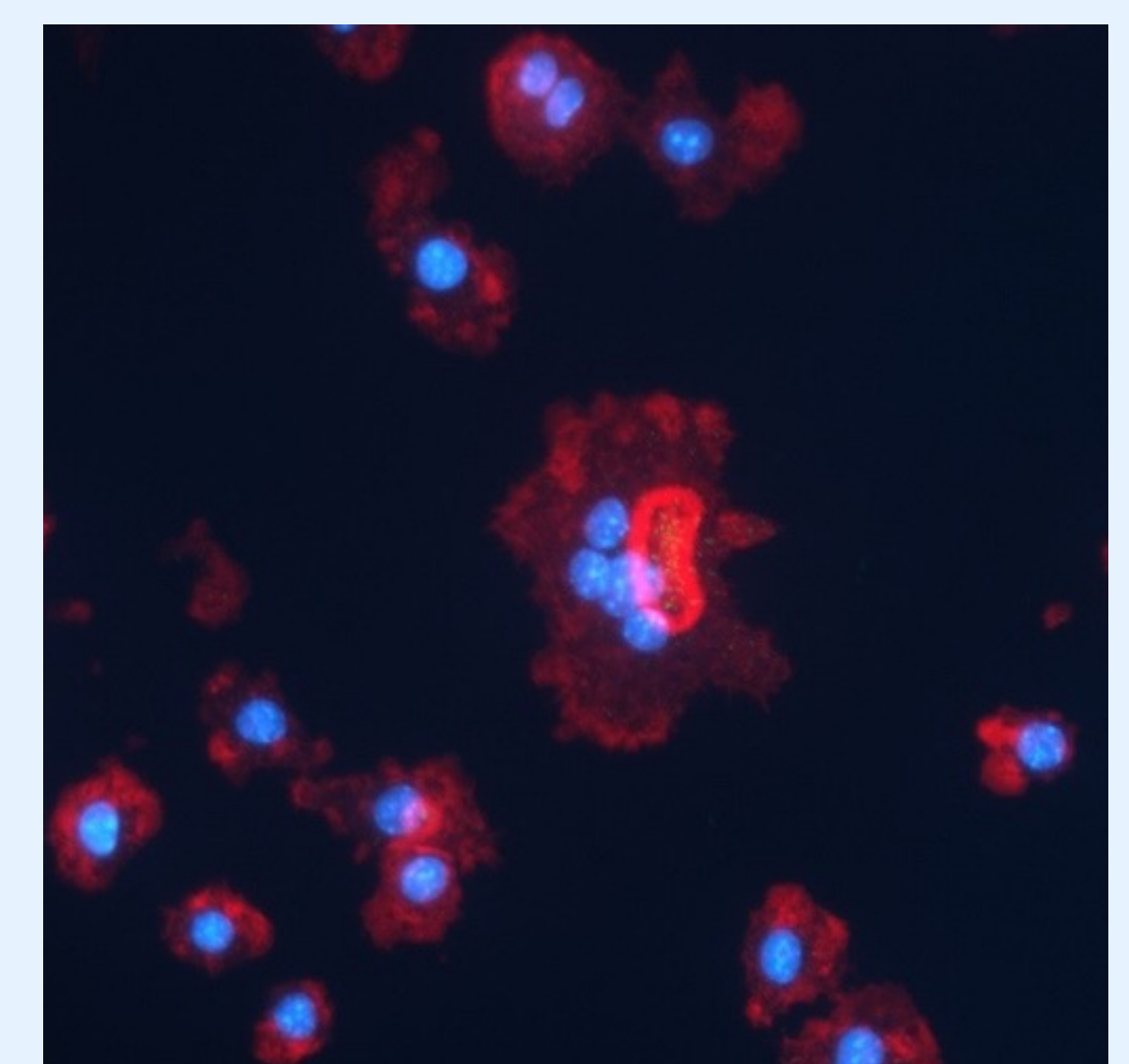


Abb. 4: Osteoklastenkultur bei guter Eisenverfügbarkeit auf CaP. Der rote Aktinring befindet sich in der Mitte des Osteoklasts. Die Zellkerne erscheinen bei dieser Färbung blau.

6. Diskussion

DMT1 ist intrazellulär vorhanden, da dieser Eisen in Zellen ein- und ausschleust. Der Golgi-Apparat ist an der Proteinsynthese und Makromolekültransport beteiligt und somit um die Kerne lokalisiert. TF lag TFRC-gebunden vor und dissoziierte bei Eisenmangel. Dies widerspricht den Erwartungen, TF auch intrazellulär vorzufinden, da mit Eisen beladenes TF bei Eisenbedarf an den membrangebundenen TFRC bindet, wodurch der TF-TFRC-Komplex in die Zelle aufgenommen wird. Weiter sollte mit Eisen unbeladenes TF (ATF) nicht wie beobachtet an den TFRC binden. Daher sollte die Proteinlokalisierung weiter untersucht werden.

Weiter wurden Aktinringe beobachtet, was indiziert, dass CaP aufgelöst und resorbiert wird. Aktinringe werden während der Resorption durch Osteoklasten gebildet, indem diese mittels aktinreichen Strukturen ein Kompartiment an der Knochen-Zell-Grenzfläche abgrenzen. Während der Resorption von CaP befinden sich Aktinringe um den Zellkern. Ohne CaP sind sie an der Peripherie. Zugabe von CT hemmt die Resorption, weshalb deutlich weniger Aktinringe sichtbar waren. Für ein umfassendes Verständnis der knochenbiologischen Prozesse sind jedoch weitere Studien erforderlich.

Referenzen

- [1] Burr, D., & Allen, M. (2014). Basic and Applied Bone Biology. Oxford: Elsevier
- [2] Yiannikourides, A. & Latunde-Dada, G. (2019). A Short Review of Iron Metabolism and Pathophysiology of Iron Disorders. Medicines, 85(6), 1-6
- [3] Spektrum.de. (1999). Golgi-Apparat. Abgerufen von <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/golgi-apparat/28912#:~:text=Funktionen%20des%20Golgi%2DApparats%3A%20Man,ihren%20unterschiedlichen%20Bestimmungsorten%20dirigiert%20werden>

Abbildungen

Abb. 1 Eigene Aufnahme TFRC- und DMT1-Färbung eines Osteoklasts bei guter Eisenverfügbarkeit.

Abb. 2 Eigene Aufnahme TFRC- und TF-Färbung eines Osteoklasts auf CaP bei guter Eisenverfügbarkeit.

Abb. 3 Eigene Aufnahme DMT1 und Golgin97-Färbung eines Osteoklasts auf CaP bei guter Eisenverfügbarkeit.

Abb. 4 Eigene Aufnahme Osteoklastenkultur bei guter Eisenverfügbarkeit auf CaP.