

1. Zusammenfassung

Osteoklasten sind multinukleäre Riesenzellen, welche die führende Rolle der energieverzehrenden Osteolyse übernehmen. Für die Energiebereitstellung der Osteolyse in Form von ATP sind die knochenresorbierenden Zellen auf eine hohe Zahl von Mitochondrien angewiesen. Da Eisen als Co-Faktor in der Elektronentransportkette in der ATP-Synthese wirkt, ist das Spurelement für die mitochondriale Biogenese unerlässlich. Der Eisenmangel ist die häufigste Störung im Eisenstoffwechsel und wird mit einer verminderten Knochenmasse assoziiert. Infolgedessen besteht Interesse am Verständnis von eisendefizitären Effekten auf die Entwicklung der Osteoklasten-Zelllinie und deren Aktivität, sowie an der Eisenverteilung der Osteoklasten. Für die Untersuchung der subzellulären Eisenverteilung der Osteoklasten wurde ein Protokoll für den Zellaufschluss und die Fraktionierung getestet und auf dessen Qualität geprüft. Der Zellaufschluss wurde mit Zellen, welche mit dem radioaktiven ^{55}Fe -Tf 2h inkubiert wurden, und einem manuellen Dounce Homogenisator in einem Mannitol und Sucrose Buffer durchgeführt. Für die Fraktionierung wurde das Homogenat anschliessend auf einen linearen 0-60 % Sucrose-Gradienten aufgetragen und ultrazentrifugiert. Abschliessend konnte mit einer Radioaktivitätsmessung der Fraktionen die Verteilung des Eisens erfasst werden. Es konnte gezeigt werden, dass das verwendete Protokoll für den Zellaufschluss geeignet ist und gute Resultate erzielen konnte.

Schlüsselwörter: Osteoklasten, Eisen, Eisenmangel, Mitochondrien

2. Einleitung

In vorangegangenen Experimenten der Forschungsgruppe Bones Biology and Orthopaedic Research, Department BioMedical Research, Universität Bern, wurde beschrieben, dass die Genexpression von Eisentransport Molekülen während der Entwicklung von Osteoklasten durch Modulation des Eisengehalts beeinflusst wird. Infolgedessen ist das Interesse am Verständnis an Eisen und dessen exogene Modulation in Bezug auf die Formation, Aktivität und Eisenverteilung in Osteoklasten vorhanden.

Osteoklasten differenzieren sich aus der Monozyten-/Makrophagen-Reihe von hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks. In dieser Differenzierung ist die koloniebildende Einheit Granulozyt/Makrophage (GM-CFU) die erste funktionelle Vorstufe des Osteoklasts, welche anschliessend zum Preosteoklast ausreift. Preosteoklasten sind mononukleäre Vorläuferzellen, welche miteinander zu multinukleären reifen Osteoklasten fusionieren. Reife Osteoklasten sind multinukleäre Riesenzellen, welche tartratresistente saure Phosphatase (TRAP) positiv sind und fähig sind Knochen zu resorbieren. Die Differenzierung von der Hämatopoetischen Stammzelle bis zum reifen Osteoklasten ist angewiesen auf zwei Wachstumsfaktoren, Koloniestimulierender Wachstumsfaktor (CSF-1) und Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL). [1] Der Knochen ist ein aktives und dynamisches Gewebe, welches kontinuierlichen Umbauprozessen ausgesetzt ist. Die Prozesse der Modellierung finden in Form von Knochenaufbau, durch Osteoblasten, und Knochenabbau, durch Osteoklasten, statt. Damit der Knochen den Anforderungen gerecht wird und seine Aufgaben erfüllen kann, müssen diese Prozesse eng reguliert und delegiert werden. In mehreren Studien wurde gezeigt, dass eine Störung des Eisenstoffwechsels die Homöostase des Knochens beeinflusst. Der Eisenmangel ist eine weitverbreitete und häufig vorliegende Störung im Eisenstoffwechsel und bringt den Knochenstoffwechsel aus dem Gleichgewicht. Der Eisenmangel wird mit einer niedrigen Knochenmasse assoziiert. Einerseits wirkt sich eine niedrige Eisenkonzentration negativ auf die knochenaufbauenden Prozesse aus, via verminderter Vitamin D Synthese und Kollagensynthese [2]. Andererseits wurde eine negative Korrelation von Ferritin mit dem Marker für die Resorption der Knochensubstanz, N-Terminal Telopeptid Kollagen I, beobachtet. Folglich ergibt sich eine Verknüpfung von Eisenmangel mit einer erhöhten Resorption. [3]

3. Ziele/Fragestellungen

Folgende Ziele wurden für die Diplomarbeit festgelegt:

Ziel 1: Die Anwendung und Überprüfung eines Protokolls für den Zellaufschluss und der Fraktionierung für die Analyse der subzellulären Eisenverteilung in Osteoklasten.

Ziel 2: Die Untersuchung der intrazellulären Eisenverteilung in murinen Osteoklasten

Fragestellung 1: Eignet sich die verwendete Methode für die Analyse der subzellulären Eisenverteilung in Osteoklasten?

Fragestellung 2: Wie ist das Eisen in den Fraktionen verteilt?

4. Material, Methoden, Vorgehen

Für die Untersuchung der intrazellulären Eisenverteilung der Osteoklasten wurde ein Zellaufschluss mit anschliessender Fraktionierung und einer Radioaktivitätsmessung von ^{55}Fe in den Fraktionen durchgeführt. Die für das Experiment verwendeten Osteoklasten wurden in eisendefizitären Bedingungen kultiviert. Vor dem Zellaufschluss am Tag 5 wurden die Osteoklasten beider Experimentalgruppen für die Messung der Eisenverteilung mit HoloTransferrin, welches radioaktives ^{55}Fe enthielt, für 2h inkubiert. Osteoklasten der zweiten Experimentalgruppe wurden anschliessend zusätzlich mit DFO für 4h inkubiert. Der Zellaufschluss wurde daraufhin mit einem manuellen Dounce Homogenisator durchgeführt. Das erhaltene Homogenat wurde für die Separation der Zellkerne zentrifugiert (1000xg, 10min, 4°C). Anschliessend wurde als Qualitätsüberprüfung eine Proteinbestimmung im erhaltenen Überstand und Pellet durchgeführt, sowie eine Radioaktivitätsmessung. 1 ml des Überstands wurde auf einen Sucrose-Gradienten geladen und für die Fraktionierung mit einer Ultrazentrifuge zentrifugiert (200'000xg, 4°C, 18 h). Abschliessend wurden diverse Marker des Eisenstoffwechsels (Transferrinrezeptor, Transferrin und Ferritin) und Organellen spezifische Marker (ATP5A1, β -Aktin, EEA1) in den Fraktionen gemessen. Des Weiteren wurde eine Radioaktivitätsmessung von ^{55}Fe in den Fraktionen durchgeführt.

5. Ergebnisse/Resultate

Folgende Resultate konnten ermittelt werden:

Proteinbestimmung:

Die Proteinmenge beider Experimentalgruppen ähnelt stark. Ein Proteinverlust in das Pellet von 42 % (2h/0h), respektive 58 % (2h/4h) konnte nachgewiesen werden.

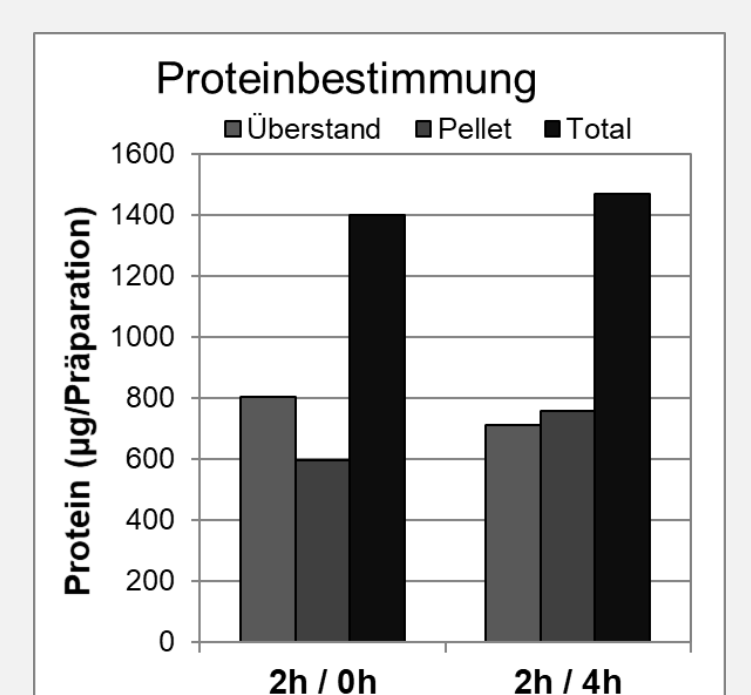


Abb.5.8 Proteinbestimmung im Überstand und Pellet

Radioaktivitätsmessung Eisen-55:

Radioaktives Eisen konnte im Pellet in einer sehr geringen Intensität detektiert werden. 82.8 % (2h/0h), respektive 87.8 % (2h/4h) des internalisierten Eisen-55 befand sich im Überstand.

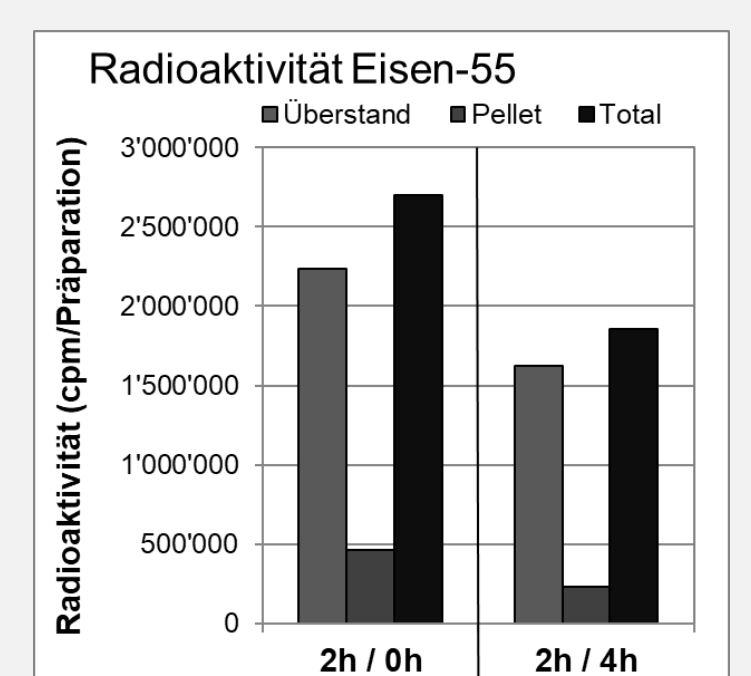


Abb.5.9 Radioaktivitätsmessung von Eisen-55 im Überstand und Pellet

Eisenverteilung:

Die Anwesenheit des labilen Eisenpools konnte in den ersten fünf Fraktionen nachgewiesen werden. Der überwiegende Anteil des Eisens fand sich in den Fraktionen 6-14.

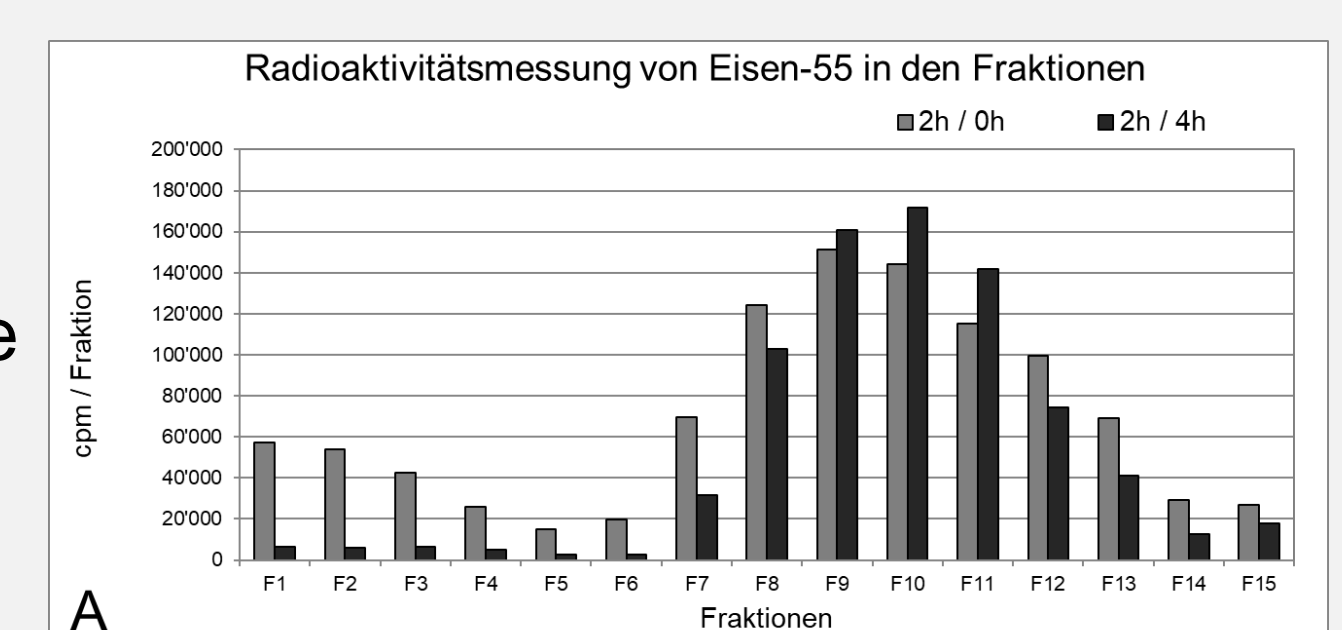


Abb.5.11 Radioaktivitätsmessung von Eisen-55 in den Fraktionen

6. Diskussion

Fragestellung 1: Es konnte gezeigt werden, dass das verwendete Protokoll für den Zellaufschluss und Fraktionierung von Osteoklasten qualitativ gute Resultate erzielt. Es hat sich gezeigt, dass der verwendete 0-60 % Sucrose-Gradient qualitativ gut war, aufgrund der Verteilung der Marker in den Fraktionen, sowie deren Fehlen, inklusive Eisen, im Pellet. Der Zellaufschluss erwies sich als effizient, da der überwiegende Teil des internalisierten Eisens im Überstand nachgewiesen wurde. Jedoch hatte das verwendete Protokoll einen hohen Proteinverlust, welcher nicht erklärt werden konnte, zur Folge. Dementsprechend hat das Protokoll Verbesserungspotential und mögliche Anpassungen, insbesondere in der Verwendung des genutzten Buffers für den Zellaufschluss, wäre angebracht.

Fragestellung 2: Es konnten zwei Populationen von Eisen nachgewiesen werden. Dabei hat sich gezeigt, dass die erste Population der labile Eisenpool ist. Die zweite Population stammt aus mehreren Zellorganellen, wobei eine eindeutige Zuordnung des Eisens aufgrund der Kolo-kalisation von den Zellkompartimenten nicht möglich ist.

Referenzen:

[1] Ross, F. (2011, Januar 1). Osteoclasts. Abgerufen 28. Mai 2020, von <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123819789100186>

[2] Malczewska-Lenczowska, J., Sitkowski, D., Surala, O., Orysiak, J., Szczepanska, B., & Witek, K. (2018, Februar 1). The Association between Iron and Vitamin D Status in Female Elite Athletes. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5852743/>

[3] Balogh, E., Paragh, G., & Jeney, V. (2018, Dezember 1). Influence of Iron on Bone Homeostasis. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6316285>

Abbildungen:

Abb.5.8 Weber,R. (2020). Proteinbestimmung nach Zellaufschluss

Abb.5.9 Weber,R. (2020). Radioaktivitätsmessung von Eisen-55 nach Zellaufschluss

Abb.5.11 Weber, R. (2020). Radioaktivitätsmessung Eisen-55 in den Fraktionen