

Samenvatting

*'Wie anderen onderricht,
moet wat hij hun leert eerst in zichzelf verwezenlijken.
Want wie zichzelf bedwongen heeft,
kan ook anderen helpen!'*

Dhammapada 159

Voor iedereen die denkt dat eiwitjes louter in eieren zitten, dat gelletjes bij de drogist te koop zijn, dat vouwen is toegedeeld aan huisvrouwen en dat zwavelbruggen stinken.

Wij allemaal, al onze lichamen, bestaan uit ontelbare celletjes. Cellen, die op hun beurt zijn opgebouwd uit vetten en eiwitten. Maar eiwitten zijn meer dan bouwstenen alleen, eiwitten spelen ook een belangrijke rol bij vele processen in het lichaam, zoals bijvoorbeeld celdeling en afweerreacties. Echter, zoals wij lekker in ons vel moeten zitten om goed te functioneren, moet ook een eiwit 'lekker in zijn vel zitten', ofwel goed gevouwen zijn (de juiste conformatie hebben) voor het zijn functie uit kan oefenen. Verschillende ziektes zijn het gevolg van fout gevouwen eiwitten, als bijvoorbeeld taaislijmziekte (cystic fibrosis), Alzheimer, Creutzfeldt-Jakob (en de gekke koeienziekte) maar ook hart- en vaatziektes.

Hoe het begon

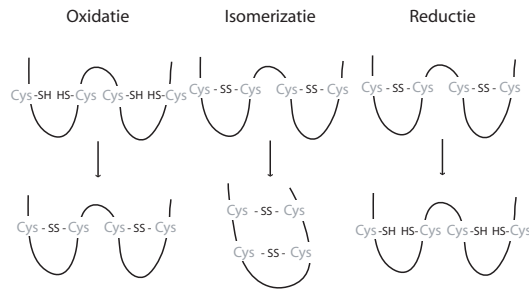
Desoxyribonucleïne zuur, beter bekend als DNA, bevat alle erfelijke informatie van een cel. Vergelijk het maar met een grote bibliotheek. Die informatie kan via een boodschapper (mRNA) omgezet worden (getransleerd) naar een eiwit. Alle eiwitten worden zo steentje voor steentje opgebouwd, deze bouwsteentjes heten aminozuren. Zo worden eiwitten aangemaakt (gesynthetiseerd) en komen ze tot expressie. En dan begint dit onderzoek!

Eiwitvouwing

Wanneer een eiwit net gesynthetiseerd is, moet het nog gevouwen worden. Delen van het eiwit vouwen vaak al voordat het hele eiwit aangemaakt is, wat ook co-translationele vouwing wordt genoemd. Veel eiwitten vouwen in het endoplasmatisch reticulum, als het ware de eiwitfabriek van de cel. De omstandigheden zijn hier optimaal en er staan vele helper-eiwitten (chaperonnes) en vouwingsenzymen tot hun beschikking. Deze kunnen eiwitvouwing in goede banen leiden en voorkomen dat eiwitten onjuist vouwen of samen gaan klonteren (aggregeren).

Zwavelbruggen

Zwavelbruggen (disulfides) kunnen helpen om vouwingsintermediären en goedgevouwen (natieve) eiwitten te stabiliseren. Ze verbinden delen van een eiwit met andere delen van een eiwit. Eigenlijk zijn zwavelbruggen (covalente) interacties van het aminozuur cysteïne met een cysteïne residu elders in het eiwit, welke ruimtelijk gezien dicht bij elkaar in de buurt liggen (maar niet noodzakelijkerwijs op de aminozuur keten). Maar ook hier geldt weer (ingewikkeld he?): een eiwit dat aan het vouwen is, zal niet zomaar een zwavelbrug vormen. Vouwingsenzymen als bijvoorbeeld PDI zijn nodig om die eindjes aan elkaar te knopen (oxidatie). Soms in één keer de goede eindjes (natieve zwavelbruggen), maar soms moeten verbindingen verbroken worden (non-natieve zwavelbruggen) en worden vervangen voor nieuwe, andere zwavelbruggen (isomerisatie). Wanneer een eiwit hopeloos verkeerd gevouwen is, kan het buiten het endoplasmatisch reticulum in het cytosol afgebroken (gedegradeerd) worden. Voor het zover is moeten zwavelbruggen echter uit het eiwit gehaald worden (reductie) (**Figuur 1**).



Figuur 1 - Vorming van een zwavelbrug

De vrije -SH groep van het aminozuur cysteïne kan paren met een andere -SH groep tot een zwavelbrug (SS) (oxidatie). Deze reactie wordt meestal versneld door PDI. PDI kan ook fout gevormde zwavelbruggen verleggen (isomerisatie) of verbreken (reductie).

Het analyseren van eiwitvouwing

Om eiwitvouwing te bestuderen gebruiken we een zogenaamde puls-chase assay. We brengen een eiwit wat we willen bestuderen tot 'overexpressie' (= verhoogde expressie) in cellen, die groeien in een schaalpje. Eiwit overexpressie werkt als volgt: je neemt een schaalpje cellen, daar doe je vervolgens wat DNA bij wat codeert voor het eiwit wat je wilt onderzoeken. Even kort door de bocht: de cel zal het DNA opnemen en vervolgens eiwit voor je gaan maken. Lief hè? Na 24 uur is er voldoende eiwit aanwezig en kan de vouwingsanalyse beginnen. Eerst moeten we hiervoor alle eiwitten zichtbaar maken, dat doen we door middel van een radioactief label. Alle eiwitten die gedurende een korte tijd gesynthetiseerd worden, nemen radioactief gelabelde aminozuren tot zich en worden daarbij zelf ook radioactief. Na een korte tijd wordt het label weggewassen, maar de radioactieve eiwitten blijven. Deze mogen voor een bepaalde tijd vouwen, alvorens we de cellen kapot maken (lyseren). Met een specifiek antilichaam kunnen we het eiwit waar we interesse in hebben uit de eiwitsoep (het cellysaat) vissen, wat we vervolgens op een gelletje kunnen bekijken.

Maar hoe werkt een gel?

Het principe is niet moeilijk: je mengt allerlei stofjes, zodat je een substantie krijgt die eigenlijk nog het meest weg heeft van een gelatinepudding. Alleen, deze pudding wordt niet gegoten in een vrolijke taartvorm, maar tussen twee glasplaatje. Zo krijg je een hele dunne gel (meestal 0,75 mm) waarmee je je eiwitten kan scheiden. De eiwitten worden ontvouwen (gedenatureerd) door middel van het stofje SDS (een soort zeep) en vervolgens op de gel gebracht (geladen). Door een electrisch stroompje worden de eiwitten door de gel getrokken. Kleine eiwitten lopen makkelijker door de gel dan grote, logge eiwitten. Zo kun je dus eiwitten scheiden aan de hand van hun grootte.



Figuur 2 – de Ero1 α -PDI oxidatie as

PDI kan zwavelbruggen in eiwitten maken door zogenaamde electronen (e^-) van eiwitten over te nemen. Om deze functie te blijven behouden, moet PDI 'opgeladen' worden door de desbetreffende electronen over te hevelen naar Ero1 α , die via het hulpstofje (de cofactor) FAD electronen aan zuurstof geeft.

Maar er is meer. Wanneer een eiwit zwavelbruggen heeft gevormd, zijn delen van het eiwit die ver uiteen liggen met elkaar verbonden en is het eiwit dus compacter. Dit compacte eiwit heeft wel wat weg van een kleiner eiwit, dus zal een eiwit sneller lopen in de gel naarmate er meer zwavelbruggen zijn. Deze technieken kunnen we dan ook gebruiken om de vorming van zwavelbruggen te bestuderen.

Wanneer je echter zwavelbruggen zou verbreken (reduceren), verliest het eiwit zijn compacte vorm en loopt het minder snel door de gel.

Mijn onderzoek

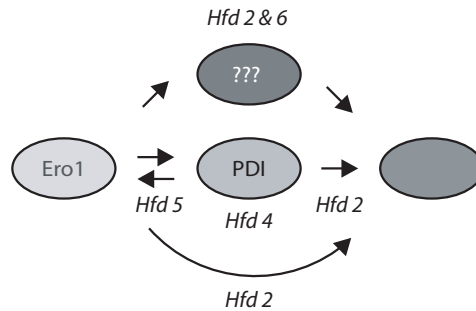
Cellen maken zwavelbruggen (oxidatie), maar ze kunnen ook zwavelbruggen veranderen (isomerisatie) en verbreken (reductie). Dit gebeurt allemaal in hetzelfde deel van de cel, stranker nog, dit gebeurt waarschijnlijk allemaal onder invloed van hetzelfde eiwitkoppel, namelijk Ero1 α en PDI. PDI maakt oxidatie, isomerisatie en reductie makkelijker, maar PDI heeft Ero1 α nodig om zelf opgeladen en opnieuw actief te worden als oxidase (= eiwit dat oxidatie/zwavelbrug vorming versnelt). (**Figuur 2**).

Je kan je voorstellen dat een hele goede regulatie noodzakelijk is wanneer je tegenovergestelde processen door hetzelfde eiwitkoppel uit wilt laten voeren, en dan ook nog eens op de goede manier!

Hoofdstuk 2

In dit hoofdstuk bestuderen we de rol van het Ero1 α -PDI redox koppel (redox betekent hier dat er zwavelbruggen bij betrokken zijn). Om dit proces beter te analyseren hebben we een nieuwe assay ontwikkeld, welke we de IAM-IAA (iodoacetamide-iodo azijnzuur) assay hebben gedoopt. Met deze variant van gelletjes, zoals hierboven beschreven, kunnen we bepalen hoeveel zwavelbruggen er in een bepaald eiwit aanwezig zijn.

Hoewel de overexpressie van Ero1 α het ontstaan van zwavelbruggen versnelt (**Figuur 3**), gaat dit niet altijd via PDI zoals eerdere studies suggeren (**Figuur 2**), maar mogelijk anderszins direct of via een ander (nog onbekend) eiwit. Sterker nog, Ero1 α en PDI hebben soms tegengestelde effecten. We tonen ook dat de precieze functie van PDI heel nauw samen hangt met het milieu waarin het eiwit verkeert. Deze beïnvloedbaarheid van PDI zou voordelig kunnen zijn voor de cel: processen zouden op die manier makkelijk en sneller controleerbaar kunnen zijn.

**Figuur 3**

In deze studie tonen we aan dat het maken van zwavelbruggen en de regulatie van dit proces niet zo eenvoudig is als gepresenteerd in Figuur 2. Eiwitten kunnen elkaars functie op allerlei manieren beïnvloeden (hier weergegeven door middel van pijltjes), wat mogelijk een zeer belangrijke rol speelt bij de precieze regulatie van zwavelbrugvorming en eiwitvouwing.

Hoofdstuk 3

Zoals gezegd, eiwitten moeten de juiste conformatie hebben om hun specifieke functie uit te voeren. Veel stappen kunnen vooraf gaan aan het verkrijgen van die juiste conformatie, zoals bijvoorbeeld de LDL receptor. Dit eiwit speelt een belangrijke rol bij de opname van LDL-cholesterol (bekend van de Becel reclame) uit het bloed. En zoals de spotjes van de hartstichting al suggereren: een te hoog cholesterolgehalte in het bloed kan leiden tot hart- en vaatziekten en alle gevolgen van dien.

Wij laten zien dat de LDL receptor vouwt in verschillende fases. Na synthese vormt het eiwit eerst een (relatief) klein aantal zwavelbruggen, dat er voor zorgt dat het eiwit een compacte vorm heeft. Ero1 α speelt een belangrijke rol in het verkrijgen van deze compacte vorm, welke als doel zou kunnen hebben te voorkomen dat het eiwit aggregereert. De tweede fase wordt gedomineerd door de vervanging van deze zwavelbruggen, wat essentieel lijkt voor de vorming van de overige zwavelbruggen en de vouwing van het eiwit in het geheel. PDI lijkt hier een heel belangrijke rol in te spelen. In de laatste fase vindt alleen maar isomerisaties van zwavelbruggen plaats.

Hoofdstuk 4

Nu we hebben aangetoond dat PDI meerdere functies in de cel kan hebben, willen we graag weten HOE PDI deze functies vervult. PDI bestaat uit meerdere delen, ook wel domeinen genoemd. Twee van die domeinen hebben een zgn. catalytisch motief ('active site'), dat deel versnelt reacties waarbij zwavelbruggen ontstaan en verbroken worden.

Het tweede catalytische motief van PDI (in het **a'** domein) is met name betrokken bij de vorming van zwavelbruggen. Wanneer dit motief niet aanwezig is, kan PDI nog wel zwavelbruggen isomeriseren, maar de vorming van zwavelbruggen is erg vertraagd. Behalve het aangetoonde effect op de vorming van zwavelbruggen, hebben aanpassingen van de catalytische motieven (bijvoorbeeld door mutaties) ook een effect op de binding van PDI aan andere eiwitten.

Tot slot laten we in dit hoofdstuk zien dat de verschillende domeinen van PDI ook onderling met elkaar in verbinding staan door een zgn. interdomein ('tussen verschillende domeinen') zwavelbrug, wat een belangrijke rol kan spelen bij de communicatie tussen de verschillende delen van PDI en dientengevolge zijn functie.

Hoofdstuk 5

Hoewel altijd werd aangenomen dat Ero1 α er verantwoordelijk voor is dat PDI zwavelbruggen kan blijven maken, laten we in dit hoofdstuk zien dat PDI ook Ero1 α kan beïnvloeden (**Figuur 3**). Deze bilaterale interactie tussen de beide eiwitten kan er voor zorgen dat zwavelbruggen niet te snel en ongecontroleerd ontstaan, een soort van oxidatie begrenzer dus. Bij de vorming van zwavelbruggen komen er namelijk reactieve zuurstofdeeltjes (ROS) als vrije radicalen vrij, welke zeer kwalijk kunnen zijn voor de cel doordat ze de neiging hebben DNA, vetten en dergelijke vast te grijpen en te beschadigen.

Hoofdstuk 6

ERp44 is een ander eiwitje, wat er in ieder geval voor verantwoordelijk is dat Ero1 α in het endoplasmatisch reticulum blijft hangen. We wilden echter weten of ERp44, net als PDI, ook zwavelbruggen kan maken. ERp44 lijkt dit echter niet te kunnen, al lijkt het er wel op dat ERp44 een rol kan spelen bij de isomerisatie van onjuiste zwavelbruggen. Ook lijkt ERp44 de maturatie ('rijping') van de LDL receptor te beïnvloeden door te binden aan vrije cysteïnes (de -SH groepen in Figuur 1). Behalve dit effect, is ERp44 bovendien in staat Ero1 α tegen te werken en op die manier mogelijksterwijs te controleren.

Tot slot

De vorming van zwavelbruggen is zeer belangrijk voor de vouwing en de stabilisatie van allerlei eiwitten met vele, verschillende functies. In deze studie tonen we aan dat er meerdere manieren zijn om de vorming van zwavelbruggen te reguleren en te controleren. Alleen zo kan de cel garanderen dat kwaliteit geleverd wordt en er niet ineens allemaal ziektes ontstaan. En daar hebben we allemaal baat bij.