

Nederlandse samenvatting voor geïnteresseerden buiten het vakgebied

Met dit proefschrift ga ik promoveren in de biochemie. In dit vakgebied wordt de biologie bestudeerd vanuit chemisch perspectief. Het doel van biochemie is het begrijpen van de chemische principes die aan het leven ten grondslag liggen. Om dit te bereiken is het nodig om 'in te zoomen' op de kleinste eenheid van het leven: de cel. Hieronder zal ik eerst uitleggen wat een cel is en uit welke componenten deze over het algemeen is opgebouwd. Vervolgens zal ik uitleggen wat ik precies heb onderzocht en welke conclusies ik heb geformuleerd. De opzet van mijn onderzoek is fundamenteel van aard en niet gericht op directe toepassing van de verworven kennis. Toch vormt een aantal conclusies in dit proefschrift mogelijk een startpunt voor meer toegepast onderzoek. In de laatste paragraaf zal ik hieraan kort aandacht besteden.

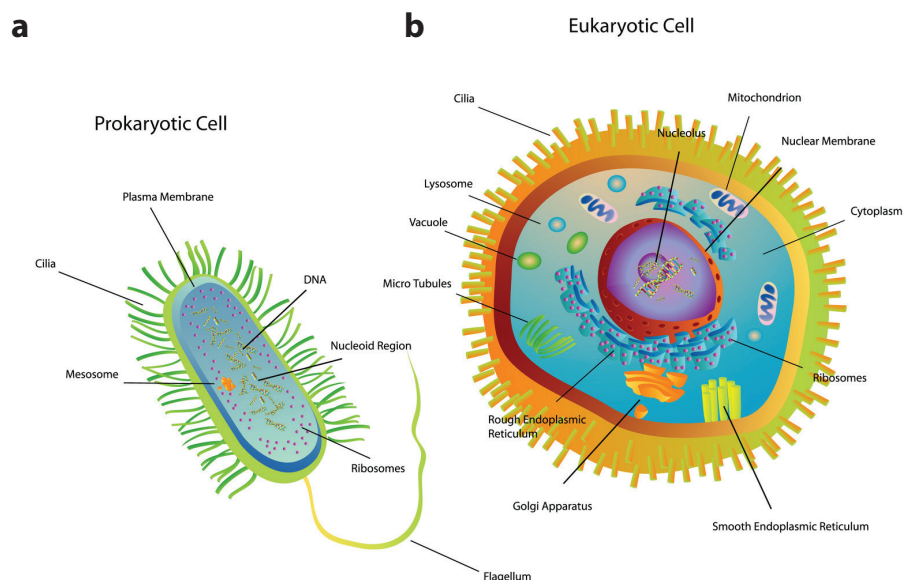
Een korte inleiding in de chemie

De chemie, ook wel scheikunde genoemd, houdt zich bezig met wetten die de samenstelling en ontbinding van moleculen beschrijven. De lucht die wij inademen bestaat bijvoorbeeld (voornamelijk) uit de moleculen zuurstof en stikstof. Moleculen zijn opgebouwd uit kleinere eenheden die atomen of elementen worden genoemd. De term 'atoom' is afgeleid van het Griekse woord 'atomos' dat ondeelbaar betekent. De samenstelling van een molecuul bepaalt de chemische eigenschappen ervan. Een watermolecuul is bijvoorbeeld opgebouwd uit twee atomen waterstof en één atoom zuurstof. Om dit eenvoudig weer te geven wordt in de scheikunde gebruik gemaakt van een speciale notatie van letters en getallen. Scheikundigen gebruiken voor het watermolecuul de notatie H_2O . Hierin staat de 'H' voor waterstofatoom (dat twee keer voorkomt) en de 'O' voor zuurstofatoom. Het watermolecuul bestaat dus uit drie atomen en is daarom een relatief simpel molecuul. Meer ingewikkelde moleculen kunnen zijn opgebouwd uit tientallen atomen. In de biochemie worden moleculen bestudeerd die voorkomen in een cel. Over het algemeen zijn deze moleculen complexer dan de moleculen die in de gewone scheikunde worden onderzocht. Moleculen in de biochemie kunnen bestaan uit duizenden atomen.

De cel: de kleinste eenheid van het leven

Elke vorm van leven is opgebouwd uit cellen. Dit geldt dus voor alle planten en dieren, maar ook voor bacteriën. In mijn onderzoek heb ik gewerkt met bacteriën. Deze organismen bestaan uit slechts één cel. Dieren en planten bestaan over het algemeen uit een verzameling van zeer veel cellen. Volgens een grove schatting bevat een gemiddeld menselijk lichaam bijvoorbeeld 100 triljoen cellen (oftewel: een 1 met 14 nullen).

Behalve bacteriën bestaan bijvoorbeeld ook gisten (zoals het gist dat wordt gebruikt om brood te laten rijzen) uit één cel.



Afbeelding 1: een schematische weergave van de cel

Links is een bacteriële cel weergegeven, rechts een dierlijke cel. De dierlijke cel heeft een celkern en is groter dan de bacterie. De cellen zijn niet op schaal getekend.

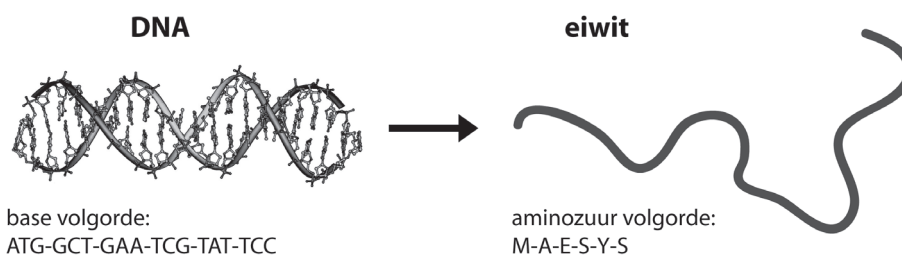
Er is in de biologie veel variatie in hoe cellen van binnen zijn georganiseerd. Plantaardige en dierlijke cellen zijn bijvoorbeeld opgebouwd uit verschillende compartimenten die ook wel 'organellen' worden genoemd (zie afbeelding 1b). Het bekendste voorbeeld hiervan is de celkern, waar het erfelijke materiaal (DNA) wordt bewaard. Bacteriën zien er over het algemeen wat simpeler uit en hebben geen interne compartimenten. Bovendien zijn bacteriële cellen een stuk kleiner dan dierlijke cellen (zie afbeelding 1a).

Cellen worden omhuld door een celmembran dat de cel beschermd en ervoor zorgt dat de inhoud van de cel netjes bij elkaar blijft. Ook houdt het celmembran de opname van voedingsstoffen tegen. Om toch voedingsstoffen te kunnen opnemen, maken cellen gebruik van transporteiwitten. Deze zitten in het celmembran. Mijn onderzoek gaat over een transporteiwit en ik heb uitgezocht hoe dit werkt. Hierover volgt later meer.

DNA: instructies voor de opbouw van cellen

Desoxyribonucleïnezuur (DNA) is een molecuul waarin erfelijke eigenschappen van een organisme liggen opgeslagen. DNA-moleculen bestaan uit duizenden atomen. Dit maakt het moeilijk om van deze moleculen een scheikundige notatie te formuleren. DNA wordt daarom beschreven aan de hand van vier letters (A, G, C en T), die zijn afgeleid van de vier eenheden (basen) waaruit DNA bestaat: Adenine, Guanine, Cytosine en Thymin. Een DNA-molecuul is opgebouwd uit een lange streng van deze vier basen, telkens in een andere specifieke volgorde. Bijvoorbeeld: ATGGCTGAATCGTATTC.

Al het DNA in een cel wordt omschreven als het genoom. Het genoom bestaat uit verschillende zeer lange DNA-moleculen die chromosomen worden genoemd. Het menselijke genoom bevat bijvoorbeeld 46 chromosomen. Een chromosoom bevat meerdere genen. Een gen is een deel van het chromosoom dat een lengte heeft van enkele honderden tot duizenden basen. Ieder gen bevat instructies voor één van de vele processen in de cel en heeft daarvoor een unieke basevolgorde.



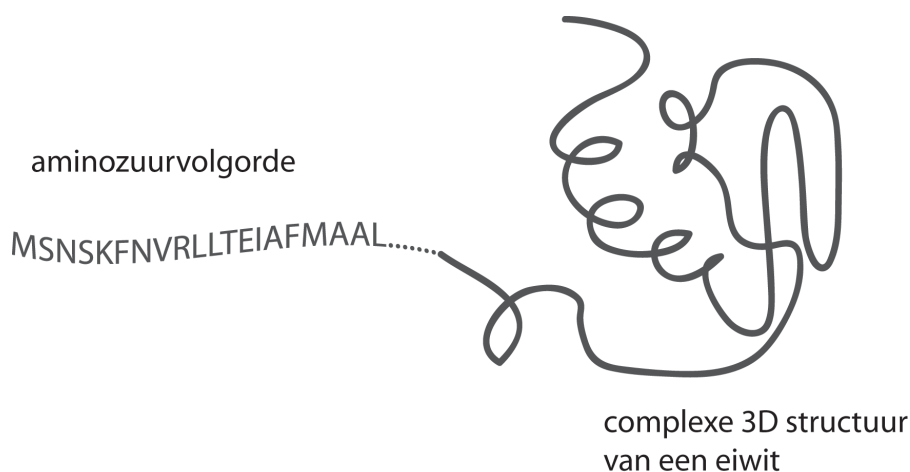
Afbeelding 2: de relatie tussen DNA en eiwitten

De basenvolgorde in het DNA wordt door de cel 'vertaald' naar de aminozuurvolgorde van het eiwit.

Eiwitten voeren processen uit

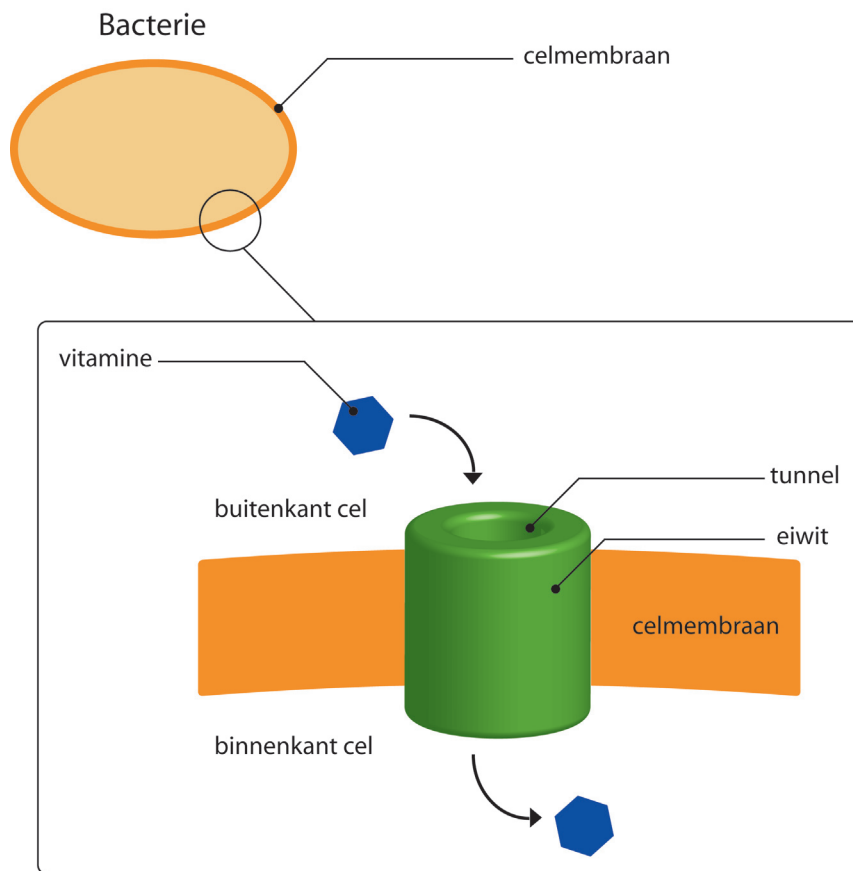
Genen zijn niet direct betrokken bij de uitvoering van processen, zij bevatten alleen de instructies hiervoor. Het echte werk wordt gedaan door andere moleculen: eiwitten of proteïnes. Net als DNA bestaan eiwitten uit lange strengen van eenheden die aminozuren worden genoemd. Er zijn 20 verschillende aminozuren die ook elk weer een eigen één-letter code hebben. Elk gen bevat de informatie voor de aanmaak van een eiwit. Om deze informatie te verwerken, 'leest' een cel de basenvolgorde van het DNA af in stukjes van 3 basen. De bovenstaande DNA-basenvolgorde kan door de cel dus als volgt worden gelezen: ATG-GCT-GAA-TCG-TAT-TCC. In totaal zijn er 64 verschillende combinaties van 3 basen mogelijk. Elke combinatie is gekoppeld aan een aminozuur (sommige aminozuren zijn gekoppeld aan meer dan één combinatie, daarom zijn er maar 20 aminozuren) waardoor de basenvolgorde in de DNA-volgorde direct is gekoppeld aan de aminozuurvolgorde in een eiwit (afbeelding 2).

Bij vrijwel alles dat in een cel gebeurt, zijn eiwitten betrokken. Eiwitten zorgen bijvoorbeeld voor de omzetting van suikers in energie, voor de afbraak van giftige stoffen en voor de herkenning van ziekteverwekkers door ons immuunsysteem. Heel veel ziektes worden veroorzaakt door het slecht functioneren van eiwitten. Een eiwit functioneert slecht wanneer de aminozuurvolgorde in een eiwit toevallig afwijkt van de gebruikelijke volgorde. Dit kan bijvoorbeeld worden veroorzaakt door een foutje in de DNA-basenvolgorde. In dat geval is er sprake van een erfelijke ziekte. De enorme variatie in de functies van eiwitten komt voort uit twee principes: de volgorde van aminozuren in een eiwitmolecuul en de driedimensionale structuur die een eiwit aanneemt. Eiwitten bestaan uit een lange keten van aan elkaar geschakelde aminozuren. Deze keten kan zich opvouwen tot een complexe structuur (zie afbeelding 3). Om de werking van eiwitten te begrijpen is het dus nodig om de aminozuurvolgorde én de structuur ervan te kennen.



Afbeelding 3: de eiwitketen vouwt zich op tot een complexe driedimensionale structuur

Eiwitten zijn ondermeer betrokken bij de opname van voedingsstoffen en andere essentiële moleculen die niet zomaar door het celmembraan heen kunnen. Deze eiwitten bevinden zich in het celmembraan en worden daarom membraaneiwitten genoemd. Om een molecuul op te nemen moet het allereerst worden herkend door een membraaneiwit. Over het algemeen is er voor elk molecuul een ander eiwit beschikbaar zodat de cel precies kan controleren welke moleculen wel en niet worden opgenomen. Als het juiste molecuul is herkend, verandert het membraaneiwit zichzelf als het ware in een tunnel, waardoor het molecuul naar de binnenkant van de cel kan worden getransporteerd (afbeelding 4). Daarom worden deze eiwitten transporteiwitten genoemd. Wanneer het molecuul eenmaal aan de ander kant van het membraan is, wordt de eiwitunnel direct gesloten om te voorkomen dat er andere (ongewenste) moleculen doorheen gaan.



Afbeelding 4: de werking van transporteiwitten

Transporteiwitten bevinden zich in de celmembraan. Door het eiwit (groen) heen loopt een tunnel die alleen geopend wordt als het juiste molecuul herkend is (in dit geval een vitamine). Het molecuul wordt vervolgens door de tunnel heen getransporteerd en komt aan de binnenkant van de cel terecht.

Mijn onderzoek

Over het transport van vitamines in bacteriën is heel weinig bekend. In mijn onderzoek heb ik mij gericht op een specifieke groep transporteiwitten. Aan de hand van proeven heb ik onderzocht welk eiwit is betrokken bij de opname van vitamine B₁ (thiamine) in de bacterie *Lactococcus lactis*. Het transporteiwit heeft de naam ‘ThiT’ gekregen, wat staat voor ‘Thiamine Transport’. In het derde hoofdstuk van mijn proefschrift beschrijf ik hoe dit onderzoek is verlopen.

Nadat ik het eiwit ThiT had ontdekt, ben ik in meer detail gaan kijken hoe het werkt. Dit staat beschreven in hoofdstuk 4. Allereerst heb ik het eiwit uit het celmembraan van *L. lactis* bacteriën gehaald. Dit wordt ‘zuiveren’ genoemd. In gezuiverde vorm was

het mogelijk om te bestuderen hoe ThiT de thiamine in de bacterie kan herkennen. ThiT heeft, zo is gebleken, de bijzondere eigenschap om zelfs wanneer er heel kleine hoeveelheden thiaminemoleculen beschikbaar zijn deze toch te vinden. Hierdoor kunnen de bacteriën gemakkelijk overleven als ze in een omgeving komen waar een tekort aan vitamine B₁ is. In het onderzoek heb ik vooral gekeken naar de invloed van de aminozuurvolgorde op de herkenning van thiamine.



Afbeelding 5: de driedimensionale structuur van ThiT

Hoe de structuur van een eiwit wordt bepaald, staat beschreven in hoofdstuk 5. De lange aminozuurketen van ThiT vouwt zich op tot een complex patroon. De manier waarop de keten gevouwen is, bepaalt de functie van het eiwit.

Zoals gezegd, zijn er twee factoren die de functie van een eiwit bepalen: de aminozuurvolgorde en de driedimensionale structuur. Hoewel wij inzicht hadden in de invloed van de aminozuurvolgorde (zie hoofdstuk 4) ontbrak er nog informatie over de structuur van ThiT. Omdat eiwitten over het algemeen te klein zijn om met de microscoop te bestuderen zijn er alternatieve technieken ontwikkeld om de structuur van eiwitten te ontrafelen. De meest gebruikte methode hiervoor is Röntgen-kristallografie. Om deze techniek toe te passen heb je grote hoeveelheden zuiver eiwit nodig. Van deze eiwitten worden kristallen gegroeid. Kristallen bestaan uit grote hoeveelheden moleculen (zoals eiwitten) die op een heel precieze manier zijn gerangschikt. Door deze kristallen vervolgens vanuit allerlei richtingen te beschieten met een zeer hoge intensiteit Röntgenstraling ontstaat een Röntgenpatroon (diffractie) waarvan de vorm wordt bepaald door de vorm van de eiwitten in het kristal. Deze gegevens worden verwerkt op de computer. Hierdoor is het ook mogelijk om een 3D-reconstructie van het eiwit uit te rekenen. In hoofdstuk 5 beschrijf ik de toepassing van deze techniek om de structuur van ThiT te bepalen.

De moeilijkste stap in dit proces is meestal het groeien van de eiwitkristallen. Voor elk eiwit moet een nieuwe procedure worden ontwikkeld en succes is niet gegarandeerd. Met name van membraaneiwitten (zoals ThiT) is het over het algemeen bijzonder moeilijk om kristallen te krijgen. Dit verklaart waarom er relatief weinig is bekend over de structuur van membraaneiwitten. Uit de structuur van ThiT (afbeelding 5) hebben wij heel veel kunnen afleiden over de manier waarop vitamine B₁ wordt getransporteerd.

Verwachtingen voor de toekomst

Zoals gezegd, is mijn onderzoek fundamenteel van aard en voornamelijk gedreven door nieuwsgierigheid naar de werking van eiwitten. Fundamenteel onderzoek vormt de basis voor concrete toepassingen. Vitamines zijn van essentieel belang voor veel bacteriën. Een aantal ziekteverwekkende bacteriën is bijvoorbeeld afhankelijk van de opname van thiamine om te kunnen groeien. Met voldoende kennis over het transportmechanisme van thiamine is het in principe mogelijk om op zoek te gaan naar moleculen die het transport blokkeren. Dergelijke stoffen kunnen in de toekomst worden gebruikt als antibiotica om ziekteverwekkende bacteriën te bestrijden. Het is daarom belangrijk om de werking van ThiT in nog meer detail te bestuderen. Ook over het transport van andere vitamines zouden wij nog meer te weten moeten komen.

