



JAARGANG 2016, NUMMER 1 (SEPTEMBER)

Het nieuwe academiejaar staat alweer voor de deur; dringend tijd dus om enkele studenten die het vorige academiejaar afstudeerden in de Angiospermae te zetten. Elja Eskes (Biologie) en Vincent Van Deuren (Biochemie & Biotechnologie) waren de laureaten van de PDL-Masterprijzen en hier ging hun Masterthesis over...

Van Sch9 tot PKB: Hoe bakkersgist ons helpt in de strijd tegen ouderdomsgerelateerde ziekten - door Elja Eskes



Elja Eskes

Sinds de jaren '50 neemt de levensverwachting van de mens sterk toe, wat geleid heeft tot een groeiend aandeel van ouderen in onze populatie. Dit zorgt ervoor dat ouderdomsgerelateerde ziekten, zoals kanker, neurodegeneratieve ziekten en diabetes type 2, steeds couranter worden. Om de oorzaken van dit soort ziekten op een cellulair niveau te kunnen onderzoeken, wordt de bakkersgist *Saccharomyces cerevisiae* dikwijls gebruikt. Omdat gist een ééncellig organisme is, laat dit ons toe moleculaire en fysiologische processen op een meer algemene manier te onderzoeken, zonder geconfronteerd te worden met de complexiteit van meercellige organismen.

Een proteïne dat in de mens dikwijls betrokken is in de ontwikkeling van ouderdomsgerelateerde ziekten is het proteïne kinase B (PKB) of Akt. De gisthomoloog van dit proteïne is Sch9, een metabolische integrator die signalen ontvangt van het koolstof-, stikstof-, aminozuur- en lipidemetabolisme. Sch9 is maximaal actief wanneer de cel zich in optimale condities bevindt, namelijk in de aanwezigheid van veel en kwalitatieve voedingsstoffen en afwezigheid van stressors. Wanneer het *SCH9* gen wordt uitgeschakeld, groeien cellen trager, maar ze vertonen ook een verlengde levensduur. Het exacte mechanisme waardoor de levensduur verlengd wordt is nog niet gekend.

In dit project onderzochten we meer in detail op welke manier Sch9 functioneert, en welke rol de verschillende domeinen van het proteïne spelen voor de globale functie. We vonden dat één specifiek deel, het N-terminaal domein (NTD), in het bijzonder belangrijk is voor de regulatie van Sch9. Onze resultaten tonen bijvoorbeeld dat dit deel betrokken is bij een correcte subcellulaire localisatie van het proteïne, zodat Sch9 zich op het juiste moment op de juiste plaats bevindt om te interageren met zijn interactiepartners. Verder konden we ook een interactie aantonen tussen Sch9 en het

V-ATPase, een protonenpomp die betrokken is bij de pH-regulatie van o.a. de vacuole (of het lysosoom bij zoogdiercellen) en het cytosol. Wanneer we het NTD van Sch9 verwijderen, wordt deze interactie sterker. Dit kan betekenen dat het NTD als een soort van "aan- en uitknop" functioneert voor deze interactie. Aangezien het geweten is dat cytosolaire en vacuolaire pH betrokken zijn in celveroudering, kan de rol van Sch9 in celveroudering mogelijk uitgevoerd worden via een regulatie van het V-ATPase. Verder onderzoek moet hierover meer duidelijkheid brengen. Ten slotte toonden we via *in silico* analyse aan dat de energiesensor Snf1 mogelijk betrokken is bij de regulatie van het NTD van Sch9. Verder experimenteel onderzoek kan deze regulatie verifiëren en de functies hiervan blootleggen.

Door dit soort netwerken van proteïnen te ontrafelen in gist, kunnen we cellulaire processen beter leren begrijpen. Maar belangrijker, doordat Sch9 homologie vertoont met PKB/Akt, kan dit betekenen dat conclusies die getrokken worden uit gistonderzoek mogelijk ook van toepassing kunnen zijn in hogere organismen, waaronder de mens. Het onderzoek bij hogere organismen is echter complexer en strikt gebonden aan ethische aspecten die bij gistonderzoek niet van toepassing zijn. Daarom is het belangrijk om via ons onderzoek in gist een beter inzicht te krijgen in de cellulaire processen die aan de grond liggen van humane aandoeningen die te maken hebben met een disfunctionele regulatie van celveroudering. Door een beter begrip van deze cellulaire processen, wordt ook het pad blootgelegd naar de iden-

tificatie van therapeutische doelwitten en mogelijke behandelingen van deze aandoeningen. Op deze manier kan gist ons helpen in onze strijd tegen Alzheimer, Parkinson, kanker en vele andere ouderdomsziekten.

Vincent Van Deuren (Biochemie & Biotechnologie)

Mijn keuze voor biochemie & biotechnologie werd vijf jaar geleden snel gemaakt. Gedreven door een voorliefde voor onderzoek schreef ik me in voor deze opleiding. Tijdens mijn opleiding kwam deze onderzoeksgerichtheid reeds sterk naar boven, onder meer tijdens de bachelorproef en de externe stage die ik als Erasmusstudent heb gelopen in het *Centre de Biochimie Structural* in Montpellier. Echter, tijdens de masterproef voelde ik me echt wetenschapper, zowel op het vlak van probleemoplossend denken als het proberen plaatsen van onverwachte maar toch interessante resultaten.

Mijn thesis vond plaats in het laboratorium voor Moleculaire en Synthetische Biologie van professor Johan Robben en kaderde in een groter project, waarin gezocht wordt om specifieke vormen van DNA-schade te detecteren en te volgen in een levend systeem. Het DNA waarin het bouwplan van het organisme vervat is, moet erg robuust en stabiel zijn. Maar als biomolecule ontsnapt DNA niet aan bepaalde chemische reacties. Een voorbeeld van zo'n reactie is methylering, waarbij een kleine chemische groep gewenst of ongewenst op de basisstructuur van het DNA wordt geplaatst. Zelfs zo'n minieme verandering aan het DNA heeft vergaande gevolgen. Naargelang de aard en de plaats van de modificatie kunnen twee moleculaire processen verstoord worden, namelijk replicatie van het DNA en transcriptie naar RNA voor de aanmaak van de eiwitten. Echter, cellen beschermen zich tegen ongewenste DNA-methylering. Ze bezitten een heel scala aan eiwitten die in staat zijn deze vormen van DNA-schade te herstellen. Onze interesse gaat uit naar zo'n eiwit dat aangemaakt wordt door *E. coli*, een bacterie die leeft in het menselijke darmstelsel. Dit eiwit, AlkB genaamd, kan op ingenieuze wijze een zeer breed spectrum aan chemische DNA-modificaties ongedaan maken.

Saccharomyces cerevisiae

Gezien de mogelijk drastische gevolgen van deze vorm van DNA-schade, zoals kanker, zou het interessant zijn deze zichtbaar te kunnen maken, zeker in levende cellen. Tot nu toe is er nog geen manier om bijvoorbeeld specifiek DNA-methylering en -herstel te volgen *in vivo*.



Vincent Van Deuren

Als mogelijke oplossing trachten we in ons laboratorium het DNA-hersteleiwit AlkB om te vormen tot een biosensor die ons moet verklikken waar de DNA-schade precies zit. We zullen AlkB naar onze hand te zetten door het om te vormen ("evolueren") naar een varianteiwit dat stabiel bindt aan zeer specifieke modificaties. Deze binders zouden dan, door koppeling aan een fluorescerend eiwit, in de cel gevolgd kunnen worden door bijvoorbeeld microscopie.

Om deze binders te genereren maken we gebruik van "faagdisplay", een techniek waarin miljoenen mutanten van AlkB elk afzonderlijk op de mantel van een viruspartikel wordt gezet. Deze partikels worden samengebracht met een stukje "beschadigd" synthetisch DNA. De partikels die het sterkst binden worden afgezonderd en de verantwoordelijke AlkB-mutanten geïdentificeerd. Deze zijn kandidaten voor het latere monitoren van deze specifieke DNA-schade.

Eerder waren in het lab al stappen gezet om AlkB op viruspartikels te zetten. Maar hoe contro-

leer je of het er wel correct op zit, en hoe breng je effecten van de geplande evolutionaire veranderingen in kaart? Het op punt stellen van deze methoden was het hoofddoel van deze thesis. Allereerst keken we naar het vermogen van AlkB en twee van zijn mutanten om gemethyleerd DNA te herstellen. Hiervoor hebben we massaspectrometrie ingeschakeld, een zeer gevoelige techniek waarmee de exacte massa van moleculen bepaald kan worden. Als AlkB het methylgroepje van het beschadigde DNA verwijdert, dan wijzigt de massa. Dit verschil in massa kunnen we volgen met de massaspectrometer. Ten tweede hebben we de binding zelf van AlkB aan een welbepaalde DNA-modificatie onderzocht. Dit werd gedaan met een enzym-gebaseerde test, ook wel ELISA genoemd. Hierin werd de relatieve hoeveelheid AlkB bepaald die kan binden aan een gecontroleerde hoeveelheid gemethyleerd DNA. Uit de resultaten met deze tweede methode konden we echter nog geen definitieve conclusies trekken. Tot slot slaagden we erin om bij wijze van proef AlkB te koppelen aan een fluorescent eiwit, dit als een eerste prototype van de biosensor zelf.

Gesterkt door de fijne en interessante ervaring dit jaar, voelde ik dat onderzoek mijn passie is, en datgene is wat ik verder wil doen in mijn leven. Ik heb het AlkB-project nog niet achter mij gelaten, en zal de komende jaren als doctoraatstudent er alles aan doen om het uiteindelijke doel te bereiken.

Tot slot, een kleine bedanking voor iedereen die deze 5 jaren van opleiding met mij hebben beleefd. Familie, vrienden, professoren en begeleiders, bedankt voor deze ongelooflijke tijd! ■



PDL-prijzen voor Beste Doctoraatsthesis 2015 gemist? De teksten van beide winnaars, Dr Isabel Beets (foto) en Dr Lies De Groef, werden gepubliceerd op de Eos SciLog 'Gebiologeerde'. Je vindt ze hier terug:

<http://www.scilog.be/gebilogeerde/leren-van-wormen/>

<http://www.scilog.be/gebilogeerde/het-oog-als-spiegel-van-ons-lichaam/>