

Bakkersgist: een model voor een neurologische ziekte?

H.F. Tabak, I. Braakman

Inleiding

Wetenschap heeft als doel wetmatigheden te vinden waarmee we de macro-wereld om ons heen en de microwereld in onszelf kunnen begrijpen. Indrukwekkende vooruitgang sinds de 'Verlichting' is aanvankelijk geboekt in de macrowereld; in dit tijdvak treedt wat men wel noemt de 'mechanisering van ons wereldbeeld' op. Recenter zijn natuur- en scheikunde uitgegroeid tot solide wetenschappen met algemeen aanvaarde regels waarmee processen kunnen worden beschreven. In de tweede helft van onze eeuw zien we dat het succes van deze wijze van wetenschap bedrijven zich als een olievlek uitbreidt over het gebied van de biologische wetenschappen. Voor de verklaring van levensprocessen heeft de moleculaire biologie als katalysator gewerkt voor het vinden van de benodigde wetmatigheden. Een hoeksteen in dit bouwwerk is het 'centrale dogma', uitgewerkt na de ontdekking van de structuur van DNA, de macromoleculaire drager van erfelijke informatie in de meeste organismen. Dit centrale dogma stelt dat genetische informatie, die vastligt in DNA, indien nodig selectief overgeschreven wordt naar een tijdelijke moleculaire drager. Dit zogenaamde boodschapper- of messenger-RNA (mRNA) wordt als mal gebruikt om eiwitten te maken. Eiwitten zijn de moleculen die in hoge mate de bedrijvigheden in een cel bepalen. Een grote groep van eiwitten, de enzymen, kan chemische bindingen maken en breken en wel elk met een eigen specificiteit. Enzymen zijn essentieel voor de afbraak van ons voedsel (metabolisme) en voor de aanmaak van moleculen die we niet uit onze omgeving kunnen opnemen. Andere eiwitten hebben structurele functies om de architectuur in cellen of organismen te vormen of om bewegingen te verzorgen met behulp van hun contractiele eigenschappen. Kortom, de eigenschappen van levende organismen worden in hoge mate bepaald door de daarin aanwezige eiwitten.

De structuur van eiwitten

Eiwitten danken hun eigenschappen aan de ruimtelijke structuur die zij aannemen. Ze worden gemaakt door een lange lineaire keten van bouwstenen (aminozuren) aaneen te rijgen uit de twintig verschillende aminozuren die een cel ter beschikking heeft. Ieder eiwit wordt gekenmerkt door een specifieke aminozuurvolgorde die de uiteindelijke eigenschappen bepaalt. Interacties tussen de verschillende aminozuren zorgen ervoor dat de lineaire keten zich opvouwt tot een ruimtelijke kluwen. Het woord kluwen suggereert echter ten onrechte dat het zou gaan om een betrekkelijk willekeurige, chaotische vouwing. Integendeel, ieder eiwit rolt zich op tot een uniek gevouwen structuur, die volledig bepaald wordt door de volgorde waarin de aminozuren aan elkaar gezet zijn. Onderzoek naar een klein levereiwit van slechts 124 aminozuren (ribonuclease-A) heeft dit principe bevestigd. Het gezuiverde eiwit kan kunstmatig ontvouwen worden tot een willekeurig gekronkelde draad die daarmee zijn functie (enzymatische activiteit) heeft verloren. Worden deze ontvouwen eiwitmoleculen onder gunstige omstandigheden in de reageerbuis geïncubeerd, dan herwint een redelijke fractie zijn structuur en vertoont weer enzymatische activiteit. Dit fenomeen was een direct bewijs voor het principe dat de aminozuurvolgorde de conformatie of ruimtelijke structuur van een eiwit bepaalt. Het leverde C. Anfinsen in 1973 een Nobelprijs op.

De meeste eiwitten bestaan echter uit veel langere aminozuurketens of zijn opgebouwd uit verschillende subeenheden. Bovendien lijken de reageerbuisomstandigheden (een gezuiverd eiwit in verdunde oplossing) in de verste verte niet op de omstandigheden in de levende cel: duizenden nieuw gemaakte eiwitten moeten, in hoge concentratie op elkaar gepakt, hun ruimtelijke structuur aannemen zonder ruzie met hun burens te krijgen. Een kwart eeuw na het baanbrekende werk van Anfinsen realiseert men zich dat eiwitvouwing een bijzonder ingewikkeld proces is waarbij in veel gevallen de hulp nodig is van eiwitten die speciaal ontworpen zijn om vouwende eiwitten te assisteren. Deze 'helpereiwitten' worden moleculaire chaperonnes genoemd en worden geacht tijdelijk te binden aan onder andere korte aminozuurvolgorden die de neiging hebben per ongeluk te plakken aan andere eiwitten, wat zou kunnen leiden tot irreversibele eiwitaggregatie. Een enkele keer gaat het wel eens mis en een speciaal 'kwaliteitscontrolesysteem' verifieert of eiwitten correct gevouwen zijn. Zo niet, dan worden deze alsnog afgebroken. Hoewel inmiddels veel over eiwitvouwing bekend is geworden is dit een onderdeel van de moleculaire biologie waar de wetmatigheden nog niet volledig uitgekristalliseerd zijn:

1 We weten dat de aminozuurvolgorde de ruimtelijke structuur van een eiwit bepaalt, maar we weten niet *hoe* dit gebeurt. Geen enkel computerpro-

gramma is tot nu toe in staat gebleken om vanuit de aminozuurvolgorde een correcte ruimtelijke structuur te voorspellen.

2 Het vertrouwde concept was dat elk eiwit slechts één gedefinieerde structuur bezit. Recent onderzoek laat zien dat in veel gevallen deze structuur veel dynamischer kan zijn al naar gelang de interactie met andere eiwitten of laagmoleculaire stoffen (zoals bijvoorbeeld hormonen).

3 Verkeerd gevouwen eiwitten kunnen aanleiding geven tot ziekte omdat de functie onvoldoende tot zijn recht komt (een voorbeeld is taaislijmziekte), maar in bijzondere gevallen gedraagt een verkeerd gevouwen eiwit zich als een infectieus agens, een eigenschap die voorheen alleen voorbehouden leek aan nucleïnezuren.

Een verkeerd gevouwen eiwit als infectieus agens?

De wetenschappelijke wereld is nog niet helemaal hersteld van de schokgolf die deze laatste waarneming heeft veroorzaakt. Het is begonnen als normaal onderzoek naar het infectieuze agens dat verantwoordelijk is voor een besmettelijke neurologische aandoening bij schapen. De aandacht was gericht op het vinden van een nieuwe bacterie of virus. Immers, vermenigvuldiging kan volgens het klassieke concept alleen plaatsvinden via een nucleïnezuur als intermediair en drager van erfelijke informatie. Alle pogingen om een nucleïnezuur met de verwachte eigenschappen in handen te krijgen leverden echter niets op. Dit bracht J.S. Griffith al in 1967 tot de stoutmoedige hypothese dat er misschien geen nucleïnezuur bij betrokken was. Een hoofdrol in de bewijsvoering daarvoor is en wordt gespeeld door S.B. Prusiner. Nadat het werkzame agens in hooggezuiverde vorm was verkregen kon met een veelvoud aan geraffineerde technieken inderdaad geen nucleïnezuur worden aangetoond: straling noch chemicaliën of nucleïnezuurafbrekende enzymen deden afbreuk aan het infectieuze karakter. Alle tekenen wezen erop dat het infectieuze agens een eiwit moest zijn (proteinaceous infectious particle, ofwel prion). Na aanvankelijk met schouderophalen op congressen aangehoord te zijn, zag Prusiner zijn volharding en *protein only hypothesis* beloond met de toekenning van de Nobelprijs voor geneeskunde in 1997.

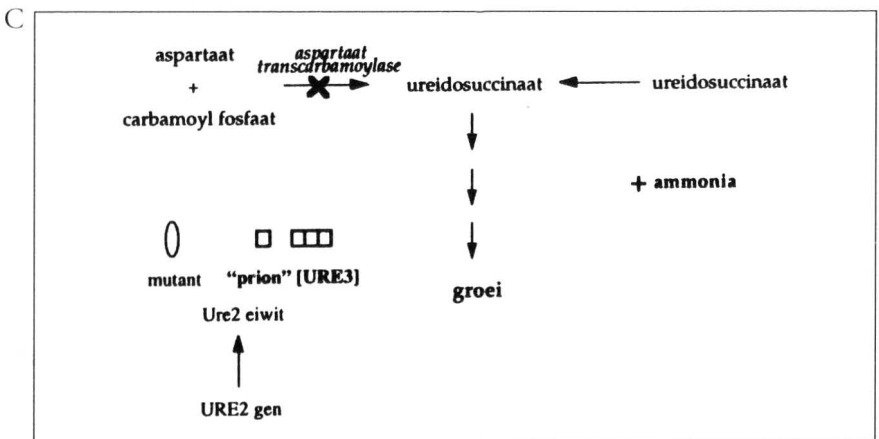
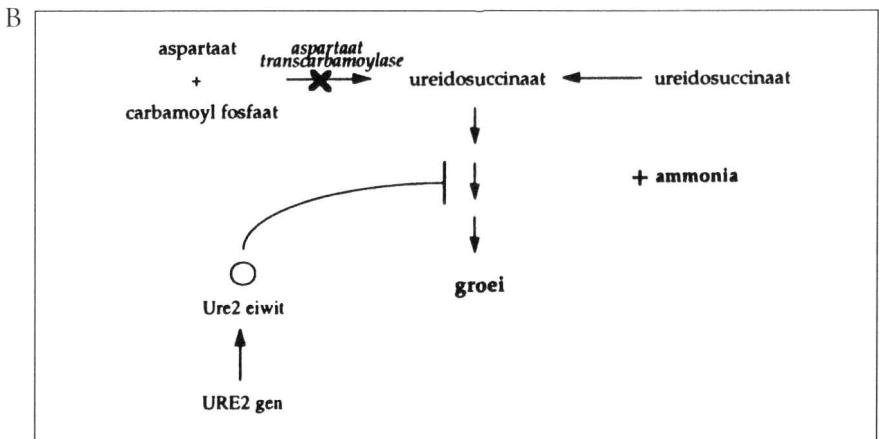
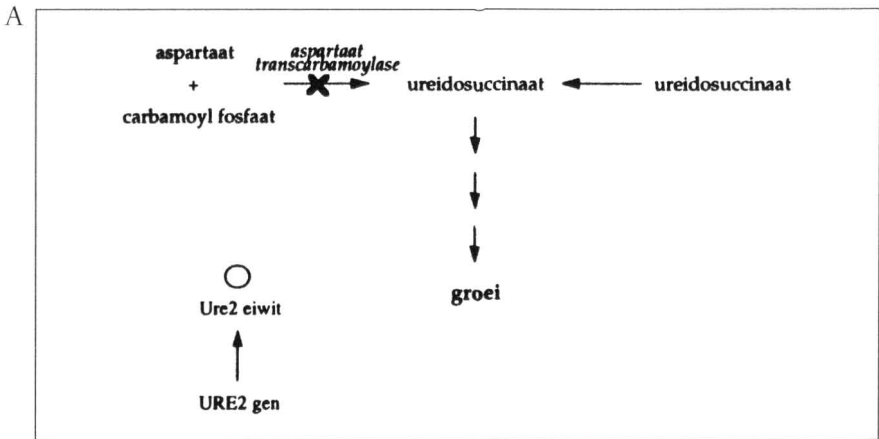
Waarom heeft deze erkenning zo lang op zich laten wachten en zijn er zelfs nu nog enkele *die-hards* die zijn opvattingen te vuur en te zwaard bestrijden? In de eerste plaats worden dogma's natuurlijk niet gemakkelijk doorbroken maar in de tweede plaats speelt de complexiteit van het onderzochte systeem een rol. De ziekte (scrapie) heeft een lange incubatietijd voordat de pathologische kenmerken bij het proefdier (schaap) verschijnen. Dit betekent dat een onderzoeker lang moet wachten voor hij weet of zijn monsters infectieus zijn. Het zou vergelijkbaar zijn met een arts die een jaar of langer moet

wachten op een bloedanalyse van zijn patiënten voor hij een diagnose kan stellen. Later is men erin geslaagd een hamster- en muismodel te ontwikkelen, dat een geringe verbetering in de experimentele condities heeft gebracht. Een *in vitro* weefselkweekstelsel is echter niet beschikbaar. Dit alles maakt dat slechts langzaam vorderingen gemaakt kunnen worden en dat tussen toediening van monster en bepaling van het effect een groot aantal onbekende stappen ligt door de complexiteit van het diermodel.

Scrapie kon lange tijd beschouwd worden als een betrekkelijk uitzonderlijke ziekte waarvan geen ander voorbeeld bekend was. Zijn de waarnemingen merkwaardig, dan heeft de wetenschappelijke wereld al gauw de neiging om zulk werk te negeren en het als triviaal af te doen. Dit is verbeterd met het inzicht dat de ziekte van Creutzfeldt-Jakob bij de mens en bovine spongiforme encephalopathie (BSE) bij het rund op hetzelfde principe berusten en ook prionziekten zijn. Wanneer het hier echter gaat om een universeel principe, namelijk dat eiwitten zich als infectieus agens kunnen gedragen, dan moet dit verschijnsel zich natuurlijk ook elders in de natuur manifesteren. Dit blijkt nu inderdaad het geval te zijn.

Aanwezigheid van prionen in andere organismen

Van oudsher zijn schimmels en gisten favoriete organismen geweest voor grensverleggend fundamenteel onderzoek. In de klassieke genetische literatuur zijn soms oude waarnemingen beschreven die nooit een bevredigende verklaring hebben gekregen. Naar aanleiding van het prionenonderzoek hebben een paar onderzoekers een associatie gelegd met enkele van deze onverklaarbare verschijnselen en deze aan hernieuwd onderzoek onderworpen. Reed Wickner heeft bijvoorbeeld de draad opgepakt van onderzoek dat Francois Lacroute rond 1973 uitvoerde. Het zogenaamde [URE₃]-fenotype dat Lacroute beschreef is volledig te begrijpen in termen van een zich verkeerd vouwend eiwit. Om zijn proeven te begrijpen postuleerde Lacroute het bestaan van twee genen URE₂ en URE₃. Een mutatie in één van beide zou dan eenzelfde fenotype veroorzaken. Achteraf blijkt nu het URE₃-gen helemaal niet te bestaan en kan het [URE₃]-fenotype verklaard worden door verkeerde vouwing van het eiwitproduct van het URE₂-gen (zie figuur 6.1). Een zelfde verhaal gaat op voor een ander fenotype dat lang geleden is opgepikt bij het bestuderen van het eiwitsyntheseprocess op ribosomen: [PSI]. Zeer recent is in de schimmel *Podospora anserina* een eiwit gevonden dat zich als een prion kan gedragen en dat betrokken is bij een soort verouderingsverschijnsel ('geprogrammeerde celdood' of 'apoptose'). Het verrassende bij *P. anserina* is dat van de prionvorm van het betreffende eiwit bewust gebruik gemaakt wordt voor de uitvoering van een biologisch programma. Wanneer



Figuur 6.1 Schematische voorstelling van de experimenten die geleid hebben tot het vinden van 'prioneiwitten' in gist.

- a. Cellen die geen ureidosuccinaat kunnen maken gaan weer groeien als ureidosuccinaat aan het groeimedium wordt toegevoegd;
- b. door toevoeging van ammonia treedt een repressor (Ure2p) in werking die de expressie van een aantal genen uitschakelt die nodig zijn voor groei op ureidosuccinaat. Gistcellen kunnen niet groeien;
- c. door uitschakeling van deze repressor treedt weer groei op. Dit kan op twee manieren gebeuren: door een mutatie in het URE2-gen of door verkeerde vouwing en aggregatie van het repressoreiwit. ○, Ure2 repressoreiwit; ○ mutant repressoreiwit, □ verkeerd gevouwen repressoreiwit, ■■ geaggregeerd repressoreiwit.

de groeiende toppen van de schimmeldraden contact maken met die van een genetisch identieke buurman, dan necrotiseren de schimmeldraden waardoor versmelting met de buurman wordt verhinderd. Dit is het eerste voorbeeld van een prionvorm die voordeel oplevert en geen schade veroorzaakt. Is het bijvoorbeeld een verdediging tegen het oplopen van buurmans virussen en dergelijke? Dit lijkt een vergezochte verklaring. Behalve wanneer men weet dat de bekende, klassieke virussen van schimmels en gisten zich in het algemeen verspreiden via cellulaire contacten: door kruising tussen gisten of versmelting van draden bij schimmels. Een extracellulaire tussenfase komt bij virussen van fungi niet voor. Dit is buitengewoon interessant. Eén van de lastigste onopgeloste raadselen bij de zoogdierprionen is hun besmettelijke karakter. Hoe komt het proneiwit van het ene in het andere zoogdier terecht en hoe kan het de bloed-hersenbarrière nemen? Dit aspect wordt door tegenstanders wel als argument gebruikt om de prionhypothese onderuit te halen. Onterecht, zo lijkt het, want in de eenvoudigere gist- en schimmelmodelsystemen is het infectieuze karakter relatief eenvoudig plausibel te maken.

Conclusie

Waarom is het nu zo belangrijk dat prionachtige verschijnselen ook elders in de natuur en met name in gisten en schimmels zijn gevonden? Zoals eerder betoogd wordt hiermee voldaan aan het wetmatigheidsprincipe: belangrijke biologische processen komen wijd verspreid in de natuur voor en het is bevredigend dat de prionhypothese op deze regel geen uitzondering vormt. Een tweede belang is van praktische aard. Gisten en schimmels lenen zich uitstekend voor basaal fundamenteel onderzoek. Een scala aan moderne, moleculair-biologische technieken staat ter beschikking. Het onderzoek is

relatief goedkoop in vergelijking met het kostbare onderzoek aan zoogdieren. Denk aan de vele proefdieren. Maar bovenal, het prionfenotype is direct van de cellen af te lezen en is met simpele testen te karakteriseren. Langdurige incubatietijden bij proefdieren, gevolgd door een uiterst complex ziektebeeld, zijn uit den boze. Hopelijk kan het gistonderzoek ertoe bijdragen het ultieme bewijs voor de prionhypothese te leveren, zodat de laatste criticasters de mond gesnoerd kan worden.

Ten slotte bevat het prionverhaal ook wat de Amerikanen een *take home message* noemen. Het oorspronkelijke werk van Cox in de jaren zestig aan [PSI] en Lacroute in de jaren zeventig aan [URE₃] is uiteindelijk in de bureaulade beland zonder ooit goed uitgezocht te zijn. Ook in andere onderzoeksgebieden blijken wetenschappers vaak gedolven te hebben in grond met een goudader zonder het begeerde metaal in handen te krijgen. Voor de goede interpretatie van uitzonderlijke onderzoeksresultaten is een zeldzaam voorkomende combinatie van persoonlijke eigenschappen nodig: logisch denkvermogen, geen remming om zich wat aan te trekken van heersende conventies in het vakgebied, een geweldige dosis hybris, zelfvertrouwen en doorzettingsvermogen om tegen de stroom op te roeien. Probleem is dat dit ook vaak de eigenschappen van een eigenwijs warhoofd kunnen zijn. Wat moet je in de wetenschap serieus nemen, wat als triviaal terzijde schuiven? Welke collega is een genie, welke een handige eigenwijze wijsneus? Dat is wat wetenschap bedrijven (ook met bakkersgist) zo interessant en boeiend kan maken.

Een genetische truc om nieuwe componenten in een biologisch proces op te sporen is het zoeken naar *suppressors*. Gist leent zich uitstekend voor toepassing van deze techniek. In het bijschrift bij figuur 5.1 wordt uitgelegd hoe Lacroute dit principe toepaste. Hij ging uit van een gistmutant die een mutatie heeft in het gen dat codeert voor aspartaat-transcarbamylyase, één van de eerste enzymen uit het biosynthesepad naar pyrimidines. Deze mutant kan alleen groeien wanneer ureïdosuccinaat, het product van de enzymatische reactie, aan het groeimedium wordt toegevoegd. Wordt echter ook ammonia aan het medium toegevoegd dan groeit de mutant niet meer omdat een aantal genen nodig voor stikstofmetabolisme nu niet meer tot expressie komt. Lacroute zocht nu naar zeldzaam voorkomende gistcellen (eigenlijk nieuwe mutanten), die door dit blok heen konden breken en onder deze condities toch konden groeien: zogenaamde suppressors. Vaak komt de mutatie voor in een chromosomaal gen waarvan het eiwitproduct op de een of andere manier bij het bestudeerde proces betrokken is. Op basis van de karakterisering van deze suppressors nam Lacroute aan dat het ging om twee typen van suppressors:

- 1 Het ene type is een mutatie in het URE2-gen dat codeert voor een repressor-eiwit, dat verhindert dat genen betrokken bij stikstofmetabolisme tot expressie komen, wanneer bijvoorbeeld ammonia aanwezig is. Eliminatie van deze repressor brengt deze genen wel tot expressie en het negatieve effect van de aanwezigheid van ammonia in het groeimedium wordt nu 'overruled'. Door kruising met een wild-type giststam ontstaat een diploïde cel met het normale (URE2) en het gemuteerde (ure2) allel. Na sporulatie ontstaat een ascus met vier haploïde sporen. Isolatie van de individuele sporen geeft de mogelijkheid om uit elke spore weer een nieuwe gistkolonie op te kweken en de cellen op de aanwezigheid van de allelen te onderzoeken. Er trad 2:2 segregatie op van URE2:ure2, zoals kenmerkend is voor een normale chromosomale marker.
- 2 Een ander type suppressor noemde Lacroute URE3. Genetische karakterisering van deze locus leverde merkwaaardige resultaten op. Het suppressor fenotype [URE3] gedroeg zich dominant en segregeerde 4:0 uit. Het fenotype bleek via het cytoplasma overdraagbaar te zijn. Overdracht van chromosomale genen van de donor-gistcel bleek niet nodig. Het enige DNA (drager van erfelijke eigenschappen) dat in het cytoplasma voorkomt bevindt zich in de mitochondriën. Maar ook giststammen die geen mitochondriaal DNA bevatten konden het suppressor fenotype [URE3] overdragen. Merkwaaardig genoeg kan het [URE3]-fenotype alleen optreden in gistcellen die een normaal URE2-gen bezitten. Qua fenotype is een ure2-mutant niet te onderscheiden van een [URE3]-suppressor. Ten slotte gaat het [URE3] suppressor fenotype verloren bij groei van cellen in aanwezigheid van guanidinium-HCl. Dit is een stof die direct de vouwing van een eiwit kan beïnvloeden door te concurreren met de waterstofbruginteracties tussen aminozuren, die structuur geven aan een eiwit.

Waarschijnlijk hebben de ontwikkelingen in het prionenveld bij de gistgeneticus Reed Wickner en belletje doen rinkelen. Hij heeft de waarnemingen van Lacroute herhaald en bevestigd en met moderne technieken uitgebreid. Alle gegevens passen naadloos in de prionhypothese, waarbij het [URE3]-fenotype verklaard kan worden door aan te nemen dat het eiwit gespecificeerd door het URE2-gen onder bepaalde omstandigheden een verkeerde vouwing (conformatie) kan aannemen. Eenmaal gevormd, wordt het foutief gevouwen eiwit een kristallisatiekern voor al het nieuw gemaakte eiwit, dat dan ook de verkeerde vorm aanneemt. Wordt het via cytoplasma overgebracht naar een nieuwe cel, dan gebeurt daar hetzelfde: al het biologisch actieve Ure2-eiwit wordt inactief door conformatieverandering. Ook alle nakomelingen in een kruising erven deze eigenschap (de 4:0-segregatie als eerder besproken) en worden deficiënt. Susan Lindquist heeft dit kernachtig samengevat: er is sprake van *genetics without DNA*.

Literatuur

- 1 Aguzzi A, Weissmann Ch: Prion research, the next frontiers. *Nature* 389: 795-798 (1997).
- 2 Prusiner SB: The Prion Diseases. *Sci Am* 272: 48-57 (1995).
- 3 Prusiner SB, Scott MR, DeArmond SJ, Cohen FE: Prion Protein Biology. *Cell* 93: 337-348 (1998).
- 4 Tuite MF: Psi no more for yeast prions. *Nature* 370: 327-328 (1994).
- 5 Wickner RB: A new prion controls fungal cell fusion incompatibility. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 10012-10014 (1997).
- 6 Wilson EO: *Consilience, the unity of knowledge*. Alfred A. Knopf, New York (1998).