Downloaded from UvA-DARE, the institutional repository of the University of Amsterdam (UvA)
http://dare.uva.nl/document/60230

File ID 60230
Filename SAMENVATTING

SOURCE (OR PART OF THE FOLLOWING SOURCE):
Type Dissertation
Title Lipid translocation by multidrug transporters
Author R.J. Raggers
Faculty Faculty of Medicine
Year 2001
Pages 128

FULL BIBLIOGRAPHIC DETAILS:
http://dare.uva.nl/record/91783

Copyright

It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other then for strictly personal, individual use.

UvA-DARE is a service provided by the library of the University of Amsterdam (http://dare.uva.nl)

SAMENVATTING
voor vrienden, familie en kennissen

In dit hoodstuk zal ik U proberen uit te leggen waarmee ik me de afgelopen 4 jaar heb bezig gehouden, wat we geleerd hebben en wat me daarin heeft geboeid. Het menselijk lichaam is namelijk een wonder van organisatie, de vele verschillende delen van het lichaam hebben allemaal gespecialiseerde functies, maar werken nauwgezet samen, reageren op elkaar en zorgen tezamen voor het goed functioneren van het gehele lichaam. De kleinste functionele eenheid van een organisme is een cel. Deze vele cellen (met gespecialiseerde functies) vormen onderdelen van b.v. de organen, de organenen vormen, samen met steunweefsel, spieren en botten (die ook uit cellen zijn opgebouwd), het menselijk lichaam. Een cel kan eigenlijk worden beschouwd als een klein fabriekje. In de cel vinden duizenden processen tegelijkertijd plaats. Cellen maken nieuwe eiwitten, hormonen, breken oud materiaal af en hergebruiken de afbraakproductenen en bevatten het erfelijk materiaal, het DNA. Producten die niet kunnen worden gebruikt worden afgevoerd op tijdelijk opgeslagen, terwijl producten die ergens anders in het lichaam noodzakelijk zijn worden uitgescheiden, en via het bloed worden getransporteerd. Eén zo'n cel bestaat uit een waterige oplossing van eiwitten en zouten en wordt begrensd door een dun laagje bestaande uit wat we lipiden noemen. Deze laag, de plasma membraan, vormt de grens tussen de ene cel en de andere, maar ook de grens tussen binnen en buiten, en is essentiëel voor het bestaan van de cel. De lipiden zijn hydrofoob (waterafstotend) en zorgen er onderandere voor dat niet alles zomaar weg kan uit de cel of dat allerlei materialen zomaar de cel binnen kunnen komen. De plasma membraan (en andere intracellulaire membranen) vormen geen enkele laag van lipide moleculen maar vormen een dubbele laag. Een lipide bestaat namelijk uit een hydrofoob gedeelte en een hydrofiel gedeelte. In een membraan zijn de hydrofiele kopgroepen gericht naar de waterige omgeving, terwijl de hydrophobe gedeeltes van de waterige omgeving weg staan. De lipiden in een membraan vormen dus een dubbellaag waarbij de hydrofiele groepen de buitenkant en de hydrophobe gedeeltes de binnenkant vormen. Binnen in een cel zijn naast de plasma membraan, verschillende andere membranen aanwezig. Deze intracellulaire membranen zorgen voor de verdeling van de cel in verschillende compartimenten. Deze compartimenten voeren binnen de cel allerlei gespecialiseerde functies uit.

Lipide synthese en transport:

Een membraan bestaat niet uit één soort lipide, maar uit vele verschillende soorten. Al deze verschillende lipiden worden door de cel gemaakt en hebben allemaal een verschillende functie. Zo zijn er bijvoorbeeld lang-keten en kort-keten phospo- en (glyco)sphingolipiden. En binnen de groep van bijvoorbeeld de (glyco)sphingolipiden zijn er vervolgens weer honderden lipiden met allemaal een verschillende structuur. Helaas weten we van de meeste lipiden niet wat hun specifieke rol in de cel is. Om te weten wat de rol van een bepaald lipide is, is het noodzakelijk om te weten waar (en op welk moment) een bepaald lipide zich in de cel bevindt. Uit onderzoek van de afgelopen tientallen jaren weten we namelijk dat de lipiden niet "at random" verdeeld zijn over de verschillende membranen in de cel, en zelfs niet over de twee lagen waaruit een membraan bestaat. Zo wordt er bijvoorbeeld gedacht dat vele glycosphingolipiden zich voornamelijk in de buitenlaag van de plasma membraan bevinden, terwijl het lipide phospatidylserine zich voornamelijk in de binnenste laag van dezelfde plasma membraan bevindt. De belangrijkste vraag die we ons stellen is natuurlijk waarom een lipide zich daar bevindt, maar tevens zo belangrijk is de vraag hoe het lipide daar komt.

Lipiden worden op verschillende plaatsen in een cel gemaakt. Het lipide phophatidylcholine wordt bijvoorbeeld gemaakt in de membraan van een intracellulair compartiment genaamd het Endoplasmatisch Reticulum, terwijl het glycosphingolipide glucosylceramide in de buitenste laag van het Golgi apparaat wordt gesynthetiseerd. Vanuit die compartimenten worden lipiden vervolgens (gericht) getransporteerd naar de verschillende andere membranen. Lipiden kunnen op verschillende manieren door de cel worden getransporteerd. Aangezien de meeste lipiden hydrofoob zijn kunnen ze niet zomaar via het waterige cytosol naar een ander membraan toe gaan. Daarnaast komen bepaalde lipiden meer voor op één plaats dan op een andere. Dit betekent dat het transport van lipiden binnen de cel gereguleerd en georganiseerd moet worden. De meeste lipiden worden getransporteerd in kleine blaasjes, die afsnoeren van één compartiment en dan fuseren met een ander compartiment. Andere lipiden worden mogelijk getransporteerd met behulp van eiwitten in de cel, die het lipide oppakken uit een membraan, om het vervolgens naar een ander membraan te transporteren. Zoals vermeld, komen bepaalde lipiden specifiek voor in een bepaalde laag van een membraan. Aangezien de meeste lipiden niet zomaar van de ene laag naar de andere laag kunnen bewegen (transloceren) zijn er eiwitten in een membraan die specifieke lipiden van de ene laag naar de andere laag transloceren. Op deze wijzen kan een cel het transport en de plaats van lipiden organiseren.

De laatste jaren hebben we steeds meer kennis verkregen over eiwitten die betrokken zijn bij die translocatie van lipiden van de ene naar de andere laag van een membraan. In Hoofdstuk 1 van dit proefschrift hebben we een overzicht gemaakt van mogelijke eiwitten die lipiden en lipide-achtige stoffen zouden kunnen transloceren. Het blijkt dat vele kandidaten tot specifieke families van membraan eiwitten behoren. Zowel binnen de familie van P-type ATPases als de ABC-familie van membraantransporters zijn verschillende eiwitten de wellicht betrokken zijn bij het transport van lipiden. Het eiwit ABC1 bijvoorbeeld is belangrijk bij het transport van cholesterol. De identificatie en karakterisatie van nieuwe kandidaat lipide-translocators zal de komende jaren een beter inzicht kunnen geven in de manier waarop lipiden in een cel worden getransporteerd. Om goed onderzoek te kunnen doen aan de translocatie van een lipide zijn methoden nodig waarmee we translocatie kunnen meten. In hoofdstuk 2 hebben we een overzicht gemaakt van de voorwaardes waaraan een methode moet voldoen en welke methoden momenteel beschikbaar zijn. Zo kunnen we gebruik maken van lipide-analogen, chemische en enzymatische modificaties en het gebruik van specifieke probes die met lipiden binden. Het verder ontwikkelen van methoden waarmee we de aanwezigheid en translocatie van specifieke lipiden kunnen bepalen is zeker een noodzaak om onze kennis over lipiden te kunnen uitbreiden. In hoofdstuk 3 hebben we gebruikt gemaakt van lipide-analogen om te onderzoeken of het multi drug resistentie eiwit MRP1, een lid van de ABC-familie van membraan transporters aanwezig in de basolaterale membraan van epitheelcellen, betrokken is bij lipide translocatie. De epitheliale cellijn LLC-PK1 werd getransfecteerd met MRP1, waarna de cellen de lipide analoog C_6-NBD-ceramide aangeboden kregen. In de cel wordt deze analoog omgezet in C_6-NBD-glucosylceramide en C_6-NBD-sphingomyeline. Vervolgens hebben we geanalyzeerd hoeveel van deze lipiden in de buitenste laag van de plasma membraan terecht zijn gekomen onder omstandigheden dat er geen transport middels blaasjes kan plaats vinden. In vergelijking met ongetranfecteerde cellen zagen we een duidelijke verhoging van het transport van zowel C_6-NBD-glucosylceramide als C_6-NBD-sphingomyeline. Dit transport was gevoelig voor indomethacine en andere remmers van het MRP1-eiwit en afhankelijk van de cellulaire concentratie van glutathion. Geen transport van C_6-NBD-phospatidylcholine en C_6-NBD-phosphatitylethanolamine werd gemeten. Op basis hiervan hebben we geconcludeerd dat MRP1 de eerste twee lipide-analogen wel

herkend en transloceerd, terwijl de laatste twee geen goede substraten zijn voor dit eiwit. Het is echter wel van belang om te realiseren dat we hier gebruik hebben gemaakt van analogen en dat verder onderzoek nodig is om te onderzoeken of natuurlijke lipiden ook door het MRP1-eiwit worden herkend. Op basis van de resultaten in Hoofdstuk 5 en 6 lijkt het er in ieder geval op dat MRP1 niet betrokken is bij het transport van natuurlijk glucosylceramide en het kort-keten lipide platelet-activating factor.

In Hoofdstuk 4 hebben we een methode ontwikkeld om natuurlijk glucosylceramide specifiek in één laag van een lipide-bilaag te kunnen meten. Met behulp deze methode is het mogelijk om glucosylceramide aanwezig in de buitenste membraanlaag van zogenaamde Large Unilamellar Vesicles (LUV's) te meten door het te laten reageren met carboxy-TEMPO radicalen, terwijl het glucosylceramide in de binnenste laag niet reageert. Helaas is deze methode in de huidige vorm niet toepasbaar op cellen en zal de assay moeten worden geoptimalizeerd voor gebruik op "echte" cellen. Deze methode biedt in principe wel de mogelijkheid om, in een systeem waarin een kandidaat lipide translocator is gereconstrueerd in een artificieel membraan, te onderzoeken of dit eiwit onder die omstandigheden glucosylceramide kan transporteren.

Mijn voorganger, Ardy van Helvoort, heeft laten zien dat het humane MDR1 Pgp eiwit in staat is om verschillende lipide-analogen en radioactieve kort-keten lipiden, waaronder C_6-NBD-glucosylceramide en C_6-glucosylceramide, te transloceren. In hoofdstuk 5 is het transport van natuurlijk glucosylceremide onderzocht in muis knock-out cellen. Deze cellen brengen geen functioneel Mdr1a/1b Pgp en Mrp1 tot expressie. Zoals verwacht transporteren deze cellen nog nauwelijk C_6-NBD-glucosylceramide, C_6-NBD-sphingomyeline, C_6-NBD-phosphatidylcholine en C_6-NBD-phosphatidylethanolamine onder omstandigheden dat er geen transport via blaasjes kan plaatsvinden. Interessant was de waarneming dat de knock-out cellen veel minder natuurlijk glucosylceramide bevatten dan de controle cellen, die wel Mdr1a/1b Pgp en Mrp1 tot expressie brengen. Uit de experimenten is gebleken dat dit niet te wijten was aan een verschil in synthese van het glucosylceramide, maar door een verschil in afbraak van dit lipide. Terwijl in de controle cellen glucosylceramide werd afgebroken door de CBE-gevoelige lysosomale glucocerebrosidase, werd in de knock-out cellen een groot gedeelte afgebroken door de P21-gevoelige non-lysosomale glucocerebrosidase. Dit suggereert dat glucosylceramide in de knock-out cellen op een andere plaats wordt afgebroken dan in de controle cellen. Transfectie van de knock-out cellen met MDR1 Pgp, maar niet met MRP1, veranderde het mechanisme van afbraak van de non-lysosomale glucocerebrosidase naar de lysosomale glucocerebrosidase. Met behulp van een enzymatische assay voor glucosylceramide hebben we vervolgens de eerste aanwijzingen gekregen dat de afwezigheid van Mdr1a/1b Pgp in de knock-out cellen het transport van glucosylceramide naar de buitenste laag van de plasma membraan verhinderd. Transfectie van de cellen met MDR1 Pgp herstelde het transport naar het oppervlakte van de cel. Deze experimenten suggereren een rol voor MDR1 Pgp in het transport van natuurlijk glucosylceramide naar het oppervlakte van deze cellen. Verder onderzoek zal moeten aantonen of MDR1 Pgp het transport van glucosylceramide uitvoert, of dat het eiwit indirekt betrokken is bij de organisatie van glucosylceramide in de plasma membraan.

In hoofdstuk 6 hebben we bestudeerd of een ander lipide, platelet-activating factor (PAF), een substraat is van MDR1 Pgp of MRP1. PAF is een kortketen lipide en lijkt qua structuur op de verschillende lipide-analogen die in eerdere studies aan MDR1 Pgp en MRP1 zijn gebruikt. Gebruik makend van LLC-PK1 cellen getransfecteerd met

MDR1 Pgp of MRP1, hebben we gevonden dat PAF wel een substraat is van MDR1 Pgp, maar niet van MRP1. PAF is een lipide dat betrokken is bij een groot aantal cellulaire processen. Een hoge expressie van MDR1 Pgp, bijvoorbeeld in het multidrug resistance phenotype in kanker, zou dus kunnen leiden tot een verhoogd transport van PAF naar de oppervlakte van een cel, en op die manier effect hebben op een groot aantal cellulaire processen. Een onderzoek gericht op deze mogelijke fysiologische rol van MDR1 Pgp zou hier meer licht op kunnen werpen.

Wat hebben we nu geleerd in die vier jaar? Ik zelf heb gepoogd te leren hoe je onderzoek uitvoert, hoe je op basis van experimenten een werkhypothese kan vormen en hoe je vervolgens experimenten ontwikkeld om de hypothese te toetsen. Ik heb, middels het lezen van honderden wetenschappelijke artikelen, geleerd hoe we denken dat de cel er uit zou kunnen zien. Ik heb ook begrepen dat we nog maar slechts aan de vooravond staan van ons begrip van een cel, laat staan van een organisme en dat we domweg de technieken (nog) niet in huis hebben om bepaalde vragen op te lossen. In de afgelopen vier jaar heb ik me toegelegd op slecht een onderdeeltje van de cel, de lipiden. Binnen dit onderdeel heb ik me vervolgens weer direkt bezig gehouden met een speciale klasse van lipiden, de sphingolipiden. En zelfs dat is teveel omvattend, eigenlijk heb ik me voornamelijk bezig gehouden met één lipide, glucosylceramide. Het is, ook voor mezelf, opmerkelijk, dat iemand zich vier jaar volop kan bezighouden met één type molecuul in een cel, die misschien wel een miljoen verschillende moleculen bevat. Nu is het natuurlijk wel zo dat we dat ene lipide niet als een losstaand onderdeel hebben beschouwd, maar hebben gebruikt als een modelsysteem. We hebben geprobeerd dat ene stofje te begrijpen, zodat we misschien met die kennis andere lipiden ook zouden kunnen begrijpen. Maar begrijpen we nu alles van dat ene lipide? Nee, eigenlijk geldt hier ook weer dat we nog maar net begonnen zijn met het begrip van hoe dat lipide werkt. Wetenschap is een lange weg van trial and error, pogingen, mislukkingen en successen. Ik denk dat ik mag zeggen dat we een stapje vooruit hebben kunnen zetten. Vier jaar geleden verliet mijn voorganger Ardy van Helvoort het laboratorium met het idee dat glucosylceramide wel eens door een eiwit, MDR1 Pgp, van de ene kant van de lipide membraan naar de andere kant zou kunnen worden gepompt. Vier jaar, en honderden experimenten later, denken we dat we dat hebben kunnen laten zien. De implicaties van deze conclusie is dat we geheel nieuwe idëeen hebben gevormd hoe het lipide door de cel beweegt en zou kunnen functioneren. Met deze idëeen verlaat ik het laboratorium, maar nieuwe mensen in het laboratorium zullen zich met deze nieuwe theoriëen bezig gaan houden.