

## University of Groningen

### Small heat shock proteins

Vos, Michel

**IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.**

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

2009

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Vos, M. (2009). *Small heat shock proteins: Implications for neurodegeneration & longevity*. s.n.

**Copyright**

Other than for strictly personal use, 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), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

**Take-down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

*Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.*

# APPENDIX **X**<sub>1</sub>

## Nederlandse samenvatting

## Inleiding

Alle levende organismen zijn onderhevig aan biologische veroudering, wat gekenmerkt wordt door het minder goed functioneren van lichaam en geest. Dit is voornamelijk zichtbaar in dieren, maar ook kleinere organismen zoals gisten en bacteriën vertonen verouderingsverschijnselen. De basis van biologische veroudering is een toename van schade in de bouwstenen die samen het organisme vormen; de cellen. Dit omvat onder meer schade aan het cellulaire DNA (desoxyribonucleïnezuur, het erfelijke materiaal van de cel) en schade aan cellulaire eiwitten die celstructuur, transport, communicatie en regulatie voor hun rekening nemen. Hierdoor zijn cellen minder efficiënt in het uitvoeren van hun functies en kunnen ze afsterven.

Naast de “normale” verouderingsverschijnselen zijn er specifieke aandoeningen die al vanaf de geboorte aanwezig zijn maar die zich pas op latere leeftijd openbaren. Het betreft hier aandoeningen die veroorzaakt worden door veranderingen of mutaties in het cellulaire DNA en die leiden tot problemen met de vouwing van het eiwit dat wordt gecodeerd door het gemuteerde gen. Deze zogenaamde eiwitmisvouwingsziektes leiden veelal tot hersenziektes die tot uiting kunnen komen door het minder goed functioneren van cellen op latere leeftijd. Deze ziektes worden ondermeer gekenmerkt door het vroeger tot uiting komen in vergelijking met niet-erfelijke vormen van ouderdomsziekten, zoals de ziekte van Alzheimer of de ziekte van Parkinson.

## Eiwitvouwing

Zoals hiervoor al is beschreven, zijn eiwitten betrokken bij diverse cellulaire processen. Echter, een goed functionerend eiwit ontstaat niet spontaan. Eerst moet er een kopie worden gemaakt van het op het DNA gelegen gen, dat codeert voor het desbetreffende eiwit. Dit kopie wordt gemaakt in RNA (ribonucleïnezuur), wat vervolgens wordt afgelezen en vertaald in een lange keten van aminozuren; de bouwstenen van eiwitten. Vervolgens wordt deze lange keten gevouwen tot een drie dimensionaal eiwit, wat zijn functie in de cel kan vervullen.

Het correct vouwen van een aminozuurketen zou veelal spontaan kunnen verlopen, maar cellen zitten zo vol met andere eiwitten en moleculen dat dit vouwingsproces begeleid moet worden door “bodyguards”, een groep eiwitten die moleculaire chaperonnes worden genoemd. Door interacties met deze chaperonnes wordt klontering van eiwitten met elkaar voorkomen, zodat uiteindelijk een actieve vorm van het eiwit verkregen wordt. Chaperonnes zijn echter niet alleen betrokken bij het vouwen van nieuwe eiwitten. Ook bestaande eiwitten kunnen lokaal ontvouwen, wat tot functieverlies kan leiden en ongewilde interacties met andere eiwitten te weeg kan brengen. Ook hier bieden chaperonnes hulp door ofwel deze beschadigde eiwitten te helpen hervouwen of door te helpen deze af te breken. Hierdoor wordt het gevaar van eiwitklontering voorkomen en blijft de cel gezond.

Veroudering gaat ondermeer gepaard met mutaties in het cellulaire DNA, waardoor er veranderingen in de aminozuursequentie kunnen ontstaan. Hierdoor ontstaan er eiwitten die problemen kunnen ondervinden om tot een actieve structuur te vouwen. Veroudering gaat dus gepaard met een toename aan moeilijk te vouwen eiwitten en daarmee een verhoogde vraag naar chaperonne activiteit.

Het is dit stadium waarin ook andere “verborgen” mutaties tot uiting kunnen komen in het functioneren van de cel. Het betreft hier eiwitten die reeds het gehele leven afhankelijk zijn geweest van extra chaperonne activiteit, maar door de extra vraag naar chaperonne activiteit door steeds meer beschadigde eiwitten, nu niet meer correct gevouwen kunnen worden. Daarnaast is, zoals al gezegd, het chaperonne systeem ook betrokken bij afbraak van niet goed functionerende eiwitten. Ook dit proces komt langzamerhand onder druk te staan wanneer een verouderend organisme meer aanspraak moet doen op het chaperonne systeem om het correct functioneren

van zijn cellen te waarborgen. Tegelijkertijd kunnen er fouten ophopen in de DNA dat codeert voor de chaperonnes, waardoor er minder of minder goed functionerende chaperonnes worden gemaakt. De combinatie van dit alles leidt tot een verstoring in de balans van eiwit vouwing (eiwithomeostase) waardoor eiwitklontering in cellen ontstaat en cellen hun functie gaan verliezen en vervolgens afsterven.

## **HSPB chaperonnes**

Een van de chaperonne families zijn de “small heat shock proteins” of HSPB chaperonnes. Deze eiwitten worden gekenmerkt door hun kleine massa in vergelijking met de andere chaperonne families. Verder is bekend dat een aantal HSPB eiwitten zeer effectief is in het voorkomen van ongewenste eiwit-eiwit interacties en het afschermen van ontvouwen gedeeltes van een aminozuurketen. In samenwerking met de HSPA chaperonnes kan vervolgens een ontvouwen eiwit worden hervouwen of worden afgebroken (Hoofdstuk 1). Het beschreven onderzoek in dit proefschrift richt zich op deze HSPB eiwitten en hun rol in eiwit vouwing, het voorkomen van eiwit aggregatie en positieve effecten op veroudering.

### ***HSPB7 en splicing speckles***

Het DNA van de mens codeert voor elf van deze HSPB eiwitten (HSPB1-HSPB11), waarvan er maar een aantal goed zijn bestudeerd. Door te kijken waar deze HSPB eiwitten zich in een cel bevinden krijgen we een idee over eventuele functionele eigenschappen in relatie tot celcompartimenten (Hoofdstuk 3). Ook verschil in lokalisatie tussen normale condities en condities van eiwitontvouwing kan informatie geven over functies. Een opmerkelijke HSPB eiwit, qua lokalisatie, is HSPB7. Deze chaperonne bleek onder niet-stress condities geassocieerd te zijn met een onderdeel van de celkern, waar tot nu toe alleen HSPB eiwitten voornamelijk werden aangetroffen tijdens omstandigheden van massale eiwitontvouwing. Deze zogenaamde SC35 splicing speckles fungeren als een verzamelplaats voor eiwitten betrokken in het moduleren van RNA, alvorens dit wordt vertaald in aminozuren. Het moduleren betreft het verwijderen van niet relevante gedeeltes van het RNA wat wordt aangeduid als splicing, of splitsen. Hoewel de rol van HSPB7 in SC35 splicing speckles en het splicing proces nog niet kon worden ontrafeld, ontdekten we wel welk gedeelte van HSPB7 nodig is voor lokalisatie naar deze SC35 structuren. Deze signaal sequentie, te vergelijken met een postcode, bevindt zich in het NH<sub>2</sub>-terminale gedeelte van het eiwit (wanneer een eiwit wordt vertaald vanuit RNA, gebeurt dit van de NH<sub>2</sub> uiteinde naar de COOH-uiteinde) (Hoofdstuk 3). en blijkt in geen enkel ander HSPB eiwit voor te komen, ook niet in HSPB eiwitten die bekend zijn voor hun SC35 splicing speckle lokalisatie tijdens eiwit ontvouwing. De signaal sequentie in HSPB7 blijkt uniek en voldoende te zijn om ook andere eiwitten naar SC35 splicing speckles te transporteren. Deze sequentie lijkt verder niet essentieel voor de chaperonne-achtige functies van HSPB7 (Hoofdstuk 4) en lijkt daarom meer te dienen als middel om de HSPB7 functie te brengen naar plekken (SC35 speckles) waar deze functie gewenst is.

### ***HSPB7 en anti-aggregatie***

Naast het analyseren van de lokalisatie van HSPB eiwitten, hebben we ook onderzoek gedaan naar hun individuele capaciteit in het chaperonneren van andere eiwitten. Hiervoor hebben we twee model eiwitten (substraten) bekeken. Het eerste model eiwit is luciferase, een bioluminescent (lichtgevend) eiwit afkomstig van de vuurvlieg. Dit eiwit ontvouwt snel wanneer cellen worden blootgesteld aan temperaturen boven 40°C. Verder is bekend dat met hulp van sommige chaperonnes (vooral van de HSPA groep) luciferase kon hervouwen wanneer de temperatuur weer wordt verlaagd naar 37°C. Verassend genoeg bleek maar een aantal van de HSPB

eiwitten de hervouwing van luciferase te kunnen helpen. De meest actieve “hervouwers” waren HSPB1, HSPB4 en HSPB5, terwijl bijvoorbeeld HSPB7 en HSPB9 dit in het geheel niet konden (Hoofdstuk 4).

Het tweede type substraat betreft eiwitten die betrokken zijn bij een van de vormen van erfelijke ouderdoms gerelateerde eiwitmisvouwingsziekten, de zogenaamde polyQ eiwitten. De term polyQ slaat op een herhaling van het aminozuur genaamd glutamine (afgekort tot Q) in een eiwit. Deze polyQ sequentie komt in veel eiwitten voor maar het is niet precies bekend wat de functie van deze sequentie is. In eiwitmisvouwingsziekten is deze polyQ sequentie sterk verlengd waardoor het eiwit heel snel klontert. Hierdoor gaan cellen eerst disfunctioneren, gevolgd door afsterving. De ziekte van Huntington (HD) en Machado-Joseph disease (MJD of SCA3) zijn bekende voorbeelden waar de polyQ expansie zich bevindt in respectievelijk het huntingtin of ataxin-3 eiwit. Wanneer we nu de HSPB eiwitten testten voor hun capaciteit in het reduceren van polyQ aggregatie, bleken HSPB9 en vooral HSPB7 zeer effectief te zijn (Hoofdstuk 4). HSPB1, HSPB4 en HSPB5 als hervouwers waren nauwelijks actief. Het blijkt dus dat er binnen de HSPB groep van eiwitten specialisatie is opgetreden, waarbij sommige HSPB eiwitten begeleiders zijn van de (her)vouwing processen, terwijl andere HSPB eiwitten er voor zorgen dat niet-vouwbare eiwitten niet klonteren en worden afgebroken. Hoe dit laatste plaatsvindt is vooralsnog niet helder. Verder onderzoek naar de functie van de beste voorkomer van polyQ aggregatie, HSPB7, toonde aan dat dit niet direct gerelateerd lijkt te zijn aan de lokalisatie in de eerder genoemde SC35 splicing speckles. Wel bleek dat, waar HSPB-hervouwers samenwerken met leden van de HSPA familie van chaperones, de activiteit van HSPB7 HSPA-onafhankelijk was. Verder bleek dat de HSPB7 werking sterk afnam wanneer in cellen autofagie, een proces voor opruiming van beschadigde celonderdelen, werd uitgeschakeld terwijl het proces voor afbraak van individuele eiwitten (via het zogenaamde proteasome systeem) geen rol hierin lijkt te spelen.

## **HSPB eiwitten en veroudering**

Door gebruik te maken van het feit dat kleine heat shock eiwitten verschillende chaperonne activiteiten laten zien (hervouwing en/of anti-aggregatie), kon worden onderzocht welk type eiwit-ondersteunende activiteit de grootste hulp kan leveren aan verouderende cellen. Het eiwithomeostase model veronderstelt dat beide types van activiteiten veroudering zou moeten beïnvloeden. Om dit model te testen maakten we gebruik van de fruitvlieg, omdat dit organisme relatief kort leeft en omdat volwassen fruitvliegen voornamelijk bestaan uit niet-delende cellen net als hersencellen, waarin de eiwitmisvouwingsziekten zich met name manifesteren. Allereerst werd onderzocht of, net als de humane HSPB eiwitten, ook de fruitvlieg familie van kleine heat shock eiwitten onderverdeeld kunnen worden in eiwitvouwers en anti-aggregatie eiwitten; deze diversiteit in activiteiten bleek inderdaad ook te bestaan in fruitvliegen (Hoofdstuk 5). Op basis hiervan hebben we vervolgens fruitvliegen genetisch aangepast zodat ze een van de kleine heat shock eiwitten met een van deze activiteiten verhoogd in hun weefsels aanwezig hebben. Beide types activiteiten bleken inderdaad in staat om de fruitvliegen langer te laten leven, hetgeen de belangrijke rol van eiwithomeostase in gezond ouder worden verder ondersteund.