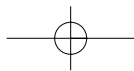
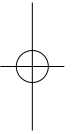
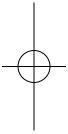


Nederlandse Samenvatting



Samenvatting

Onze atmosfeer bestaat voor 21% uit zuurstof en dit maakt het voor organismen die zuurstof gebruiken (aërobe levensvormen) mogelijk om te overleven. Zo consumeert het menselijk lichaam zuurstof en vele cruciale lichaamsfuncties kunnen zelfs niet langer dan een paar minuten zonder zuurstof overleven. Zuurstof die we inademen wordt in het bloed opgenomen en vervolgens via het bloed naar alle organen vervoerd. Organen zijn opgebouwd uit weefsel en weefsels bestaan op hun beurt uit cellen. Cellen zijn de kleinste functionele eenheden van een weefsel die de eigenschappen van dat weefsel bezitten. Vanuit het bloed wordt zuurstof in de lichaamscellen opgenomen en in de cel wordt zuurstof vervolgens omgezet tot water, waarbij energie vrijkomt. Bij deze omzettingen van zuurstof naar water worden er echter ook reactieve tussenproducten gevormd, die we vrije *zuurstofradicalen* noemen. Radicalen zijn moleculen met een of meerdere ongepaarde electronen (negatief geladen deeltjes) en door deze ongepaarde electronen zijn radicalen erg reactief. Door reactie van radicalen met andere moleculen (oxidatie) kunnen er nieuwe radicalen worden gevormd en op deze manier kunnen er kettingreacties ontstaan van radicaalproductie. In de cel kunnen zuurstofradicalen reageren met (en daarmee schade aanrichten aan) DNA (genetisch materiaal), lipiden (vetten) en eiwitten, wat grote gevolgen kan hebben voor het functioneren van de cel.

Zuurstofradicalen worden niet alleen tijdens normaal (aëroob) celmetabolisme gevormd, maar ook tijdens ontstekingsreacties. Ontstekingscellen maken zuurstofradicalen die ze gebruiken om indringers, zoals bacteriën, te doden. Door lekkage van zuurstofradicalen uit de ontstekingscellen worden omliggende cellen blootgesteld aan deze radicalen en kunnen hierdoor worden beschadigd. Daarnaast zijn er ook een aantal omgevingsfactoren, zoals ultraviolet licht en sigarettenrook, die in lichaamscellen de productie van radicalen verhogen.

Als cellen worden blootgesteld aan een verhoogde concentratie van zuurstofradicalen dan noemen we dit *oxidatieve stress*. Ter bescherming tegen zuurstofradicalen bevatten cellen een aantal afweersystemen, die we *antioxidante afweermechanismen* noemen. Zo heeft elke cel een aantal antioxidantenzymen, die de reactieve zuurstofradicalen omzetten in niet-reactieve stoffen. Daarnaast zijn er antioxidanten of vitaminen die we voornamelijk via ons voedsel binnen krijgen en die de cel beschermen tegen schadelijke zuurstofradicalen. Onder normale omstandigheden is er in de cel een balans tussen enerzijds de productie van radicalen en anderzijds de antioxidantemechanismen. Echter, als deze balans wordt verstoord, bijvoorbeeld door een overproductie van radicalen of door het niet optimaal functioneren van de antioxidantemechanismen, kan dit leiden tot oxidatieve stress. De laatste jaren is uit onderzoek gebleken dat oxidatieve stress een rol speelt in een aantal ziektes, zoals atherosclerose

(vaatvernauwing door aderverkalking), chronische ontstekingsreacties, kanker, neurologische degeneratieve processen zoals Alzheimer en in verouderingsprocessen. Daarom is het van belang te onderzoeken wat de effecten van oxidatieve stress op de cel zijn en of we deze effecten, bijvoorbeeld door het toedienen van antioxidanten, kunnen tegengaan.

In dit proefschrift zijn een aantal effecten van oxidatieve stress op het niveau van eiwitten beschreven. Daarnaast zijn er twee methoden (*assays*) ontwikkeld die gebruikt kunnen worden om de beschermende werking van antioxidanten te kunnen testen. Er is vooral gekeken naar de effecten van oxidatieve stress op eiwitten die betrokken zijn bij *signaaltransductie*. Signaaltransductie is de overdracht van een signaal van buiten de cel naar binnenin de cel. Deze signaaloverdracht is van groot belang voor de onderlinge communicatie tussen cellen en kan bijvoorbeeld plaatsvinden door middel van *signaalstoffen* die door de ene cel worden geproduceerd en uitgescheiden en door andere cellen als het ware worden ontvangen. Voorbeelden van zulke signaalstoffen zijn *hormonen* en *groefactoren* die door gespecialiseerde cellen worden gemaakt en uitgescheiden en zich vervolgens in het bloed en tussen de cellen bevinden. Vervolgens kunnen de signaalstoffen aan specifieke cellulaire eiwitten binden, die we *receptoren* noemen. Deze receptoren steken dwars door het omhulsel van de cel, de celmembraan, heen en door binding van signaalstoffen worden de receptoren geactiveerd en geven op deze manier het signaal door van de buitenkant van de cel naar de binnenkant. Vervolgens wordt het signaal in de cel via allerlei interacties van eiwitten doorgegeven naar de celkern, waar zich het DNA bevindt. Afhankelijk van het signaal dat van buitenaf gegeven was worden er bepaalde genen geactiveerd en dit leidt uiteindelijk tot een cellulaire respons, zoals proliferatie (celdeling) of differentiatie (specialisatie van de cel). Daarnaast kan de cel ook "besluiten" dat het beter is om dood te gaan en kan dan tot geprogrammeerde celdood (apoptose) overgaan. Dit laatste proces speelt bijvoorbeeld een belangrijke rol bij verouderingsprocessen.

Een van de eiwitten die een centrale rol speelt bij deze signaaltransductie of signaaloverdracht is *Mitogen-Activated Protein (MAP) kinase*. In **hoofdstuk 2** beschrijven we dat MAP kinase niet alleen wordt geactiveerd als cellen worden blootgesteld aan groefactoren (signaalstoffen), maar ook als cellen worden blootgesteld aan oxidatieve stress. Deze oxidatieve stress wordt veroorzaakt doordat we van buitenaf *waterstofperoxide* (H_2O_2) aan de cellen hebben gegeven. Waterstofperoxide kan over de celmembraan diffunderen en binnen in de cel de productie van vrije zuurstofradicalen induceren, wat leidt tot oxidatieve stress. Deze activatie van MAP kinase tijdens oxidatieve stress hebben we daarna gebruikt om een assay te ontwikkelen waarin de activatie van MAP kinase door oxidatieve stress wordt gemeten in cellen. Deze assay is vervolgens toegepast om de beschermende werking van antioxidanten te meten, die van buitenaf aan de cellen werden toegevoegd.

Vervolgens zijn we gaan kijken naar effecten van oxidatieve stress op het functioneren van een bepaalde groeifactor receptor, de *epidermale groeifactor (EGF) receptor*. Onder normale omstandigheden leidt blootstelling van cellen aan EGF tot binding van EGF aan de EGF receptor, die zich in de celmembraan bevindt. Dit leidt tot activatie van de EGF receptor en tot signaaloverdracht van buiten naar binnen in de cel zoals hierboven is beschreven. Het is van groot belang dat de activatie van de EGF receptor goed wordt gereguleerd en dat de receptor op een gegeven moment weer wordt geïnactiveerd om de signaaloverdracht te stoppen. Eén van de manieren die de cel heeft om de signaaltransductie als het ware uit te doven is door de geactiveerde receptoren naar binnen te sluisen en vervolgens af te breken. Dit proces wordt ook wel "*receptor-gemedieerde endocytose*" genoemd en het naar binnen sluisen, wat dus een onderdeel is van dit endocytose proces, noemen we "*internalisatie*". Door opname/internalisatie van receptoren in de cel neemt het aantal receptoren aan de celmembraan af en daarmee het aantal bindingsplaatsen voor EGF en dit resulteert in uitdoving van EGF receptor signalering. Deze receptor-gemedieerde endocytose is belangrijk, omdat bekend is dat een remming van dit proces tumorvorming tot gevolg kan hebben.

In **hoofdstuk 3** is beschreven dat de internalisatie van de EGF receptor wordt geremd tijdens oxidatieve stress (geïnduceerd door waterstofperoxide). Om hiervoor een verklaring te vinden hebben we vervolgens gekeken naar een aantal stappen die plaatsvinden vòòr receptor internalisatie. Uit deze studies bleek dat er tijdens oxidatieve stress wel normale binding van EGF aan de EGF receptor plaatsvindt en dat fosforylatie van de EGF receptor (een modificatie die normaal plaatsvindt na EGF stimulatie en die betrokken is bij het doorgeven van het signaal) niet is geremd. Ditzelfde geldt voor fosforylatie van Eps15, een eiwit dat na EGF stimulatie aan geactiveerde EGF receptoren bindt en een essentiële rol speelt bij de internalisatie van de EGF receptor. Naast fosforylatie wordt Eps15 tevens gemodificeerd door een klein eiwit, ubiquitine, dat door bepaalde eiwitten (*ubiquitineringsenzymen*) aan Eps15 wordt "geplakt", een proces dat *ubiquitinerings* wordt genoemd. Deze ubiquitinerings van Eps15 bleek wel geremd te worden tijdens oxidatieve stress. Tot nog toe is de rol van ubiquitinerings in de internalisatie van de EGF receptor niet bekend. Vanuit de literatuur is echter wel bekend dat ubiquitinerings van bepaalde eiwitten nodig is voor endocytose van een aantal andere receptoren en ubiquitine zou een "trigger" zijn voor internalisatie. Daarom hebben we aan het eind van hoofdstuk 3 gesuggereerd dat de internalisatie van de EGF receptor mogelijk wordt geremd tijdens oxidatieve stress door remming van de ubiquitinerings van eiwitten die betrokken zijn bij EGF receptor internalisatie.

De effecten van oxidatieve stress op de internalisatie van de EGF receptor die in hoofdstuk 3 zijn beschreven, zijn voor een groot gedeelte bestudeerd met radioactief gelabeld EGF. Om de effecten van verscheidene condities en/of stoffen op de internalisatie te meten is het natuurlijk prettiger als dit niet radioactief hoeft te gebeuren. Daarom hebben

we in **hoofdstuk 4** een assay ontwikkeld om op een niet-radioactieve manier de internalisatie van de EGF receptor te meten. Met deze assay werden resultaten behaald die vergelijkbaar waren met resultaten die met radioactiviteit werden gemeten. Daarom is deze nieuw ontwikkelde assay een betrouwbare methode om EGF receptor internalisatie te meten en kan in de toekomst worden gebruikt om de effectiviteit van antioxidanten te testen die bescherming bieden tegen de remming van EGF receptor internalisatie.

Vervolgens zijn we in **hoofdstuk 5** iets dieper op het mechanisme ingegaan dat mogelijk verantwoordelijk is voor de remming van EGF receptor internalisatie. In dit hoofdstuk beschrijven we dat oxidatieve stress (wederom geïnduceerd door waterstofperoxide) niet alleen de ubiquitineren van Eps15 remt, maar ook de ubiquitineren van de EGF receptor zelf. Uit recent gepubliceerde studies is gebleken dat zowel de ubiquitineren van Eps15 als van de EGF receptor plaatsvindt aan de plasma membraan, dus vòòr internalisatie. Dit suggereert een mogelijke rol van ubiquitineren in EGF receptor internalisatie. Vervolgens hebben we onderzocht of de remmende effecten van oxidatieve stress worden opgeheven als cellen niet langer aan deze stress worden blootgesteld. Met andere woorden: er is onderzocht of de effecten *reversibel* zijn en herstellen na verwijdering van waterstofperoxide. Hieruit bleek dat de ubiquitineren van de EGF receptor en Eps15 inderdaad herstelden en dat totaal herstel ± 20 minuten na verwijdering van waterstofperoxide werd bereikt. Ook de internalisatie van de EGF receptor bleek reversibel met een compleet herstel na ± 30 minuten. Omdat de ubiquitineren eerder herstelde dan de internalisatie was dit wederom een aanwijzing dat ubiquitineren mogelijk nodig is voor EGF receptor internalisatie.

Het is bekend dat zuurstofradicalen gemakkelijk *sulfydryl/SH* groepen kunnen oxideren. Vele eiwitten bevatten SH groepen die betrokken kunnen zijn bij o.a. de activatie van deze eiwitten. Oxidatie van deze SH groepen kan daarom een effect hebben op de activiteit van zo'n eiwit en dit kan weer grote gevolgen hebben voor het goed functioneren van de cel. Om te onderzoeken of intacte SH groepen ook een rol spelen in EGF receptor internalisatie hebben we cellen behandeld met een stof die alle SH groepen uitschakelt. Het bleek dat onder deze omstandigheden de internalisatie werd geremd en dit geeft dus aan dat intacte SH groepen nodig zijn voor EGF receptor internalisatie.

Een van de grootste bronnen van SH groepen in de cel is glutathione. Glutathione kan in twee vormen voorkomen, de geoxideerde vorm (GSSG) en de gereduceerde (niet-geoxideerde) vorm (GSH). Onder normale omstandigheden is de hoeveelheid GSSG in de cel erg laag en is GSH in overmaat aanwezig. De cellulaire ratio GSSG:GSH blijkt ook belangrijk voor het goed verlopen van een groot aantal cellulaire processen en daarom zal de cel ernaar streven om deze ratio zo klein mogelijk te houden. Uit onze studies blijkt de ratio GSSG:GSH tijdens oxidatieve stress behoorlijk snel toe te nemen. Echter, als de oxidatieve stress wordt verwijderd treedt er binnen 10-20 minuten een compleet herstel op

van deze veranderde ratio. Dit herstel gaat dus vooraf aan compleet herstel van EGF receptor internalisatie. Vanuit de literatuur is bekend dat een toename in de ratio GSSG:GSH tijdens oxidatieve stress gepaard kan gaan met een remming van ubiquitinerings van eiwitten en dat de activiteit van ubiquitineringsenzymen waarschijnlijk door de GSSG:GSH ratio wordt gereguleerd. Dit komt dus sterk overeen met de resultaten van ons onderzoek.

Alle feiten uit dit hoofdstuk op een rij:

1. Oxidatieve stress (geïnduceerd door waterstofperoxide) verhoogt reversibel de cellulaire GSSG:GSH ratio met een compleet herstel na \pm 10-20 minuten
2. Oxidatieve stress remt reversibel de ubiquitinerings van de EGF receptor en van Eps15 met herstel na \pm 20 minuten
3. Oxidatieve stress remt reversibel EGF receptor internalisatie met compleet herstel na \pm 30 minuten
4. Intacte SH groepen zijn nodig voor EGF receptor internalisatie
5. Ubiquitineringsenzymen hebben functionele SH groepen die betrokken zijn bij hun activiteit
6. Ubiquitinerings is betrokken bij de internalisatie van een aantal andere receptoren (literatuur)

Deze feiten hebben vervolgens tot het volgende model geleid:

1. Tijdens oxidatieve stress wordt de cellulaire ratio GSSG:GSH verhoogd
2. GSSG reageert vervolgens met SH groepen om de cellulaire ratio GSSG:GSH weer lager te krijgen
3. Reactie van GSSG met SH groepen van ubiquitineringsenzymen leidt tot inactivatie van deze enzymen
4. Hierdoor wordt de ubiquitinerings van eiwitten die betrokken zijn bij EGF receptor internalisatie geremd
5. Dit alles leidt uiteindelijk tot een remming van de internalisatie van de EGF receptor

Een schematische tekening van dit model is te zien in de discussie van hoofdstuk 5.

Het is duidelijk dat dit een model is dat in de toekomst verder uitgewerkt en bewezen moet worden. Als er eenmaal bekend is wat het mechanisme precies is, kan er ook doelgericht naar antioxidanten worden gezocht die de cel beschermen tegen de schadelijke effecten van zuurstofradicalen.

De zoektocht naar juiste (combinaties van) antioxidanten/vitamines vraagt erg veel onderzoek en is ingewikkelder dan het op het eerste oog lijkt. Het wordt namelijk steeds meer bekend dat zuurstofradicalen naast hun schadelijke effecten ook juist nodig zijn om de signaaloverdracht in de cel goed te laten verlopen. Het is daarom belangrijk om de effecten van antioxidanten op vele manieren en in vele cellulaire en andere biologische systemen te testen. Zo kunnen bepaalde antioxidanten bescherming bieden tegen bepaalde schadelijke effecten van zuurstofradicalen, maar tegelijkertijd zouden ze andere processen kunnen verstoren die nodig zijn voor het normaal functioneren van de cel. Daarom moet er gezocht

Samenvatting

worden naar antioxidanten die de schadelijke effecten van oxidatieve stress voorkomen, zonder het normale functioneren van de cel te beïnvloeden. Daarnaast is het uitermate belangrijk om te onderzoeken wat nu precies de effecten van zuurstofradicalen in de cel zijn. Hierbij moeten we op zoek naar zowel de schadelijke effecten als de "normale" cellulaire processen waar zuurstofradicalen bij betrokken zijn. Op deze manier kunnen we er in de (verre) toekomst misschien achter komen wat er precies gebeurt bij processen als veroudering, het ontstaan van kanker en Alzheimer en kan er doelgericht ingegrepen worden. Misschien komt er dan een tijd dat we allemaal gezond oud kunnen worden!