



Universiteit
Leiden
The Netherlands

PIP2 as local second messenger: a critical re-evaluation

Rheenen, Jacobus Emiel van

Citation

Rheenen, J. E. van. (2006, January 11). *PIP2 as local second messenger: a critical re-evaluation*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4337>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

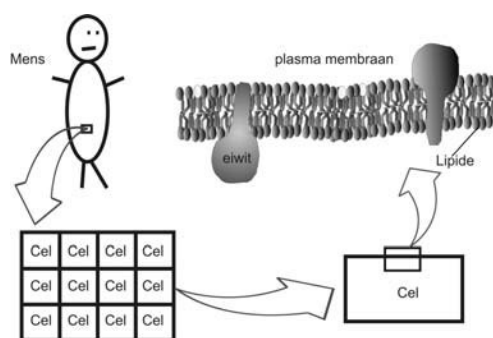
Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/4337>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Nederlandse samenvatting

Cell communicatie

Het lichaam bestaat uit miljarden cellen die continu met elkaar communiceren (Fig. 1). Deze communicatie is zeer belangrijk bij bijvoorbeeld de heling van een wond. Daarvoor moeten veel nieuwe cellen worden aangemaakt die zich vervolgens verplaatsen (**migreren**) in de wond. Cellen gaan pas delen en migreren, wanneer ze signalen hebben gekregen dat er een wond is. Het afgeven en ontvangen van deze signalen gaat bijna altijd goed. Hierdoor zullen wonden genezen. Helaas gaat het soms ergens in het lichaam mis en “denken” cellen dat ze moeten delen en migreren terwijl hun omgeving dit niet aangeeft. Wanneer cellen zich ongecontroleerd gaan delen en niet opgeruimd worden, ontstaat een tumor. Er is sprake van kanker, als deze zieke cellen naar andere plekken migreren (uitzaaien). Het is dus heel belangrijk om te bestuderen hoe een cel omgaat met signalen van haar omgeving.



Figuur 1, van mens tot plasma membraan. De mens bestaat uit miljarden cellen. Eén zo’n cel is opgebouwd uit veel verschillende bouwstenen (moleculen). Lipiden en eiwitten zijn belangrijke bouwstenen/moleculen voor de buitenste laag van de cel. Dit gedeelte van de cel noemen we de plasma membraan.

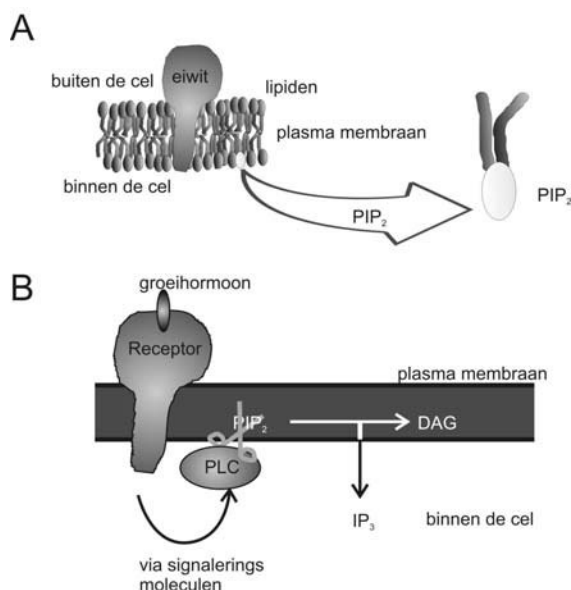
De cel en de plasma membraan

Een cel is opgebouwd uit veel hele kleine bouwstenen (moleculen). Het buitenste gedeelte van de cel, “**de plasma membraan**” (Fig. 1), is opgebouwd uit lipide bouwstenen (die zeep-achtige structuur hebben), en eiwit bouwstenen. De plasma membraan werkt zoals een grens van een land. Het bestuur van het land beslist wat wel en niet de grens over mag. Als de cel “beslist” iets uit de omgeving nodig te hebben, of juist iets kwijt te willen raken, dan laat de plasma membraan specifiek dat molecuul door.

Vroeger werd gedacht dat de lipide bouwstenen alleen maar belangrijk waren voor het opbouwen van de membraan. Tegenwoordig weten we dat sommige lipiden ook een rol spelen bij het doorgeven van signalen tussen de binnen- en buitenkant van de cel. Ze zijn bijvoorbeeld van belang bij de overdracht van wondsignalen, waarbij cellen moeten gaan delen en migreren.

PIP₂

In dit proefschrift is gekeken naar de lipide met de chemische naam Phosphatidyl-Inositol(4,5)biPhosphate. Om het makkelijk te houden wordt dit lipide ook wel **PIP₂** genoemd. PIP₂ heeft twee belangrijke functies. Ten eerste vormt het met andere lipiden en



Figuur 2, PIP₂. (A) Een schema van een stukje plasma membraan. Het plasma membraan bestaat uit eiwitten en een dubbele laag lipiden. PIP₂ (witte kop) is één van de vele soorten lipiden. (B). Bovendien is PIP₂ belangrijk bij het doorgeven van signalen. Wanneer een groei hormoon aan een receptor eiwit bindt wordt het eiwit PLC geactiveerd (aangezet). Dit eiwit knipt PIP₂ kapot waardoor DAG en IP₃ worden gevormd die op hun beurt weer vele processen in de cel activeren.

eiwitten de plasma membraan (Fig. 2A). Daarnaast is PIP₂ belangrijk voor het doorgeven van signalen. Wanneer bijvoorbeeld een wondsignaal herkend wordt door een **receptor** (een eiwit in de plasma membraan dat als een antenne “zoekt” naar signalen) in de plasma membraan, wordt vervolgens het eiwit Phospholipase C (**PLC**) geactiveerd (Fig. 2B). Dit PLC eiwit werkt als een soort schaar die PIP₂ kapot knipt, waardoor twee nieuwe signaalmoleculen ontstaan, DAG en IP₃. Deze activeren op hun beurt weer diverse processen in de cel. PIP₂ is dus een belangrijke voorloper van signaalmoleculen binnen de cel.

Er wordt echter door steeds meer wetenschappers gesuggereerd dat PIP₂ niet alleen maar een voorloper is van signaalmoleculen, maar dat PIP₂ misschien zelf ook kan functioneren als een signaalmolecuul. Maar hoe bewijs je dat?

Als PIP₂ inderdaad een signaalmolecuul is dan moet het voldoen aan de volgende signaal criteria;

1. het niveau van het PIP₂ moet kunnen veranderen.
2. deze verandering moet een reactie teweegbrengen.

Een goed voorbeeld van een signaal uit het dagelijks leven is het fluitsignaal van een voetbalscheidsrechter. Het niveau van het signaal kan veranderen: het is namelijk stil, totdat de scheidsrechter een beslissing neemt en fluit. Hierop wordt, als het goed is, gereageerd; het spel wordt bijvoorbeeld tijdelijk gestopt. Echter, als de spelers zich misdragen en ondanks het fluitsignaal door blijven gaan, kan een wedstrijd behoorlijk uit de hand lopen. Dit geldt ook voor cellen. Als cellen niet op sommige signalen reageren, of juist gaan reageren zonder een signaal kan dit leiden tot kanker.

Nu terug naar PIP₂. De plasma membraan bevat veel PIP₂ moleculen. Door een signaal van buiten de cel wordt het eiwit PLC geactiveerd wat resulteert in PIP₂ afbraak (Fig.

2B). Daardoor neemt het niveau van PIP_2 af. Het niveau varieert afhankelijk van de activiteit van PLC. PIP_2 voldoet dus aan bovengenoemd criterium 1.

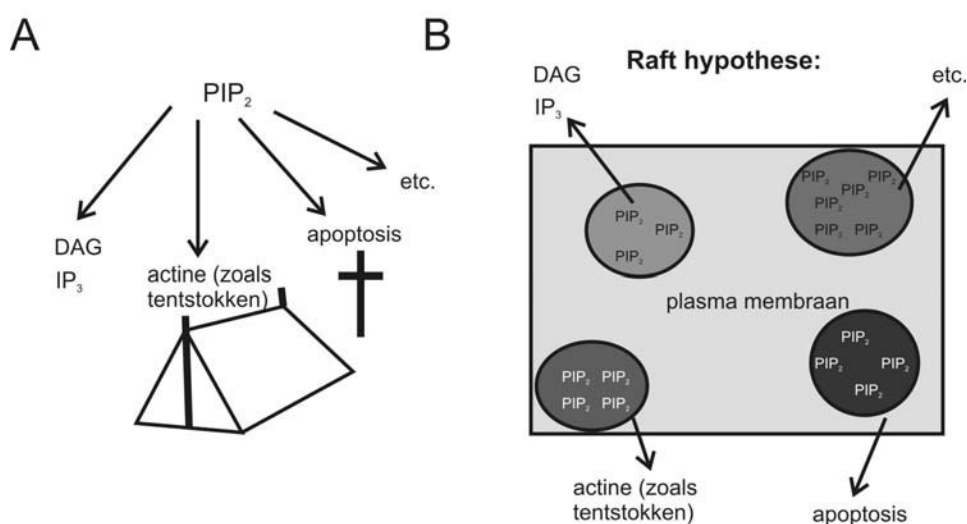
Maar voldoet PIP_2 ook aan het tweede criterium? Brengt de verandering van het PIP_2 niveau ook een reactie teweeg.

PIP_2 is een signaalmolecuul

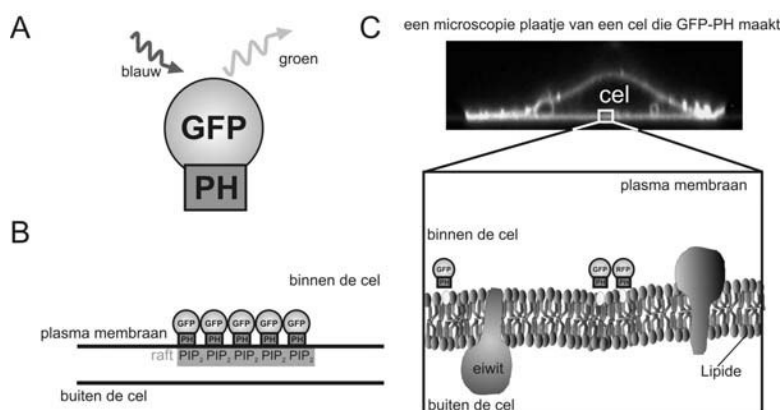
In het eerste gedeelte van mijn proefschrift bestuderen we PIP_2 als signaalmolecuul. In hoofdstuk 2 laten we zien dat de aanmaak van PIP_2 stopt, wanneer de cel te veel beschadigd is door fysische of chemische stress vanuit de omgeving om “gezond” te kunnen doorleven. Dit treedt bijvoorbeeld op in huidcellen na langdurige blootstelling aan UV straling tijdens het zonnebaden. Het afgenomen PIP_2 niveau in de plasma membraan is voor de cel een signaal om dood te gaan. Dit proces heet geprogrammeerde celdood, met een mooi woord: **apoptose**. Dit is belangrijk, want als een beschadigde cel niet dood gaat, zou deze zich tot een kankercel kunnen ontwikkelen!

In hoofdstuk 3 laten we zien dat verschillende signalen van buiten de cel het eiwit PLC (binnen in de cel) activeren. Het geactiveerde PLC breekt vervolgens PIP_2 af. De verlaging van PIP_2 remt de opbouw en afbraak van structuren (**actine**) die voor de vorm van de cel zorgen, net zoals de tentstokken van een tent.

Op basis van dit onderzoek onderschrijven we de hypothese dat PIP_2 inderdaad als een signaalmolecuul functioneert, omdat het voldoet aan beide genoemde criteria. Ten eerste kan het niveau van PIP_2 veranderen en ten tweede wordt op deze verandering gereageerd (cel gaat dood of de dynamiek van de actine structuren verandert).



Figuur 3, PIP_2 en rafts (A) PIP_2 is een belangrijk signaal molecuul bij verschillende processen in de cel. In dit proefschrift hebben we beschreven dat PIP_2 betrokken is bij de formatie van DAG en IP_3 , bij de dynamiek van actine, en bij apoptose (B). Om te kunnen begrijpen hoe PIP_2 betrokken kan zijn bij verschillende processen in één cel, hebben wetenschappers een hypothese gemaakt die ze de vlotten (raft) hypothese noemen. In deze hypothese wordt gesuggereerd dat de plasma membraan in verschillende domeinen of vlotten (rafts) verdeeld is. In deze rafts kan PIP_2 mogelijk clusteren. Wanneer dit inderdaad gebeurt dan kunnen verschillende PIP_2 rafts diverse functies hebben.



Figuur 4, het zichtbaar maken van PIP₂. (A) Om PIP₂ zichtbaar te maken, hebben we in dit proefschrift gebruik gemaakt van het eiwit GFP-PH. GFP kan blauw licht opnemen en groen licht uitstralen. PH bindt heel sterk aan PIP₂. (B) Hierdoor bindt GFP-PH aan het PIP₂ in de plasma membraan. (C) Een zijaanzicht foto gemaakt met een confocale microscoop van een cel die GFP-PH maakt. Omdat GFP-PH aan PIP₂ in de plasma membraan bindt, is de plasma membraan van de cel zichtbaar.

PIP₂ in vlotten (rafts)

In hoofdstuk 2 en 3 is duidelijk geworden dat PIP₂ een belangrijke voorloper is van signaalmoleculen (namelijk IP₃ en DAG) en dat PIP₂ ook zelf een signaal is tijdens processen zoals apoptose en de dynamiek van actine structuren. Ook andere wetenschappers hebben bewezen dat PIP₂ in veel processen binnen de cel een belangrijke rol speelt. Het lijkt dus wel of PIP₂ meerdere functies kan hebben in een cel (Fig. 3A). Maar hoe kan PIP₂ afbraak bijvoorbeeld specifiek de dynamiek van actine structuren beïnvloeden zonder apoptose te induceren? Om dit te verklaren is in de literatuur de volgende hypothese gepostuleerd (Fig. 3B):

“De plasma membraan is mogelijk verdeeld in verschillende domeinen. Deze domeinen worden ook wel vlotten genoemd (in dit proefschrift gebruiken we het engelse woord *rafts*). Deze domeinen heten zo omdat gedacht wordt dat ze als een vlot drijven in een zee van lipiden. In deze vlotten kunnen specifieke eiwitten en lipiden clusteren. De eiwitten en lipiden binnen een raft hebben een andere functie dan dezelfde eiwitten en lipiden buiten de raft.”

Zitten PIP₂ moleculen ook specifiek in dergelijke rafts? En hebben ze daar verschillende functies? Om deze interessante onderzoeksvragen te kunnen beantwoorden, moesten we PIP₂ zichtbaar kunnen maken.

PIP₂ zichtbaar maken in de cel

Sommige kwallen in de zee lichten s’ nachts op. Dit komt omdat ze eiwitten bevatten dat blauwe licht kunnen absorberen (opnemen) en dan zelf groen licht kunnen uitzenden. Het eiwit dat daar verantwoordelijk voor is heet het “groene fluorescentie eiwit” (GFP). Dit GFP eiwit is “geplakt” aan een gedeelte van een PLC eiwit dat het PH domein wordt

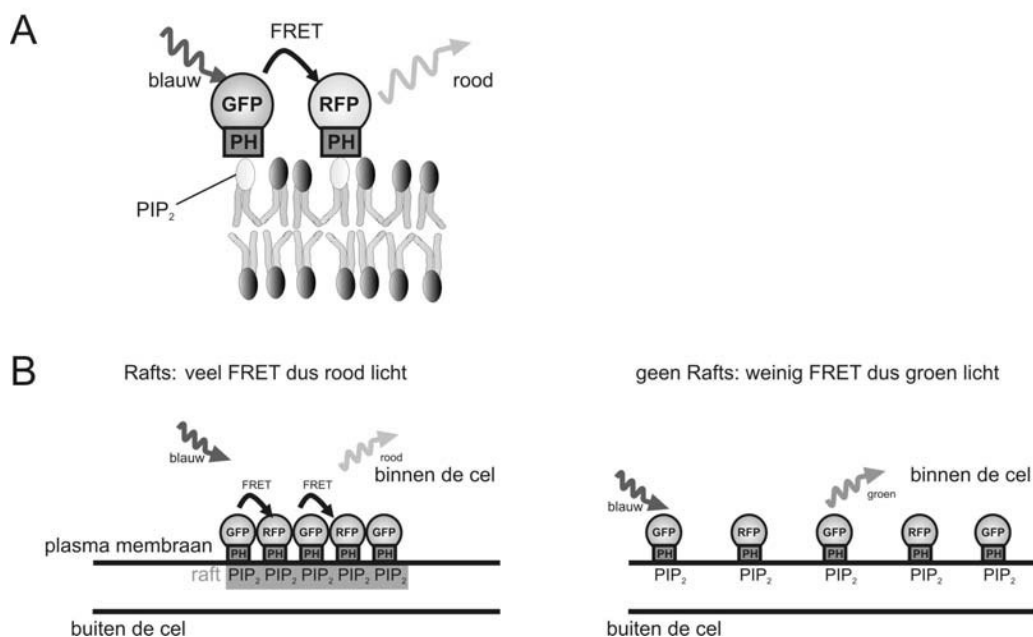
genoemd (Fig. 4A). In dit proefschrift noemen we dit aan elkaar geplakt eiwit GFP-PH. Omdat het PH domein heel specifiek aan PIP₂ kan binden, doet het GFP-PH eiwit dat ook. Dus in cellen die GFP-PH maken, binden de GFP-PH eiwitten aan de PIP₂ in de plasma membraan (Fig. 4B). Door deze cellen te bestralen met blauw licht, is onder de microscoop het groene licht van GFP-PH zichtbaar en kunnen we de positie van GFP-PH en dus ook van PIP₂ bepalen (Fig. 4C).

In hoofdstuk 3 hebben we met behulp van GFP-PH gekeken of PIP₂ geclusterd is in de plasma membraan. In het tweede gedeelte van dit hoofdstuk laten we zien dat GFP-PH homogeen verdeeld is over de plasma membraan, hoewel er kleine domeinen zijn. In deze domeinen/rafts lijkt GFP-PH geclusterd te zijn. Andere wetenschappers zagen dat ook en zij concludeerden dat GFP-PH en dus ook PIP₂ geclusterd is in de plasma membraan. Deze materie is echter veel complexer, hetgeen we in het hoofdstuk 3 laten zien. In deze GFP-PH rijke domeinen is de plasma membraan namelijk heel erg geplooid en gerimpeld. Deze plooien en rimpels zijn zo klein dat je ze niet ziet met de microscoop. Hierdoor ontstaat ten onrechte de indruk dat in deze gebieden GFP-PH en dus ook PIP₂ geclusterd is (voor verdere uitleg zie Box 3, hoofdstuk 1).

FRET

Om toch PIP₂ clustering in kleine domeinen te kunnen bestuderen, hebben we de afstand tussen GFP-PH eiwitten gemeten. Als bijvoorbeeld 5 GFP-PH eiwitten bijeengepakt zijn in een kleine raft dan is de onderlinge afstand klein, maar wanneer diezelfde 5 GFP-PH eiwitten over de hele plasma membraan verdeelt zijn, dan is de onderlinge afstand erg groot (zie Fig. 5B, linker plaatje, PIP₂ is geclusterd in raft. In het rechter plaatje is PIP₂ niet geclusterd.) De afstand tussen GFP-PH eiwitten en dus ook de clustering van PIP₂ in raften kunnen we meten met een natuurkundige truc.

Zeer recentelijk zijn er naast groene, ook cyane, gele en rode fluorescentie eiwitten beschikbaar (resp. CFP, YFP, RFP). Met behulp van deze eiwitten hebben wij cyane, gele en rode PIP₂ sensoren gemaakt (respectievelijk CFP-PH, YFP-PH en RFP-PH) (Fig. 5A). Bij belichting met blauw licht (488 nm) van cellen die GFP-PH en RFP-PH maken, zal GFP-PH het licht absorberen en groen licht uitstralen. Echter, wanneer er een RFP-PH heel dicht bij de GFP in de buurt zit (minder dan 10 nm, een miljoenste van 1 cm) dan kan GFP-PH de energie van het geabsorbeerde licht geven aan RFP-PH (Fig. 5A). Hierdoor komt er rood licht uit de cel in plaats van groen licht. Dit proces heet fluorescentie resonantie energie overdracht (FRET). FRET is erg afhankelijk van de afstand tussen GFP-PH en RFP-PH. In een cel die erg rood is, is de gemiddelde afstand tussen GFP-PH en RFP-PH zeer klein. Dus als PIP₂ moleculen en daardoor ook GFP-PH en RFP-PH in vlotten zitten, dan zullen GFP-PH en RFP-PH dicht bij elkaar zitten. Hierdoor zal er veel FRET zijn en is de cel dus rood-achtig (Fig. 5B). Als er geen vlotten in de plasma membraan aanwezig zijn, dan is de gemiddelde afstand tussen GFP-PH en RFP-PH groot wat resulteert in weinig FRET en een groene cel (Fig. 5B). Met behulp van FRET hebben we gevonden dat PIP₂ niet verrijkt is in vlotten of domeinen. Dit is een belangrijke conclusie omdat de regulatie van verschillende processen door PIP₂ niet gebeurt door verschillende PIP₂ clusters (zoals raften) hetgeen de hypothese van Fig. 3B stelde. Om deze studie te kunnen volbrengen, moesten we diverse nieuwe meet methodes



Figuur 5, met behulp van FRET is onderzocht of PIP₂ geclusterd is in rafts. (A) GFP-PH en RFP-PH eiwitten binden aan PIP₂ in de plasma membraan. Door de cel met blauw te bekijken zal GFP-PH soms het licht absorberen. Als RFP-PH heel dicht in de buurt zit van GFP-PH (minder dan 10 nm), dan kan GFP-PH de geabsorbeerde energie van het licht overgeven aan RFP-PH. RFP-PH zal dan een rood licht uitstralen, in plaats dat GFP-PH het groene licht. Dit proces heet FRET. (B) Omdat FRET afhankelijk is van de afstand tussen GFP-PH en RFP-PH (en dus ook PIP₂ moleculen) dicht bij elkaar zitten in een vlot of domein. Als PIP₂ moleculen clusteren in rafts (linker plaatje), dan is de afstand tussen GFP-PH en RFP-PH klein en is er veel FRET waardoor de cel rood-achtig is. Echter, als PIP₂ moleculen niet geclusterd zijn in rafts, dan is de afstand tussen GFP-PH en RFP-PH erg groot en er is geen FRET. Dus bij deze grote afstand (rechter plaatje) zal voornamelijk groen licht te zien zijn.

ontwikkelen. De belangrijkste is een kwantitatieve methode om FRET in detail te kunnen meten op een confocale microscoop (hoofdstuk 5).

Conclusie

In dit proefschrift is bekeken of PIP₂ een lokaal signaal kan zijn voor processen binnen de cel. Op basis van ons onderzoek onderschrijven we de hypothese dat PIP₂ een signaalmolecuul is, echter we hebben geen bewijs kunnen vinden voor lokale PIP₂ signalen.