

# Geen lood om oud ijzer

Ruim een derde van alle eiwitten bindt **metalen**, een interactie die onmisbaar is voor enzymactiviteit, eiwitvouwing en metaalfysiologie. Een andere blik ophet proteoom.

ARNO VAN 'T HOOG

**M**etalen hebben een cruciale rol in het functioneren van eiwitten. "Veel onderzoekers onderschatten dat" zegt de Delftse biotechnoloog Peter-Leon Hagedoorn. Of het nu om proteomics, eiwitkristallografie of *metabolic engineering* gaat, pas in de laatste situatie denken onderzoekers aan een eventuele rol van metalen. Dat is vaak op een moment dat de metalen door bewerking en denaturatie allang zijn weggewassen. Hagedoorn keert het om: als een van de weinigen in Nederland gebruikt hij metalen als onderzoeksdoel en analyse-instrument.

## BESTAANDE KENNIS

"Wat betreft metaal bevattende eiwitten blijven we toch nog te veel hangen in bestaande kennis", zegt Hagedoorn. Ondanks alle kennis en informatie in proteomicsdatabases wordt de rol van metalen waarschijnlijk onderschat, omdat men in het verleden niet systematisch naar dit onderwerp keek. Bovendien blijkt het lastig om op basis van bekende aminozuurmotieven van eiwitten een goede voorspelling te doen of een onbekend eiwit een metaal bindt.

Dat dit moeilijk te voorspellen is, blijkt wanneer onderzoekers metalen echt als focus nemen. Bekend is de *Nature*-publicatie van biochemicus Michael Adams en zijn collega's uit 2010. De onderzoekers van de universiteit van Georgia scheidden de celinhoud van de heetwater archaeon *Pyrococcus furiosus* met vloeistofchromatografie. De fracties werden in tweeën gesplitst en met MS/MS en ICP-MS onderzocht op respectievelijk eiwit en metalen. Er kwamen zo 343 eiwitten aan het licht, die uiteenlopende metalen binden (Co, Mo, Mn, Pb,

V, U, W, Ni, Zn, Fe). Van 158 eiwitten bestond geen vermoeden dat het metaloproteïenen waren. "Mede op basis van dit onderzoek wordt het percentage metaal bevattende eiwitten momenteel geschat op 30, tegen 40 procent van alle enzymen", zegt Hagedoorn.

## 'Proteomics levert te veel data'

### METAALHUISHOUDING

De Delftse onderzoeker is zelf vooral geïnteresseerd in de vraag hoe cellen reageren op verschillende concentraties metalen in hun omgeving. "Metalen zijn essentieel voor cellulaire functies, maar in hogere concentraties zeer giftig. Vrije metalen in de cel zijn daarom schaars, want ze worden gebonden door opslag- en transporteiwitten." Die metaalhuishouding is de focus van zijn onderzoek. "Proteomics levert ongelooflijk veel data, te veel zou ik willen zeggen. Daarom focus ik mijn onderzoek liever op een subset daarvan, en de variatie die optreedt onder verschillende omstandigheden."

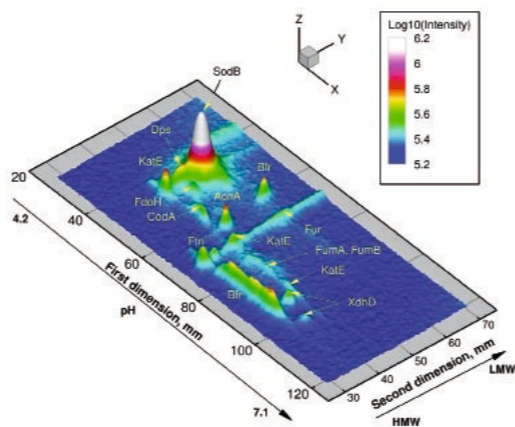
Zo deed hij onderzoek naar veranderingen in de expressie van wolfram bevattende enzymen in *P. furiosus*, die werden blootgesteld aan verschillende concentraties van het metaal. Dit deed hij ook met koper, zink en ijzer in *E. coli*. Hagedoorn werkt daarvoor samen met Bert Wolterbeek van het Reactor Instituut Delft. Daar kunnen op bestelling kortlevende isotopen van deze metalen worden geproduceerd. Het is een kwestie van de isotopen toevoegen aan het kweekmedium. Door de stra-

ling die bij het verval vrijkomt, kun je de eiwitten te visualiseren.

Om dat mogelijk te maken worden de cellen opengebroken en wordt de inhoud met *native 2D-PAGE*, een eiwitgel, gescheiden op lading en massa. De scheiding gebeurt onder niet-denaturerende omstandigheden, zodat de metaalbindende eigenschappen niet verloren gaan. Vervolgens maakt men van de gels een autoradiogram, een film die men op de gel legt die radioactiviteit zichtbaar maakt, om te zien waar de radioactieve spots zich bevinden. Na het uitsnijden van die spots identificeert men met MS/MS de aanwezige eiwitten.

### MIRAGE

De afgelopen 4 jaar heeft Hagedoorn in samenwerking met de Delftse hoogleraar enzymologie Fred Hagen deze methode geleidelijk geoptimaliseerd tot MIRAGE (Metal Isotope native RadioAutography in Gel Electroforesis). Dit heeft bijvoorbeeld nieuwe opzichten opgeleverd bij de door en door geanalyseerde laboratoriumbacterie *E. coli*. Zo blijkt bij hoge concentraties 72 procent van het zink aan ZraP te bin-



3D-afbeelding van eiwitextract verkregen uit cellen gegroeid in aanwezigheid van 6 µM Fe.

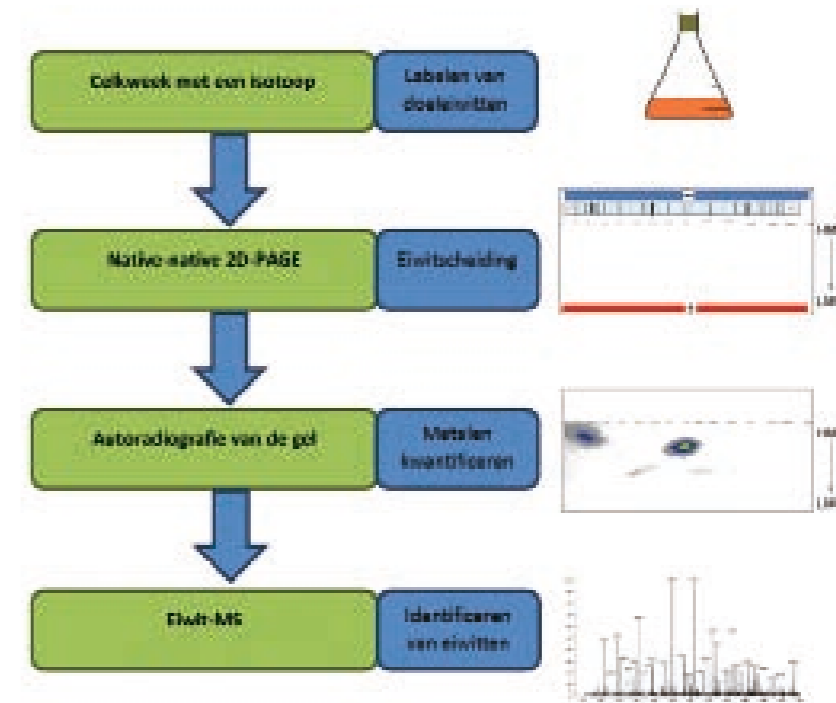
den, een tot nu toe nauwelijks beschreven eiwit, dat een belangrijke rol blijkt te spelen in de opslag van dit metaal.

In een andere studie onderzocht Hagedoorn hoe *P. furiosus* onderscheid kan maken tussen de chemisch sterk op elkaar lijkende wolfram en molybdeen. *P. furiosus* is een van de weinig bekende organismen die wolfram gebruikt op de bindingsplaats van een aantal enzymen. Uit het onderzoek blijkt dat de bacterie ook bij zeer hoge concentraties molybdeen feilloos wolfram verkiest, door verschillende moleculaire opname- en selectiemechanismen. Hagedoorn: "Twee aminozuren in de membraantransporter zijn verantwoordelijk voor die selectiviteit."

### IDENTIFICATIE

Volgens Hagedoorn is zijn isotopenmethode bruikbaar om nieuwe metaal-eiwitten, maar ook veranderingen in metaalmetabolisme, te identificeren, zoals metaal toxiciteit door het binden van verkeerde metalen. Italiaanse onderzoekers willen nu met Hagedoorn samenwerken, om de toxiciteit van nieuwe metalodrugs beter te begrijpen. Een bekend metaldrug is cisplatine, dat men gebruikt bij chemotherapie. Maar er zijn inmiddels andere metaalverbindingen in ontwikkeling, die bijvoorbeeld Ruthenium bevatten. Hagedoorn: "De onderzoekers willen in kaart brengen waar nieuwe verbindingen precies naartoe gaan in de cel, en waaraan ze binden. Die informatie is anders lastig te verkrijgen. Het wordt heel interessant om te zien wat voor mogelijkheden het biedt in een medisch onderzoeksgebied."

Zelf wil Hagedoorn de techniek nog verder perfectioneren. Een verbeterpunt is het in kaart brengen van membraan-eiwitten. Door hun hydrofobe eigenschappen zijn zij lastig te onderzoeken. "We kunnen ze prima scheiden op gel, maar voordat je ze in de massaspectrometer analyseert, moet je ze in stukjes hakken met trypsine en scheiden met *reversed phase* chromatografie. Iets wat met hydrofobe eiwitten erg slecht lukt."



Membraaneiwitten zijn daardoor sterk ondervertegenwoordigd in de analyse, terwijl er toch heel veel membraanprocessen zijn waarin metalen een rol spelen. "Op zich is het niet onmogelijk, maar het vergt tijd en kost moeite om de analysemethode op dat gebied aan te passen. Bij veel proteomicsonderzoek gaat informatie over metalen in een

## 'De informatie over metalen gaat vaak in een vroeg stadium verloren'

vroeg stadium verloren, en dat is jammer," zegt Hagedoorn, "maar ook in de industriële biotechnologie staat men lang niet altijd stil bij het belang van kennis over de rol van metalen in de celfysiologie belangrijk is."

"Weten welke metalen een organisme in bepaalde omstandigheden gebruikt, kan heel nuttig zijn om een proces te verbeteren", zegt Hagedoorn. "Over het algemeen wordt daar nu geen rekening mee gehouden, men voegt gewoon een standaardhoeveelheid toe. Het kan ook zinvol zijn om een metaal in het medium te beperken, om zo bepaalde metabole route uit te schakelen. Hetzelfde geldt voor de overexpressie van recombinante eiwitten: als een eiwit echt een metaal nodig heeft om te functioneren, zul je moeten zorgen dat er voldoende beschikbaar is."

### ANALYSEMETHODEN VOOR METALOPROTEÏNEN

Massaspectrometrie: een combinatie van ICP-MS (Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry) en tandem-MS kan metalen en de eiwitten die ze binden identificeren.

Röntgenfluorescentie op eiwitgel: maakt bandjes met metaaleiwitten zichtbaar, identificeert en kwantificeert het aanwezige metaal.

Imaging met metaalisotopen (MIRAGE): maakt het volgen, visualiseren en kwantificeren van eiwitgebonden metalen in eiwitgels mogelijk.