

Prof.dr. Jeroen den Hertog

Over signalen van leven



Universiteit Leiden

Over signalen van leven

Oratie uitgesproken door

Prof.dr. Jeroen den Hertog

bij de aanvaarding van het ambt van hoogleraar in de

Moleculaire Ontwikkelingszoölogie

aan de Universiteit Leiden

op vrijdag 6 maart 2009



Universiteit Leiden

Mijnheer de Rector Magnificus, zeer gewaardeerde toehoorders,

Signalen zijn essentieel voor het leven. Signalen uitzenden en signalen ontvangen doen wij doorlopend. U ontvangt signalen uit uw omgeving, die worden verwerkt en vervolgens handelt u daarnaar, of niet. Bijvoorbeeld u hoort mij nu spreken en deze signalen worden door uw gehoorstelsel ontvangen en vervolgens door uw hersenen verwerkt. Een ander voorbeeld is dat u signalen ontvangt van de houten bankjes waar u nu op zit - misschien ontvangt u deze signalen nu nog niet, maar ik ben er zeker van dat u de komende 45 minuten signalen van de bankjes gaat ontvangen.... De afgifte en ontvangst van signalen vinden op verschillende niveaus plaats. Terwijl u hier zo zit worden vele signalen verstuurd en ontvangen door cellen in uw lichaam. Van vele van deze signalen bent u zich niet bewust. Desalniettemin zijn deze signalen van cruciaal belang en ze hebben verregaande consequenties. Er worden bijvoorbeeld signalen afgegeven die tegen cellen in uw huid zeggen: ga delen. U merkt daar niets van, maar deze signalen worden ontvangen en omgezet in daadwerkelijke celdeling. Het is belangrijk te realiseren dat deze celgroei geen autonoom proces is; er zijn signalen nodig om ervoor te zorgen dat deze cellen blijven delen.

Ik ben geïnteresseerd in de overdracht van signalen of signaaltransductie op moleculair niveau. Dat wil zeggen welke moleculen zijn betrokken bij signaaloverdracht en hoe werkt dat nu precies. Deze interesse is al lange tijd geleden gewekt. In 1982 zag ik een plaatje van een transgene muis met het groeihormoon van de rat.¹ Deze muis was bijna twee keer zo groot als zijn broertje die het gen voor het groeihormoon niet had. Ik heb toen op de middelbare school een spreekbeurt gehouden over de ethiek van genetische modificatie en over de wenselijkheid van genetische modificatie bij de mens. Ondertussen was ik gefascineerd geraakt door de kracht van de moleculaire biologie en door de notie dat een signaalmolecuul, groeihormoon, zo'n drastisch effect op die transgene muis had.

Eén van de belangrijkste mechanismes van signaaloverdracht is fosforylering van eiwitten. De covalente binding van een fosfaatgroep aan een eiwit, fosforylering, verandert de eigenschappen van dat eiwit en werkt zodoende als een moleculaire schakelaar. Eiwit fosforylering is omkeerbaar, de fosfaatgroep kan weer verwijderd worden en defosforylering brengt het eiwit terug in zijn originele staat. De moleculaire schakelaar kan zodoende aan en uitgezet worden. Fosforylering en defosforylering van eiwitten worden gekatalyseerd door enzymen, respectievelijk kinases en fosfatases. Als gevolg van signalen worden kinases en fosfatases aan- of uitgeschakeld wat leidt tot fosforylering of defosforylering van cellulaire eiwitten. Het uiteindelijke gevolg is een cellulaire respons, bijvoorbeeld dat de cellen gaan delen. Ik wil het vandaag graag met u gaan hebben over de rol van kinases en fosfatases in signaaltransductie.

Normaal gesproken gebruik ik afbeeldingen als visuele ondersteuning van mijn verhaal. De laatste tijd laat ik ook graag filmpjes zien. Helaas is dat hier in deze eeuwenoude zaal niet mogelijk. Een afbeelding zegt vaak meer dan 1000 woorden. Bovendien kan een afbeelding leiden tot een blikwisseling, een begrip uit de mathematica. Een afbeelding kan een ingewikkeld probleem plotseling inzichtelijk maken, zoals Robbert Dijkgraaf, de huidige president van de KNAW dat mooi verwoordde.² Ik zal vandaag proberen blikwisselingen te realiseren zonder daarbij plaatjes te laten zien.

Embryonale ontwikkeling

Signaaltransductie tussen cellen is niet alleen belangrijk in volwassen organismen. Met name tijdens de embryonale ontwikkeling zijn signalen tussen cellen essentieel. In embryo's van gewervelde dieren vinden er in eerste instantie een aantal celdelingen plaats en op een gegeven moment gaan cellen zich specialiseren om specifieke functies te kunnen vervullen. Eén van de eerste momenten dat dit gebeurt is tijdens de gastrulatie, het moment dat er meerdere cellagen ontstaan in het embryo die ten opzichte van elkaar gaan bewegen. Om het belang van gastrulatie aan te geven citeer ik Lewis Wolpert³: "It

is not birth, marriage, or death, but gastrulation, which is truly the most important time in your life. Niet geboorte, huwelijk of de dood, maar gastrulatie is werkelijk de belangrijkste tijd van je leven." Celbewegingen tijdens de gastrulatie leiden tot het ontstaan van verschillende cellagen en dit zorgt ervoor dat het embryo omgevormd wordt van een bal cellen naar een complex organisme. Differentiatie van cellen leidt vervolgens tot diversificatie van de functies van cellen. Een spiercel heeft andere eigenschappen dan een zenuwcel en die heeft weer andere eigenschappen dan een huidcel. Er zijn signalen tussen cellen nodig om dit proces in goede banen te leiden, anders zouden wij hier allemaal als een grote klomp cellen zitten en niet zoals nu als mensen met armen en benen, ogen en oren. Signaaltransductie tussen cellen in een ontwikkelend embryo en met name de moleculaire basis van deze signaaltransductie, is wat mij interesseert en in feite is dat moleculaire ontwikkelingszoölogie.

4

Moleculaire ontwikkelingszoölogie

Moleculaire ontwikkelingszoölogie: de leer van de ontwikkelingsbiologie van dieren op moleculair niveau: hoe is de ontwikkeling van bevruchte eicel tot een heel beest georganiseerd? Het lijkt voor de hand te liggen dat dit een strak gereguleerd proces is. Immers, meestal gaat het goed. Hoe vaak hoor je niet over pasgeboren kinderen dat het een wonder is dat alles erop en eraan zit? Ik heb dit recent nog van heel dichtbij meegemaakt bij de geboorte van onze jongste dochter. Ik kan een heel eind meegaan in die redenering: de geboorte van een kind is wonderbaarlijk. Maar ik geloof niet in wonderen. De ontwikkeling van een bevruchte eicel tot een heel organisme vindt plaats langs een strak patroon. Het is een heel nauwkeurig gereguleerd proces. Desalniettemin is de embryonale ontwikkeling onderhevig aan invloeden van buitenaf en er gaat wel eens iets mis. Dit resulteert dan in aangeboren afwijkingen. Inmiddels weten we dat veel eigenschappen van een organisme en dus ook van de embryonale ontwikkeling van een organisme besloten liggen in het erfelijk materiaal, het DNA. Dit besef is inmiddels gemeengoed geworden en dat is een fantastische

ontwikkeling van de afgelopen decennia. Iedere lichaamscel bevat een kopie van het genomische DNA met daarop de genetische informatie die bepaalt dat wij mensen zijn. Iedere cel van een vis bevat een kopie van het DNA van die vis, iedere cel van een worm bevat een kopie van het DNA van die worm enzovoort. Het DNA codeert voor genen die op hun beurt weer coderen voor eiwitten. Er is een grote gelijkheid in het DNA dat codeert voor genen van mensen en dieren. In de regel is het zo dat hoe groter de gelijkheid tussen de dieren, hoe groter de gelijkheid in het DNA.

De wet van Darwin

2009 is uitgeroepen to Darwinjaar. Het zal u niet ontgaan zijn. Over de hele wereld zijn dit jaar manifestaties gewijd aan Charles Darwin. Het is 200 jaar geleden dat Charles Darwin, de grondlegger van de evolutietheorie, is geboren. En het is 150 jaar geleden dat hij zijn revolutionaire theorie publiceerde. Darwin kwam door nauwkeurige observatie van soorten tot het inzicht dat dieren evolueren als gevolg van natuurlijke selectie. "*Survival of the fittest*" de soort die het best past of die zich het best heeft aangepast aan de omstandigheden overleeft. Wat voortvloeit uit de theorie van Darwin is dat verschillende soorten uit een gemeenschappelijke voorouder geëvolueerd zijn. Deze verwantschappen tussen soorten werken door tot op moleculair niveau. Iedere keer als er een DNA volgorde van een nieuw organisme wordt bepaald wordt de evolutietheorie van Darwin opnieuw bevestigd. Op DNA niveau is de verwantschap tussen verschillende organismes goed waarneembaar. De genen van de mens zijn nauwer verwant aan die van een chimpansee dan aan de genen van een muis of een kip of een zebrafis. Desalniettemin is er een duidelijke gelijkheid in de genen. De gelijkheid tussen de homologe genen is vaak zo groot dat ze uitwisselbaar zijn, dat wil zeggen dat het humane gen de functie van zijn homoloog in de muis of in de fruitvlieg zonder noemenswaardige gevolgen kan overnemen. Nu heb ik u zojuist verteld dat transgene muizen met het groeihormoon van de rat bijna twee keer zo groot zijn als hun niet-transgene broertjes. Dit zou kunnen betekenen dat rat-groei-

hormoon anders werkt dan groeihormoon van de muis. Logisch, want ratten zijn groter dan muizen. Dit is niet het geval. De transgene muizen hebben méér groeihormoon en dat leidt tot grotere muizen. Extra muis groeihormoon heeft hetzelfde effect als extra rat groeihormoon in transgene muizen. Het bewijs voor de evolutietheorie van Darwin is zo overweldigend geleverd dat ik mij afvraag of we het nog wel een theorie moeten noemen. Misschien moeten we het maar de wet van Darwin gaan noemen.

De naamgever van het Instituut waar ik werk, Ambrosius Hubrecht, was een tijdgenoot van Darwin en Hubrecht was één van de eerste darwinisten van Nederland, zo niet d eerste. Er is een briefwisseling tussen Darwin en Hubrecht bewaard gebleven. Uit deze briefwisseling blijkt dat Darwin en Hubrecht het niet altijd eens waren en vooral ook dat Darwin ongezouten kritiek leverde. Ik citeer: "*It is well to toss all sorts of hypotheses, but I do not feel inclined at present to place much trust in that suggested by you*". Aldus Charles Darwin naar aanleiding van een idee van Hubrecht dat vooral de eerstgeborenen onderhavig zouden zijn aan evolutionaire druk. Darwin schrijft dus: "Het is prima om allerlei hypotheses op te werpen, maar ik voel mij op dit moment niet genegen om veel waarde te hechten aan dat wat U suggereert". Kortom, Ik geloof er geen bal van en daar kon Hubrecht het mee doen.

Eiwitten doen het werk

Het DNA bevat de erfelijke eigenschappen van een organisme. Soms wordt het DNA ook wel de blauwdruk van het leven genoemd. Deze term is misleidend. De blauwdruk van een willekeurig apparaat, bijvoorbeeld een stofzuiger, geeft aan welke onderdelen erin zitten en hoe deze precies in verbinding staan met elkaar en met het geheel. Het DNA bestaat uit lange strengen nucleotiden. Er zijn vier verschillende nucleotiden; in het kort: A, T, C en G. Bij de mens bestaat het genomische DNA uit zo'n 3 miljard nucleotiden en het DNA van de mens codeert voor ongeveer 30.000 genen. Het DNA van een organisme is dus meer een lijst van onderdelen die erin zouden

kunnen zitten. Het DNA geeft niet aan hoe die onderdelen met elkaar in verbinding staan. Dit is wezenlijk anders dan de blauwdruk van een apparaat. Toen de DNA-volgorde van de mens ontrafeld was en duidelijk werd dat de mens maar 30.000 genen bevat was de verbazing groot. Aanvankelijk had men gedacht dat het humane genoom veel meer genen zou bevatten. Ter vergelijking: het genoom van *C. elegans*, een heel klein wormpje, codeert al voor meer dan 19.000 genen. Waar komt de complexiteit vandaan? Welnu, genen coderen voor eiwitten en het wordt steeds duidelijker dat bij hogere organismen niet simpelweg één gen codeert voor één eiwit. Genen zijn opgebouwd uit exonen, soms wel tientallen en deze exonen worden samengevoegd en vervolgens afgelezen. Door differentieel gebruik van exonen kunnen verschillende genproducten gevormd worden. Zo zijn er voorbeelden van genen die duizenden genproducten, eiwitten produceren. De laatste schattingen suggereren dat meer dan 90% van de genen van de mens meerdere producten kunnen vormen. Het vaststellen van de DNA volgorde is nog maar het begin. Om te begrijpen hoe het werkt moeten de functies van de genproducten, de eiwitten, bepaald worden. De eiwitten doen het werk in cellen. Er zijn structurele eiwitten en eiwitten die genexpressie reguleren, eiwitten die essentieel zijn voor het metabolisme enzovoort enzovoort. Relatief veel eiwitten hebben een rol in signaaltransductie. Zij zijn betrokken bij het uitzenden van signalen of bij het ontvangen en verwerken van signalen.

Fosforylering/defosforylering

De signalen die verantwoordelijk zijn voor communicatie tussen cellen bestaan uit kleine eiwitjes - polypeptiden - of chemische verbindingen die uitgescheiden worden door cellen en die vervolgens andere cellen activeren. Deze signaal moleculen binden aan receptoren op het oppervlak van cellen wat leidt tot activering van de receptoren. Ook rechtstreeks cel-cel contact leidt tot activering van receptoren en tot veranderingen binnenin de cel. Uiteindelijk wordt het signaal via een signaaltransductie cascade verwerkt en dat leidt tot een cellulaire respons, zoals bijvoorbeeld celgroei of celbeweging.

Eén van de belangrijkste signaaltransductiemechanismen in cellen is fosforylering van eiwitten, de covalente binding van een fosfaatgroep aan een eiwit. Eddie Fischer en Ed Krebs hebben ruim vijftig jaar geleden laten zien dat eiwitten gefosforyleerd kunnen worden en dat deze modificatie tot verandering van intrinsieke eigenschappen van deze eiwitten leidt. Bovendien hebben zij gevonden dat er enzymen betrokken zijn bij fosforylering en defosforylering van eiwitten. De kinasen zijn verantwoordelijk voor de toevoeging van een fosfaatgroep aan een eiwit en de fosfatases zijn verantwoordelijk voor de verwijdering of hydrolyse van de fosfaatgroep van eiwitten. Zij hebben voor deze ontdekking in 1992 de Nobelprijs gekregen.⁴ Fosforylering is een zeer aantrekkelijk regulatiemechanisme omdat het weinig energie kost en vrij gemakkelijk omkeerbaar is: de toevoeging van een fosfaatgroep, fosforylering, kost 1 molecuul ATP - de cellulaire energiebron - en de verwijdering van de fosfaatgroep, defosforylering, gaat niet ten koste van het eiwit zelf. Na een ronde van fosforylering/defosforylering is het eiwit weer terug in de originele staat en de cyclus kan weer van voren af aan beginnen. De covalente binding van een fosfaatgroep aan een eiwit introduceert een negatieve lading en er is dus een groot verschil in de chemische eigenschappen van een eiwit ten gevolge van fosforylering. Fischer en Krebs hebben laten zien dat eiwitten op twee verschillende aminozuren gefosforyleerd kunnen worden, serine en threonine. Dertig jaar geleden heeft Tony Hunter laten zien dat ook tyrosine in eiwitten gefosforyleerd kan worden.⁵ Deze ontdekking heeft verstrekkende gevolgen gehad want Tony Hunter heeft vervolgens laten zien dat Src, het product van het eerste oncogen, een tyrosine kinase is.⁶ Het oncogen Src maakt van een normale cel een kankercel en Src bleek een enzym te zijn dat eiwitten op tyrosine fosforyleert. Vervolgens werd al snel duidelijk dat er meer kinasen zijn die eiwitten kunnen fosforyleren op tyrosine en veel van deze kinasen zijn oncogenen of voorlopers van oncogenen. Dit betekent dat tyrosine fosforylering een belangrijke rol heeft bij het ontstaan van kanker. Veel receptoren hebben intrinsieke tyrosine kinase activiteit. Binding van een groeifactor aan zijn receptor buiten de cel

leidt tot activering van tyrosine kinase activiteit binnenin de cel en dat is een spectaculaire ontdekking, want het verklaart hoe het signaal van buiten de cel over de celmembraan naar binnen de cel in wordt gebracht.

Intracellulaire signaaltransductie

In de afgelopen drie decennia hebben wij inzicht gekregen in intracellulaire signaaltransductie cascades. Activering van de tyrosine kinase activiteit is de eerste stap en vervolgens fosforyleren de tyrosine kinasen meestal eerst zichzelf en vervolgens andere eiwitten. Het signaal wordt doorgegeven dieper de cel in via een cascade van eiwit-eiwit interacties en fosforyleringen, wat leidt tot een versterking van het signaal. Vele eiwitten zijn geïdentificeerd in signaaltransductieroutes en ontelbaar veel groepen hebben bijgedragen aan het één voor één karakteriseren van deze eiwitten. Tegenwoordig wordt in grootschalige *proteomics* experimenten de identiteit van duizenden gefosforyleerde eiwitten tegelijk vastgesteld met behulp van geavanceerde massa-spectrometrie. Zo worden de gefosforyleerde eiwitten in gestimuleerde cellen vergeleken met de gefosforyleerde eiwitten in niet-gestimuleerde cellen binnen één experiment. Deze technologie is nu zo gevoelig dat Simone Lemeer binnen mijn groep in een samenwerking met Albert Heck de gefosforyleerde eiwitten in een heel organisme, een zebrafish embryo heeft bepaald.⁷ Vervolgexperimenten zullen ertoe leiden dat wij inzicht krijgen in de identiteit van de fosfo-eiwitten die een essentiële rol hebben in de embryonale ontwikkeling. Het staat inmiddels vast dat fosforylering op tyrosine een cruciale rol speelt in praktisch alle biologische processen. Vele tyrosine kinasen zijn oncogenen en het is dus niet verbazingwekkend dat tyrosine fosforylering nauw betrokken is bij kanker.

Tyrosine kinase remmers als anti-kanker medicijn

Gezien de rol van tyrosine fosforylering in kanker, zijn de tyrosine kinasen goede kandidaten om anti-kanker medicijnen te ontwikkelen. BCR-ABL is een fusie van twee genen, *bcr* en *abl*, die gevonden is in chronische myeloïde leukemie, CML,

een vorm van leukemie. Het gevolg van deze fusie is dat de tyrosine kinase activiteit van Abl zelfs zonder signalen continu actief is en dat leidt tot ongebreidelde groei van bloedcellen, leukemie. Remming van de tyrosine kinase activiteit van Abl zou dit effect kunnen opheffen. Enige jaren geleden is een remmer ontwikkeld die selectief is voor Abl. Dit is een chemische stof, Gleevec, merknaam Imatinib, die inmiddels met veel succes in de kliniek gebruikt wordt als medicijn tegen CML.⁸ Dit is het eerste medicijn dat ontworpen is op basis van fundamenteel onderzoek: in een zoektocht naar remmers van de tyrosine kinase activiteit van Abl werden chemische stoffen ontworpen, gesynthetiseerd en getest. Vervolgens werd deze Abl remmer toegepast in de kliniek bij CML patiënten waarvan bekend was dat zij verhoogde Abl kinase activiteit hadden. Tot dan toe werkte het andersom: een biologisch actieve stof - synthetisch of natuurlijk voorkomend - werd getest in biologische assays en, indien positief, werd deze verder ontwikkeld tot medicijn. Pas daarna werd het werkingsmechanisme onderzocht. Deze laatste strategie wordt nog steeds met veel succes toegepast. Binnen het MycoDanio project zijn wij op zoek naar biologisch actieve stoffen die geproduceerd worden door schimmels.

Tyrosine fosfatases

Onder normale omstandigheden is fosfotyrosine stabiel. In cellen is er echter weinig fosfotyrosine te detecteren. Van alle fosfaat in cellulaire eiwitten is minder dan 0.1% gebonden aan tyrosine. Dit suggereert dat tyrosine fosforylering heel strak gereguleerd is. Inmiddels weten we dat er een familie van enzymen is die de hydrolyse van fosfotyrosine in fosfaat en tyrosine katalyseert, de tyrosine fosfatases. De ontdekking van tyrosine fosfatases berust niet op toeval. Nick Tonks had zich in het lab van Eddie Fischer ten doel gesteld een enzym te isoleren dat fosfotyrosine kan defosforyleren. Via klassieke biochemie en grootschalige eiwitzuivering had hij al snel een actieve tyrosine fosfatase zuiver in handen.⁹ Bepaling van de enzymatische activiteit wees uit dat deze tyrosine fosfatase zeer hoge katalytische activiteit had. Per tijdsseenheid zet een fosfa-

tase-molecuul ongeveer 1000 keer meer om dan een tyrosine kinase molecuul. Dit verklaart waarom er op enig moment niet heel veel fosfotyrosine te detecteren is in een cel. Na de isolatie en klonering van de eerste tyrosine fosfatase bleek een belangrijk eiwit uit de immunologie waar al jaren aan gewerkt werd, CD45, zeer homoloog te zijn aan de tyrosine fosfatases. Biochemische analyse wees uit dat CD45 inderdaad een tyrosine fosfatase is. Dit brak het veld wijd open want tot dan toe werd gedacht dat tyrosine fosfatases een soort huishoud-enzymen zijn. Men dacht dat tyrosine fosfatases alles defosforyleren wat er in de buurt komt en dat ze zelf niet gereguleerd zijn. De ontdekking dat CD45, een transmembraan eiwit, tyrosine fosfatase activiteit heeft suggereerde onmiddellijk dat tyrosine fosfatases wel degelijk gereguleerd zouden kunnen worden en specifieke functies zouden kunnen hebben. Als gevolg van de opheldering van het humane genoom kennen wij inmiddels alle tyrosine fosfatases van de mens. Het zijn er ongeveer 100. De tyrosine fosfatases zijn te herkennen aan een aantal zeer karakteristieke motieven die terug te vinden zijn in alle tyrosine fosfatase familieleden. Een stuk of 20 van de tyrosine fosfatases zijn transmembraan-eiwitten die veel lijken op receptoren met een extracellulair domein dat aan liganden zou kunnen binden en een domein binnenin de cel dat de katalytische fosfatase activiteit bevat. Of deze transmembraan fosfatases zich als receptor gedragen is nog niet met zekerheid vastgesteld.

Tyrosine fosfatases *in vivo*

Gezien hun katalytische activiteit was het intuïtief onmiddellijk duidelijk dat tyrosine fosfatases ook een belangrijke rol zouden moeten spelen in biologische processen. De tyrosine fosfatases werden in eerste instantie toegejuicht als anti-kanker genen of tumor suppressor genen omdat hun activiteit tegengesteld is aan die van de oncogene tyrosine kinases. Deze rol hebben de tyrosine fosfatases tot op heden niet waargemaakt met uitzondering van PTEN. In vele tumoren is geen functioneel PTEN te bekennen en sterker nog, het is een voorwaarde voor de tumor om te kunnen groeien dat PTEN geïnactiveerd

is. Kortom, PTEN is een echte tumor suppressor. PTEN behoort weliswaar tot de superfamilie van tyrosine fosfatases, maar PTEN is vooral een lipide fosfatase en deze activiteit is essentieel voor de tumor suppressor functie van PTEN.

Van een aantal tyrosine fosfatases is vastgesteld dat ze een cruciale rol hebben in biologische processen. Baanbrekend werk in de fruitvlieg leidde tot de ontdekking dat verschillende transmembraan tyrosine fosfatases een essentiële rol hebben in de ontwikkeling van zenuwcellen, met name in *axon pathfinding*, hoe de zenuwuiteinden op de juiste plek terechtkomen. Zo'n tien jaar geleden heeft Michel Tremblay gevonden dat muizen die de tyrosine fosfatase PTP1B missen niet dik worden, zelfs niet als je ze op een dieet zet waar normale muizen wel dik van worden.¹⁰ Bovendien zijn deze muizen beschermd tegen het ontwikkelen van suikerziekte, diabetes type I.I. In de westerse wereld neemt obesitas hand over hand toe en zo ook de daarmee gepaard gaande diabetes. In de Verenigde Staten begint dit pandemische vormen aan te nemen. De ontdekking dat PTP1B hier een belangrijke rol zou kunnen spelen heeft veel stof doen opwaaien. Praktisch alle grote farmaceutische bedrijven hebben programma's gestart om remmers te ontwikkelen van PTP1B. Immers, toediening van een remmer van PTP1B zou ertoe kunnen leiden dat mensen zoveel zouden kunnen eten als ze willen zonder er dik van te worden. Bovendien zouden suikerziektepatiënten een pil kunnen nemen met een PTP1B remmer wat natuurlijk te prefereren is boven dagelijkse injecties met insuline. Helaas is inmiddels gebleken dat remming van PTP1B niet geheel ongevaarlijk is. Gevreesd moet worden dat remming van PTP1B een positieve werking heeft op sommige vormen van kanker. Dat wil zeggen dat de tumor harder gaat groeien en dat is dus slecht nieuws voor de patiënt.

Remmers

Het gebruik van tyrosine fosfatase remmers in de kliniek is niet nieuw. Al rond 1900 werd Vanadaat gebruikt als geneesmiddel voor allerlei aandoeningen. Vanadaat is een irreversi-

bele remmer van tyrosine fosfatases en in 1985 werd duidelijk dat vanadium verbindingen een insuline-achtige en dus anti-diabetes werking hebben. Hoge doses vanadium zijn echter vrij toxisch en het gebruik als anti-diabetes middel zet niet echt door. Wel wordt er hard gewerkt aan vanadium derivaten die minder toxisch zijn en toch anti-diabetes werking hebben. Bovendien wordt er gezocht naar andere chemische verbindingen die de katalytische activiteit van tyrosine fosfatases remmen. Het is niet eenvoudig om remmers te vinden die specifiek zijn voor één tyrosine fosfatase omdat de katalytische sites waar de feitelijke defosforyleringsreactie plaatsvindt zo sterk op elkaar lijken. Om hier onderuit te komen worden allosterische remmers ontwikkeld die op andere plekken binden en dus selectiever zouden kunnen zijn.

PTPalfa

Ik raakte geïnteresseerd in tyrosine fosfatases meteen nadat de eerste tyrosine fosfatase was gerapporteerd door Nick Tonks, vanwege het potentiële belang van de fosfatases als tegenhanger van de kinases. Wij hebben een aantal familieleden van de tyrosine fosfatases gekloneerd, waaronder PTPalfa, een transmembraan eiwit met een klein extracellulair domein. Wij en anderen hebben gevonden dat PTPalfa het product van het proto-oncogen Src defosforyleert en activeert.^{11,12} PTPalfa is dus op het eerste gezicht geen anti-oncogen, maar juist een activator van een oncogen en daarmee zou PTPalfa zelf misschien ook wel bestempeld moeten worden als oncogen. In celsystemen blijkt PTPalfa inderdaad in sommige gevallen bij te dragen aan verhoogde celgroei.

Wij hebben de afgelopen jaren het regulatiemechanisme van tyrosine fosfatases bestudeerd. Ik zal u niet vermoeien met alle details, maar ik ontkom er niet aan af en toe wel in detail te treden. Wetenschappers zijn verplicht om zo exact mogelijk te beschrijven wat zij observeren. Eén gevolg is dat wat wij doen slecht toegankelijk is voor het grote publiek. Toch zit het hem vaak in de details. Bijvoorbeeld: Arjan Buist in mijn groep heeft structuur-functie analyses gedaan en hij heeft laten zien

dat het vervangen van één atoom in dit eiwit, d.w.z. één atoom van de meer dan 2200 atomen in dit eiwit een kwestie is van leven en dood.¹³ Vervanging van de katalytische cysteine door een serine - effectief is dit slechts één atoom verschil, een zuurstof- voor een zwavelatoom - maakt het enzym katalytisch dood. Dit geldt voor alle tyrosine fosfatases. Eén atoom maakt het verschil tussen leven en dood... van het enzym.

Wij hebben verschillende regulatiemechanismen van tyrosine fosfatases ontrafeld. Tot onze verbazing worden tyrosine fosfatases zelf gereguleerd door fosforylering op tyrosine.¹⁴ Immers, tyrosine fosfatases zijn zeer actieve enzymen en het is zeer waarschijnlijk dat deze tyrosine fosfatases zichzelf defosforyleren. Wij weten nu dat er signaaltransductie moleculen aan de fosfotyrosine binden en zodoende beschermen tegen defosforylering. Andrei Vacaru onderzoekt de rol van fosforylering op serine en threonine in de regulatie van tyrosine fosfatases. Bij de kinases zijn cascades gevonden van kinases die elkaar opeenvolgend fosforyleren en activeren, hetgeen leidt tot een versterking van het signaal. Er zijn aanwijzingen dat ook bij de fosfatases cascades actief zijn van fosfatases die elkaar opeenvolgend defosforyleren.

Niet alleen fosforylering, maar ook oxidatie is een belangrijke regulator van tyrosine fosfatases. Christophe Blanchetot en later ook Arnoud Groen hebben laten zien dat de katalytische cysteine - en met name het zwavelatoom, waar ik het zojuist al over had - uiterst gevoelig is voor kleine veranderingen in de redox status.^{15,16} Oxidatie leidt tot inactivatie van katalytische activiteit. Vele signalen van buiten de cel leiden tot veranderingen in de redox status. Bijvoorbeeld receptor tyrosine kinase activering leidt tot verhoogde productie van radicalen en dus tot inactivatie van tyrosine fosfatases. Oxidatie heft zodoende de negatieve feedback van tyrosine fosfatases op tyrosine kinases op en dat leidt tot een versterking van de respons.

Samen met Joe Noel hebben wij de kristalstructuur van het katalytische domein van PTPalfa opgelost en het model dat

daaruit naar voren kwam was dat twee PTPalfa moleculen aan elkaar binden en een zogenaamde dimeer vormen.¹⁷ In deze dimeer zijn beide katalytische *sites* geblokkeerd. Met andere woorden, deze dimeer is niet actief. Het is een interessant concept dat tyrosine fosfatases worden geïnactiveerd door dimerisatie omdat de tyrosine kinases juist worden geactiveerd door dimerisatie. Christophe Blanchetot en Leon Tertoolen hebben laten zien dat receptor tyrosine fosfatases altijd dimeren vormen. Sommige dimeren zijn actief en andere zijn dat niet. Thea van der Wijk heeft laten zien dat de tyrosine fosfatases kunnen draaien ten opzichte van elkaar, wat leidt tot een open conformatie, die actief is, of een gesloten conformatie, die inactief is.¹⁸ Veranderingen binnenin de cel, bijvoorbeeld veranderingen in de redox status leiden tot veranderingen in de opmaak van de dimeer. Dit betekent dat tyrosine fosfatases informatie van binnen de cel kunnen doorgeven naar buiten de cel als een soort omgekeerde receptor. Hoe dimerisatie nu precies receptor tyrosine fosfatases reguleert is nog niet duidelijk. Een paar weken geleden nog hebben Stefan Knapp en collega's in Cell¹⁹ een aanpassing van ons model voorgesteld op basis van kristalstructuren die zij hebben bepaald.

9

Modelsystemen

De laatste tijd leggen wij ons erop toe de functie van tyrosine fosfatases tijdens de embryonale ontwikkeling beter te begrijpen. Het is belangrijk je modelsysteem goed te kiezen bij de vraag die je stelt. Er zijn een aantal modelsystemen voorhanden, ieder met zijn eigen specifieke voordeel. Er is in de loop der jaren enorm veel werk gedaan aan cellen die in een kweekflesje groeien. Vragen die niet in celsystemen gesteld kunnen worden, worden in diermodellen gesteld. Veelgebruikte diermodellen zijn ratten, muizen, zebrafissen, fruitvliegen en wormen. Ieder model heeft zijn specifieke voordeel: de rat vanwege de uitvoerig bestudeerde fysiologie. De muis is vooral geschikt om gericht veranderingen in het genoom aan te brengen, de zogenaamde knock-out muizen en knock-in muizen. De zebrafis is een relatief nieuw modelsysteem met een aantal voordelen. Een vissepaar produceert 1 à 2 keer per week 100

- 200 eitjes. Dit maakt experimenten op grote schaal mogelijk. Bovendien is de embryonale ontwikkeling van de zebravis snel. Na 24 uur is het al duidelijk dat zich een vis ontwikkelt en binnen 5 dagen zijn alle organen aangelegd. De vis is een gewerveld dier en de organen van de vis zijn goed vergelijkbaar met die van de mens. De organen en lichaamsbouw van de fruitvlieg of de worm, ongewervelde dieren, zijn wezenlijk anders dan van de mens. Bijkomend voordeel van de vis als modelsysteem voor de embryonale ontwikkeling is dat er geen ingewikkelde operaties aan te pas komen om embryo's te verkrijgen en de embryo's zijn transparant. Met behulp van een simpele lichtmicroscopie kan de ontwikkeling vrij gemakkelijk gevolgd, gefotografeerd en gefilmd worden. Het spektakel wordt nog eens verhoogd als de organen van interesse fluorescent gelabeld worden met behulp van fluorescerende eiwitten, zoals groen fluorescerend eiwit, GFP. Aan de ontdekking, het gebruik en de toepassing van GFP is in 2008, vorig jaar, terecht de Nobelprijs toegekend.⁴ De zebravis leent zich uitstekend voor genetische screens, waar op willekeurige plekken in het genoom mutaties worden aangebracht om vervolgens te zien of deze mutanten defecten vertonen in bepaalde processen. Vervolgens kunnen de genen opgespoord worden die hier verantwoordelijk voor zijn. Inmiddels is het ook mogelijk in de zebravis een gen van interesse gericht te inactiveren met behulp van technologie die binnen het Hubrecht Instituut door Ronald Plasterk en Edwin Cuppen is opgezet. Met andere woorden, de zebravis is het ideale modelsysteem voor de moderne ontwikkelingsbioloog om de functie van genen of eiwitten op te helderen.

Het is belangrijk het modelsysteem te kiezen dat bij de onderzoeksvraag past. In sommige omstandigheden is het onvermijdelijk dat er proefdieren gebruikt worden om onderzoeksvragen te beantwoorden. In het Nederlandse bestel is het niet eenvoudig om een dierproef te doen. Het is zeer begrijpelijk dat dierproeven aan strenge regels onderworpen zijn en dat onderzoekers gedwongen worden om over alternatieven na te denken. Ondertussen is het verbazingwekkend dat in

Nederland, anders dan in de ons omringende landen een "Nee Tenzij" beleid geldt. Het is verboden om in Nederland een dierproef te doen tenzij je kunt aantonen dat het noodzakelijk is. In andere Europese landen die ook allemaal lid zijn van de EU geldt de "Ja, Mits" regel. Een onderzoeker mag dierproeven doen, mits hij aangeeft waarom. De grondhouding is derhalve compleet anders. In Nederland geldt bovendien een bureaucratisch ontmoedigingsbeleid. Om een transgene zebravis of muis - voor beiden geldt hetzelfde regime - te genereren heeft een onderzoeker in Nederland de goedkeuring nodig van drie verschillende instanties, het bureau genetisch gemodificeerde organismen, het ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit en de dierexperimentencommissie. Voor alle drie de instanties moet gedeeltelijk overlappende informatie aangeleverd worden. Het zou goed zijn om de regelgeving rond dierproeven drastisch te vereenvoudigen. Eén aanvraag die wat mij betreft scherp getoetst wordt zou moeten kunnen volstaan. Nogmaals, het is belangrijk dat wetenschappers openheid geven over hun dierproeven. Ik denk dat een meer pragmatische aanpak zal leiden tot betere transparantie op het gebied van de biotechnologie.

Tyrosine fosfatases in zebravisontwikkeling

Wij hebben de zebravis omarmd als modelsysteem om inzicht te krijgen in de functie van tyrosine fosfatases in de embryonale ontwikkeling. Door de expressie van de tyrosine fosfatases één voor één weg te nemen en vervolgens te kijken naar de effecten die dat teweegbrengt leiden wij af wat de functies van die tyrosine fosfatases zijn. In eerste instantie heeft Astrid van der Sar zich gericht op PTPalfa. De conclusie destijds was dat er van alles en nog wat misgaat. Inmiddels weten wij dat er in de vroege embryonale ontwikkeling defecten optreden in celmigratie die de verscheidenheid aan latere defecten verklaren. De doorbraak die tot dit inzicht leidde - of zo u wilt de bliskwisseling - was een serie experimenten van Chris Jopling met tyrosine kinases die nauw verwant zijn aan Src.²⁰ Embryo's waarin de expressie van de tyrosine kinases, Fyn en Yes, verlaagd werd vertoonden een verstoorde ontwikkeling en deze

embryo's leken sprekend op mutanten waarvan bekend was dat de beweging van cellen verstoord was tijdens gastrulatie in het vroege embryo. Vervolgens hebben wij laten zien dat defecten in celbewegingen inderdaad ten grondslag liggen aan de defecten in de embryo's met verlaagd Fyn en Yes. De zebra-vis leent zich uitstekend als model om interacties tussen genen en eiwitten uit te zoeken. PTPalfa opereert als directe activator in hetzelfde signaaltransductiepad als Fyn en Yes. Mark van Eekelen heeft aangetoond dat PTPalfa via Fyn en Yes een rol heeft in celbewegingen tijdens gastrulatie en Vincent Runtuwene heeft deze celbewegingen prachtig in beeld gebracht.

Noonan syndroom en LEOPARD syndroom zijn twee syndromen bij de mens die geassocieerd zijn met mutaties in de tyrosine fosfatase Shp2. Noonan syndroom komt vrij vaak voor. Eén op de 1000 à 2000 nieuwgeborenen in de westerse wereld heeft Noonan syndroom. LEOPARD syndroom komt minder vaak voor. De symptomen van beide syndromen zijn gedeeltelijk overlappend: patiënten zijn kort van stuk, hun ogen staan wat verder uit elkaar en zij hebben aangeboren hartafwijkingen. Alhoewel veel symptomen vergelijkbaar zijn, wordt Noonan syndroom veroorzaakt door activerende mutaties in Shp2 en LEOPARD door inactiverende mutaties. Blijkbaar is een vrij nauwkeurige dosering van Shp2 activiteit vereist. Wij hebben de zebra-vis gebruikt om inzicht te verkrijgen in deze syndromen. Chris Jopling heeft mutaties in Shp2 gemaakt en die in de vissen tot expressie gebracht.²¹ De resulterende vissen zijn korter dan normaal, de ogen staan verder uit elkaar en zij vertonen hartafwijkingen, vergelijkbaar met de symptomen in de mens. Zodoende hebben wij nu een model in handen waar wij de cellulaire basis van Noonan en LEOPARD syndroom kunnen onderzoeken. In de vis treden al defecten op tijdens gastrulatie en het is niet onwaarschijnlijk dat de symptomen bij de mens hun oorsprong ook al tijdens gastrulatie hebben. Dit is vanuit klinisch-therapeutisch oogpunt een belangrijke constatering, aangezien dit inhoudt dat behandeling van de oorzaak van deze syndromen praktisch onmogelijk is, maar

dat de aandacht gericht zou moeten zijn op vroege diagnose en op behandeling van de symptomen in een zo vroeg mogelijk stadium.

Met deze voorbeelden uit het lab en uit de kliniek hoop ik iets van mijn fascinatie voor de tyrosine fosfatases als essentiële signaaltransductiemoleculen overgebracht te hebben. Het is evident dat er nog vele vragen openliggen en dat we nog lang niet alle antwoorden hebben. Bijvoorbeeld, wat is er *upstream* van tyrosine fosfatases: welke signalen zetten tyrosine fosfatases aan of uit en hoe? Welke rol hebben zij in signaaltransductie? Ondertussen worden meer en meer tyrosine fosfatases geïdentificeerd met een belangrijke rol in ziektes bij de mens. Ik verwacht dat binnen niet al te lange tijd medicijnen gebruikt gaan worden die gericht zijn op het inactiveren of juist activeren van specifieke tyrosine fosfatases. Ik zie ernaar uit bij te blijven dragen aan deze ontwikkelingen door fundamenteel onderzoek aan signalen van leven.

Slotwoord

Ik hoop dat u de afgelopen 45 minuten niet al te veel signalen ontvangen hebt van de houten bankjes waar u op zit. Vanaf deze plek wil ik graag een aantal mensen bedanken: Professor Spaik en professor Hooykaas voor hun inzet bij het realiseren van mijn benoeming tot hoogleraar in de moleculaire ontwikkelingszoölogie. De wereld is klein. Dat blijkt iedere keer maar weer. Als student scheikunde in Utrecht heb ik hier in Leiden een hoofdvak biotechnologie gedaan in de groep van professor Hooykaas en nu kruisen onze wegen elkaar weer. Siegfried de Laat heeft mij de kans gegeven om mijzelf te ontplooien, eerst als AIO en later als groepsleider binnen het Hubrecht. Tony Hunter, de ontdekker van fosfotyrosine en mijn mentor in San Diego. Ik heb zijn "*hands off*" begeleiding overgenomen en geïmplementeerd in mijn eigen lab. Alle AIO's en post-docs uit mijn groep van nu en uit het verleden. Zij hebben het werk gedaan waar ik zojuist over verteld heb. Normaal gesproken laat ik beeldvullende foto's zien van de mensen over wiens werk ik vertel. Ik weet dat sommigen blij zullen zijn dat ik dat vandaag niet heb kunnen doen. Eén naam heb ik nog niet genoemd: John Overvoorde. Hij is al jarenlang mijn handen in het lab. Ik wil mijn ouders, A en A, graag bedanken voor niet aflatende steun: ik heb toch een beetje het winkeltje van mijn vader overgenomen, wat ik al aankondigde toen ik een jaar of zeven was. Tot slot: er gaat niets boven het bestuderen van de ontwikkeling van primaten en dat doe ik graag in mijn vrije tijd. Samen met Thea volgen wij Tom, Fleur, Lynke en Jelmer en sinds een maand of drie Sybrich op de voet. Dat is ontwikkelingszoölogie!

Ik heb gezegd

Noten

- 1 Marx, JL (1982) Science 218, 1298.
- 2 Dijkgraaf, R (2008) Blikwisselingen, Uitgeverij Bert Bakker, 9-12.
- 3 In "The Proteus effect" by Parson, AB (2004) Joseph Henry Press, 130.
- 4 www.nobelprize.org.
- 5 Eckhart, W, Hutchinson, MA, Hunter, T (1979) Cell 18, 925-933.
- 6 Hunter, T, Sefton, B (1980) Proc Natl Acad Sci USA 75, 5917-5921.
- 7 Lemeer, S, Jopling, C, Gouw, J, Mohammed, S, Heck, AJR, Slijper, M, Den Hertog, J (2008) Mol Cell Prot, 7, 2176-2187.
- 8 Hunter, T (2007) J Clin Invest 117, 2036-2043.
- 9 Tonks, NK, Diltz, CD, Fischer, EH (1988) J Biol Chem 263, 6722-6730.
- 10 Elchebly M et al. (1999) Science 283, 1544-1548.
- 11 Den Hertog, J, Pals, CE, Peppelenbosch, MP, Tertoolen, LG, De Laat, SW, Kruijjer, W (1993) EMBO J 12, 3789-3798.
- 12 Zheng XM, Wang Y, Pallen CJ (1992) Nature 359, 336-339.
- 13 Buist, A, Blanchetot, C, Tertoolen, LG, Den Hertog, J (2000) J Biol Chem 275, 20754-20761.
- 14 Den Hertog, J, Tracy, S, Hunter, T (1994) EMBO J 13, 3020-3032.
- 15 Blanchetot, C, Tertoolen, LG, Den Hertog, J (2002). EMBO J, 21, 493-503.
- 16 Groen, A, Lemeer, S, Van der Wijk, T, Overvoorde, J, Heck, AJR, Ostman, A, Barford, D, Slijper, M, Den Hertog, J (2005) J Biol Chem 280, 10298-10304.
- 17 Bilwes, AM, Den Hertog, J, Hunter, T, Noel, JP (1996) Nature 382, 555-559.
- 18 Van der Wijk, T, Blanchetot, C, Overvoorde, J, Den Hertog, J (2003) J Biol Chem 278, 13968-13974.
- 19 Barr AJ et al. (2009) Cell 136, 352-363.
- 20 Jopling, C, Den Hertog, J (2005) EMBO Rep 6, 426-431.
- 21 Jopling, C, Van Geemen, D, Den Hertog, J (2007) PLoS Genetics 3, e225.

PROF.DR. JEROEN DEN HERTOOG



- 1983 - 1988 Studie Scheikunde, Universiteit Utrecht
15 juni 1992 Promotie. Titel van het proefschrift:
 “Phosphotyrosine and neuronal differentiation.
 Of kinases and phosphatases”, Universiteit
 Utrecht.
- 1992 - 1994 Postdoctoraal onderzoeker, Koningin
 Wilhelmina Fonds/ Nederlandse
 Kankerbestrijding fellow, The Salk Institute, La
 Jolla, California, USA.
- 1994 - 1997 Projectleider, Hubrecht Laboratorium, Utrecht.
1997 - heden Groepsleider, Hubrecht Institute, Utrecht.
2008 - heden Adjunct directeur onderzoek, Hubrecht
 Instituut, Utrecht.
- 1 mei 2008 Benoeming als hoogleraar bij de faculteit
 Wiskunde en Natuurwetenschappen, binnen
 het Instituut Biologie Leiden met als leerop-
 dracht: moleculaire ontwikkelingszoölogie.

De ontwikkeling van bevruchte eicel tot een heel organisme wordt gereguleerd door signalen tussen cellen. Eén van de belangrijkste mechanismes van signaaloverdracht tussen cellen is fosforylering van eiwitten, wat gereguleerd wordt door twee klassen van enzymen, de kinases en de fosfatases. Jeroen den Hertog heeft door middel van biochemische en celbiologische analyses bijgedragen aan een beter begrip van de regulatie van tyrosine fosfatases. Binnen zijn lab wordt de zebra vis gebruikt als modelsysteem om de rol van tyrosine fosfatases in de vroege ontwikkeling van gewervelde dieren te bestuderen. Dit heeft geleid tot identificatie van essentiële functies van tyrosine fosfatases tijdens de gastrulatie en tot betere inzichten in de rol van tyrosine fosfatases in ziektes bij de mens.



Universiteit Leiden