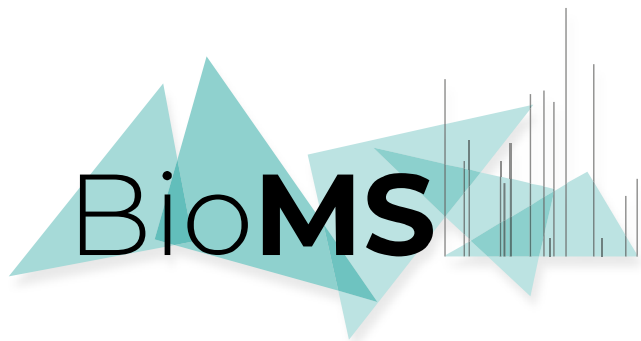
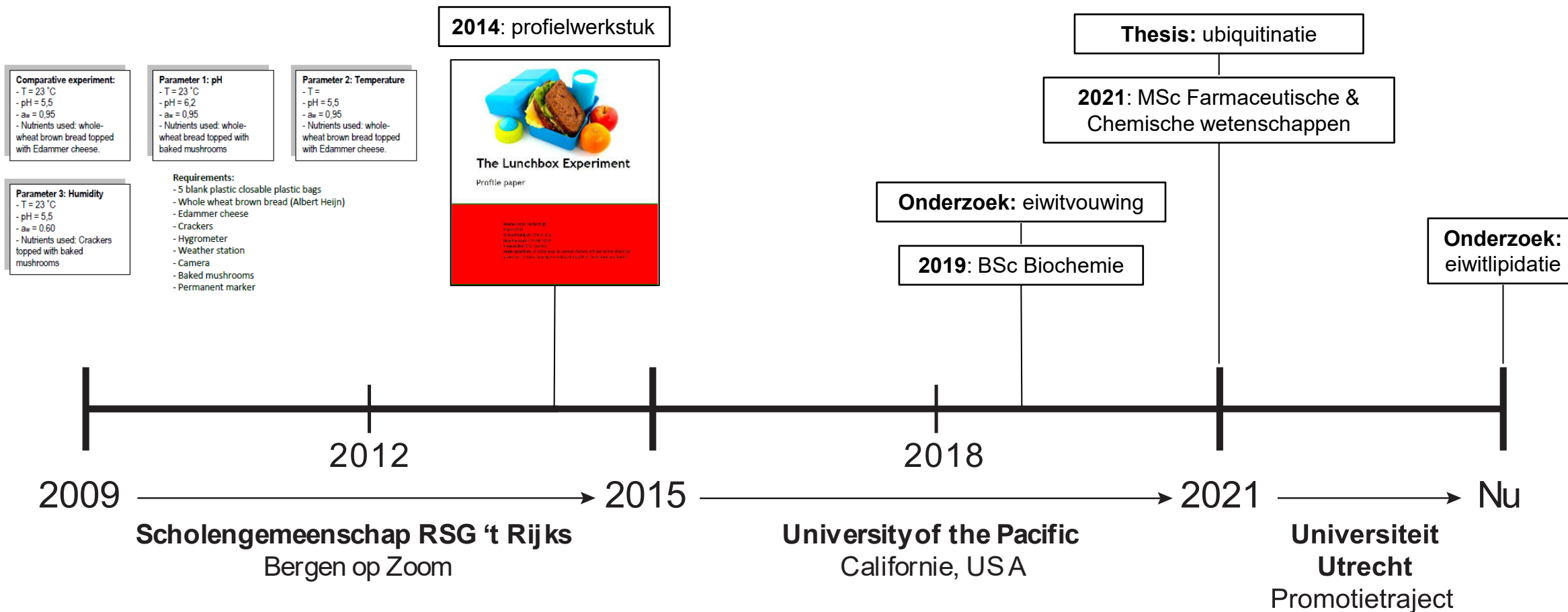




Grip krijgen op een vette modificatie van eiwitten

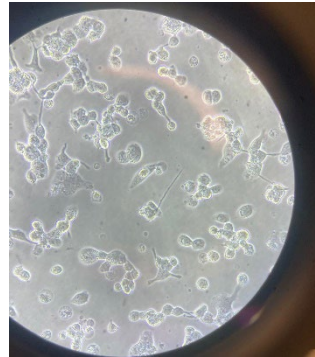
Roos Nederstigt

Woudschoten Chemie Conferentie, 8 November 2024

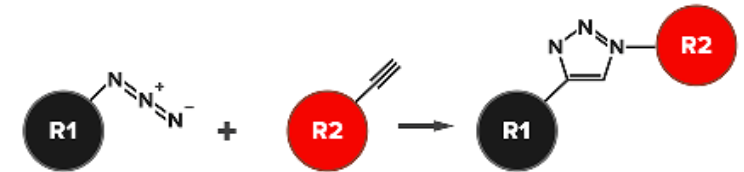




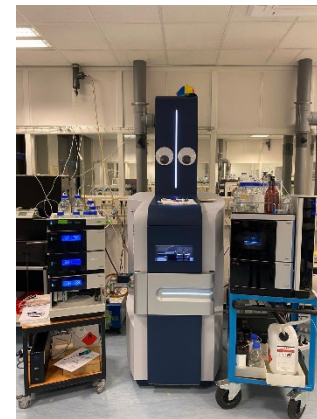
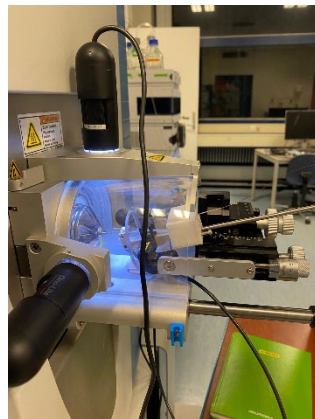
Onderzoek:
eiwitlipidatie



Cel- en moleculaire biologie



Chemische biologie



Analytische chemie

MSFR[⚡]GER



Data analyse

→ 2021 → Nu
Universiteit
Utrecht
Promotietraject

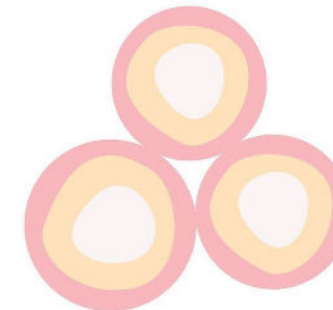


1. Hoe classificeren we vetten?
2. Eiwitten en post-translationele modificaties
3. Eiwitlipidatie
4. Proteomics
5. Hoe wordt **eiwitlipidatie** bestudeerd?
 1. Uitdagingen
 2. Indirecte methoden
 3. Directe methoden
6. Toekomstperspectieven



Vetten worden geclassificeerd op basis van meerdere criteria

Vetten = een koepelterm voor een groep macromoleculen die niet oplosbaar is in water, maar wél in nonpolaire vloeistoffen zoals chloroform, alkanolen en sommige koolwaterstoffen

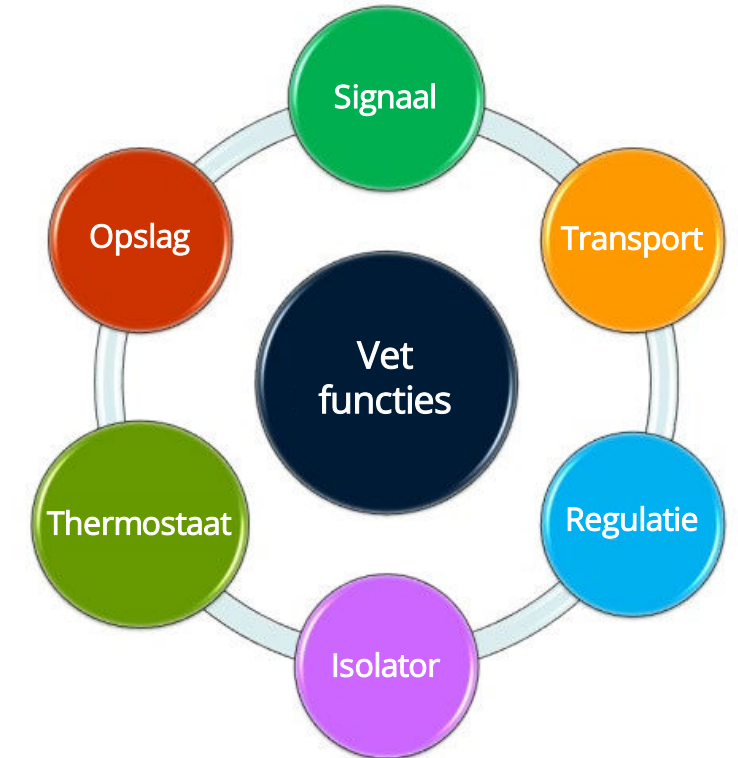
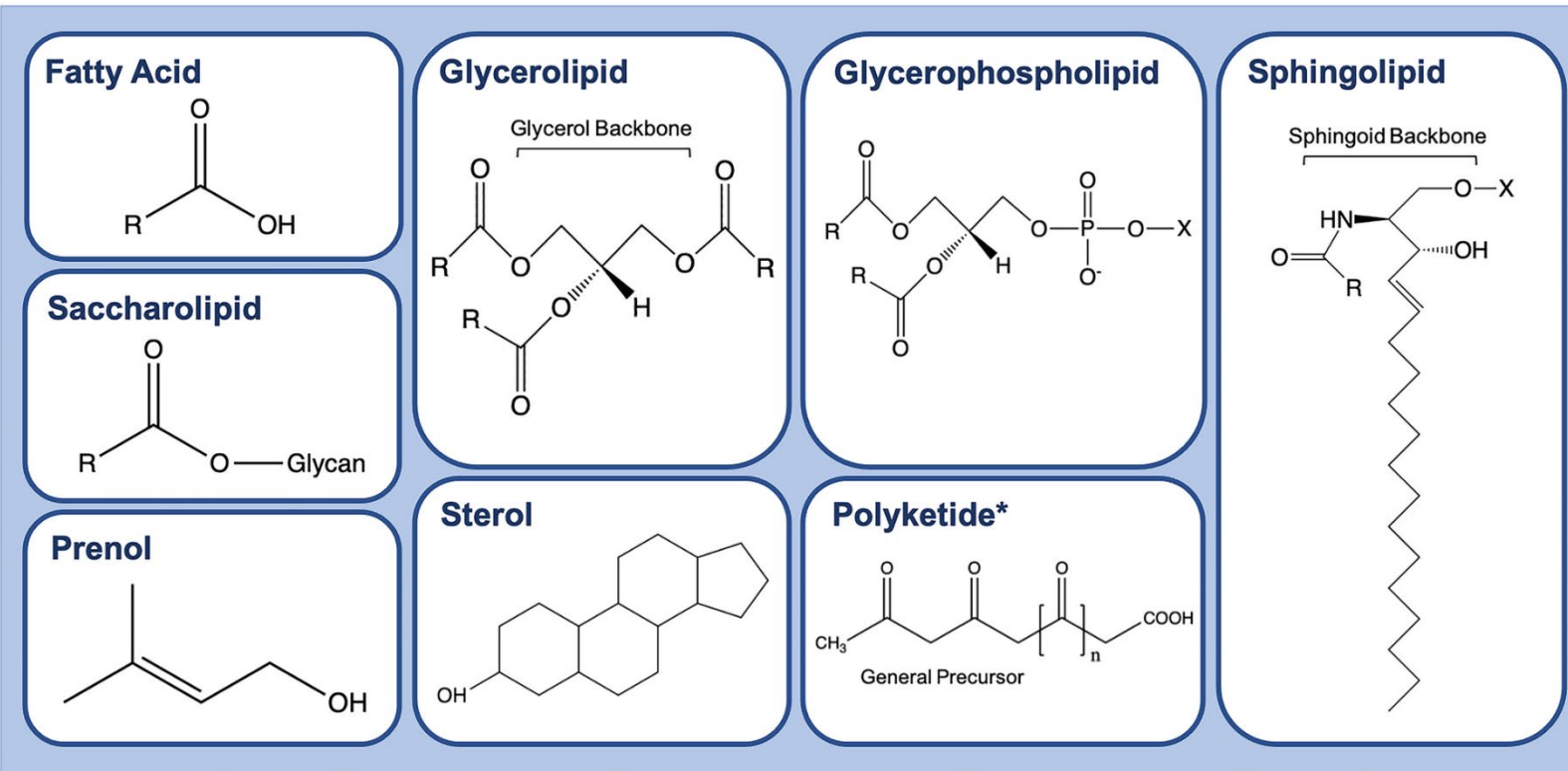


Normale cel

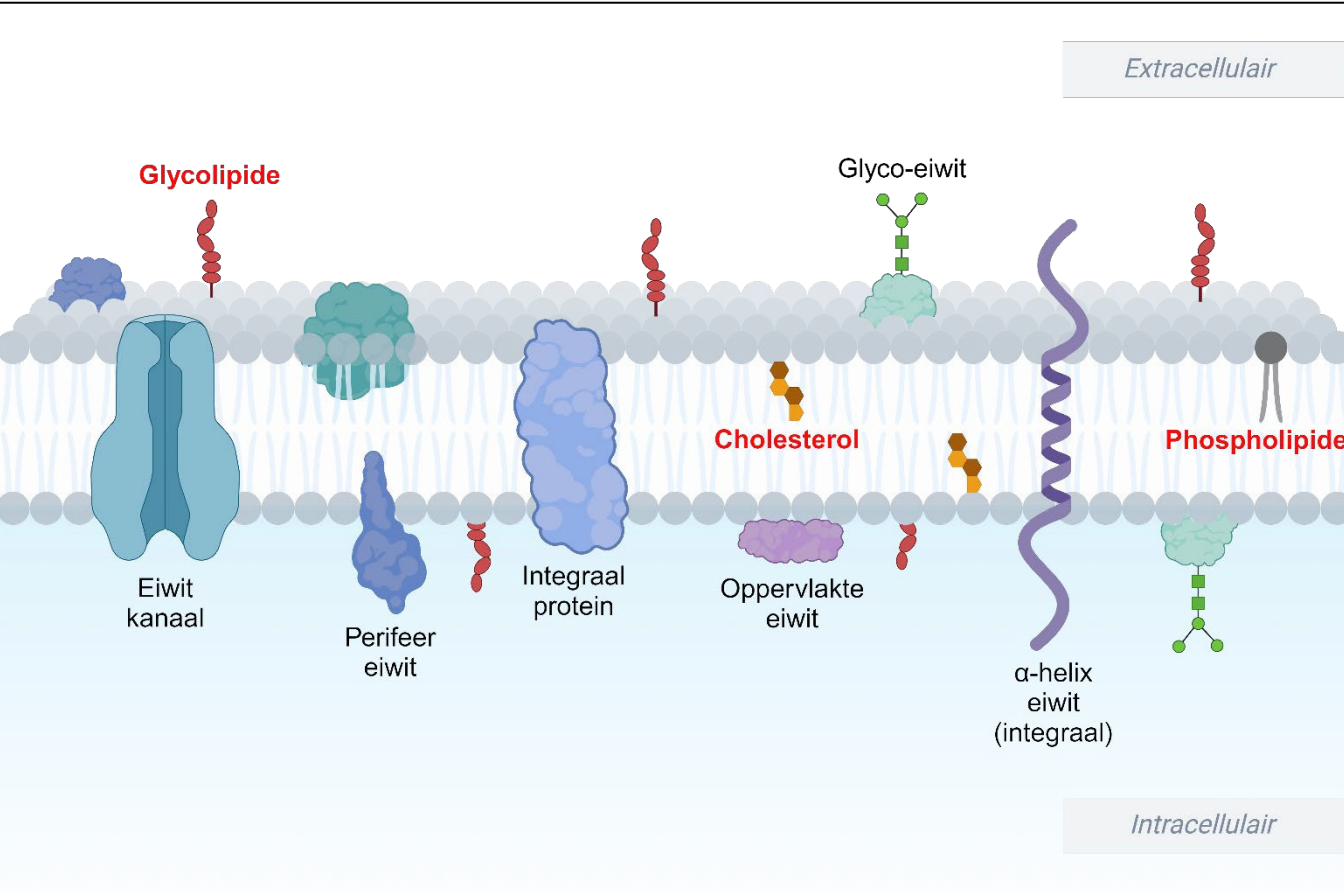


Kanker cel

Een belangrijk criterium is chemische structuur



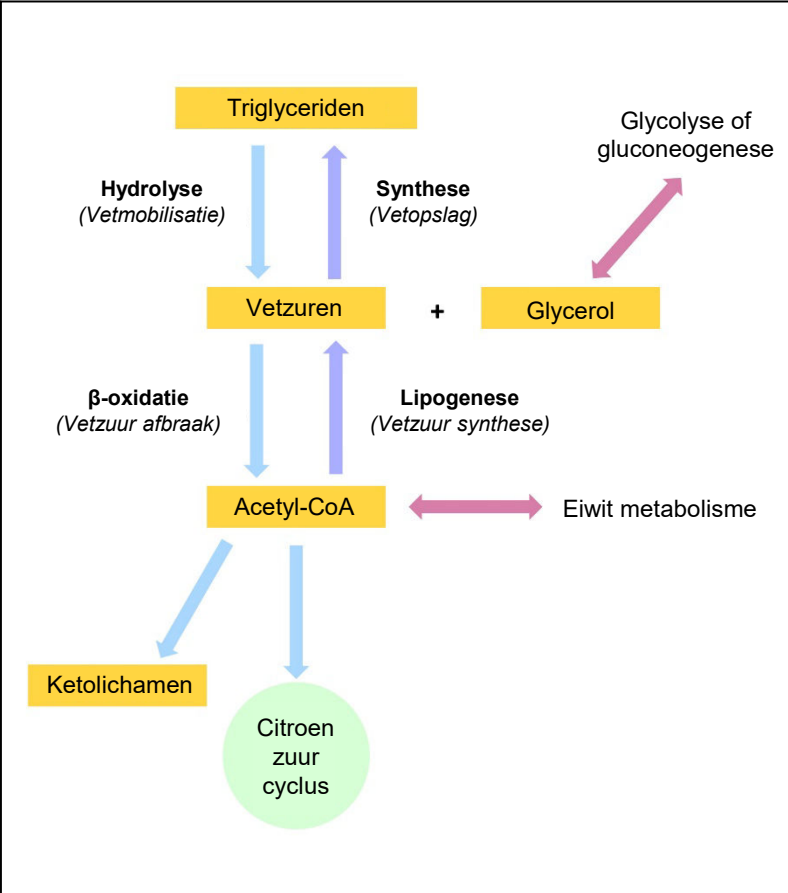
Bescherming



Hormonen/vitaminen



Energieopslag



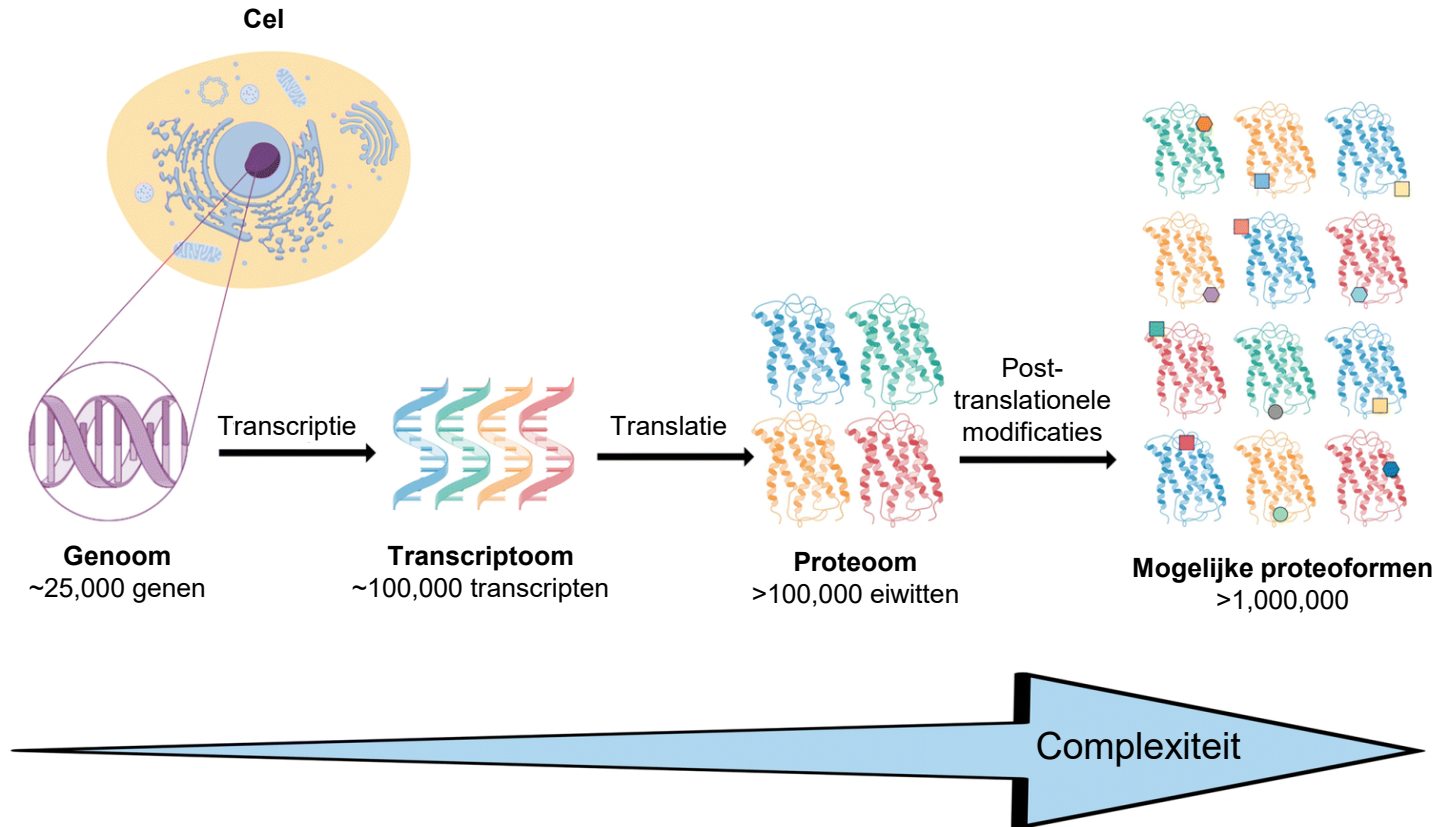
Lipidoom

het complete landschap van lipiden in een cel, organel of weefsel op een specifiek moment

Lipidomics

Het in kaart brengen van dit landschap (identificatie & kwantificatie) in (verschillende) biologische systemen

Maar, is er nog meer?

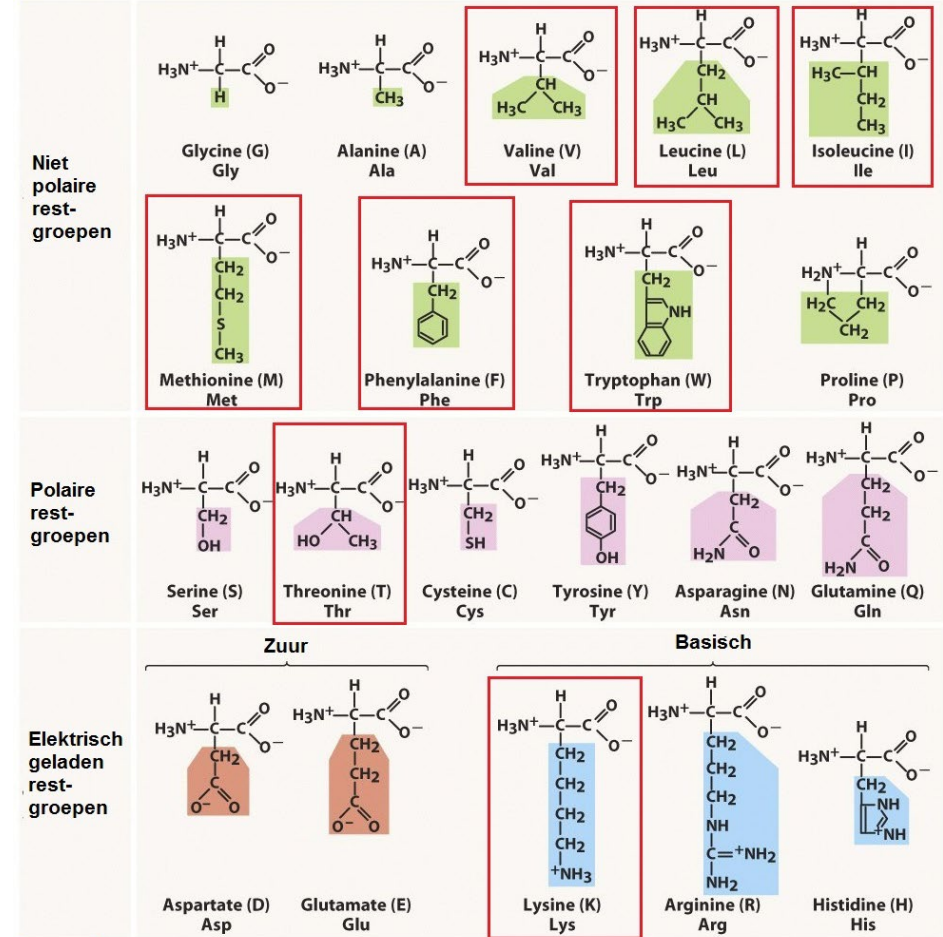


Structuurformules en structuren

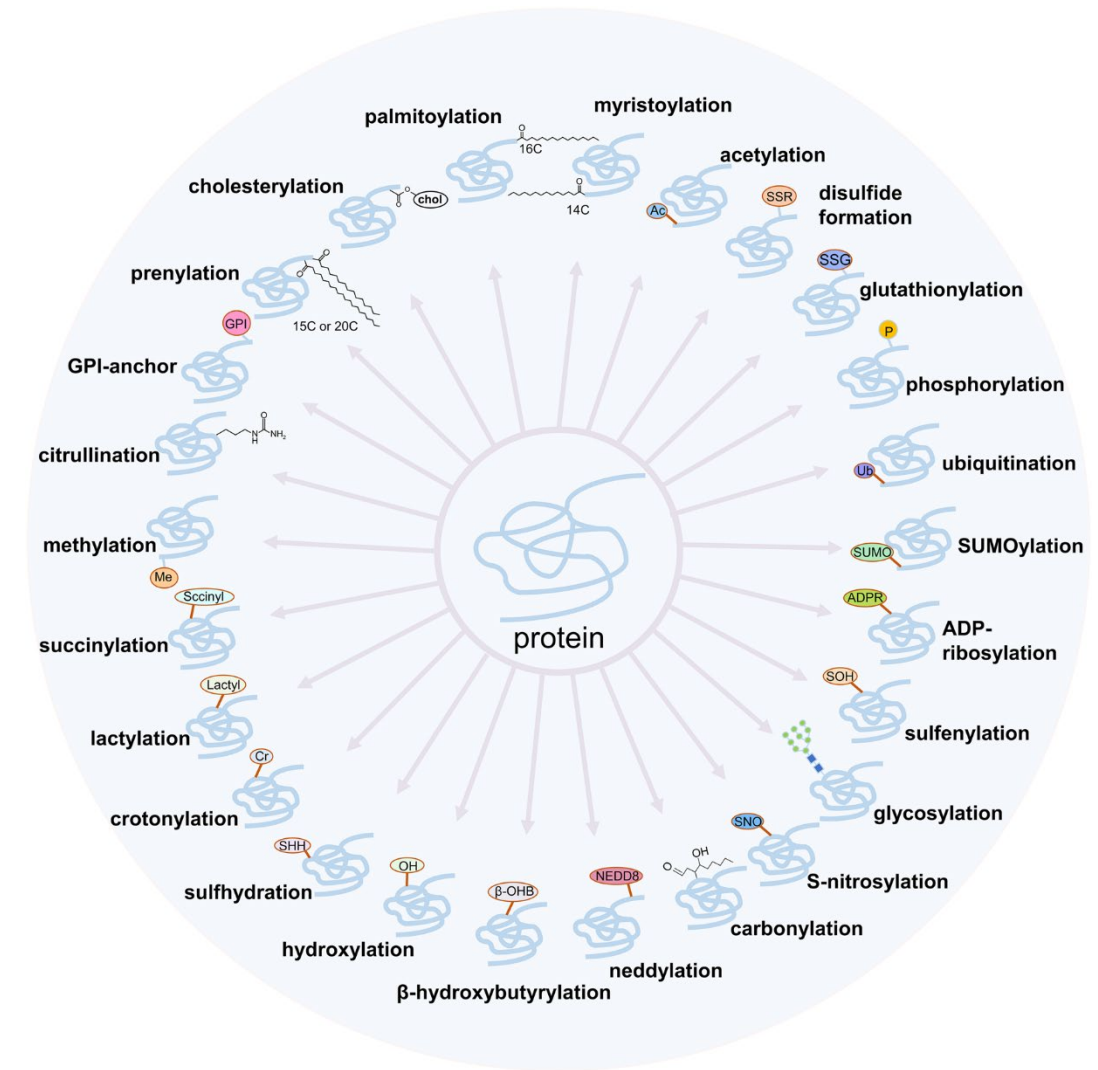
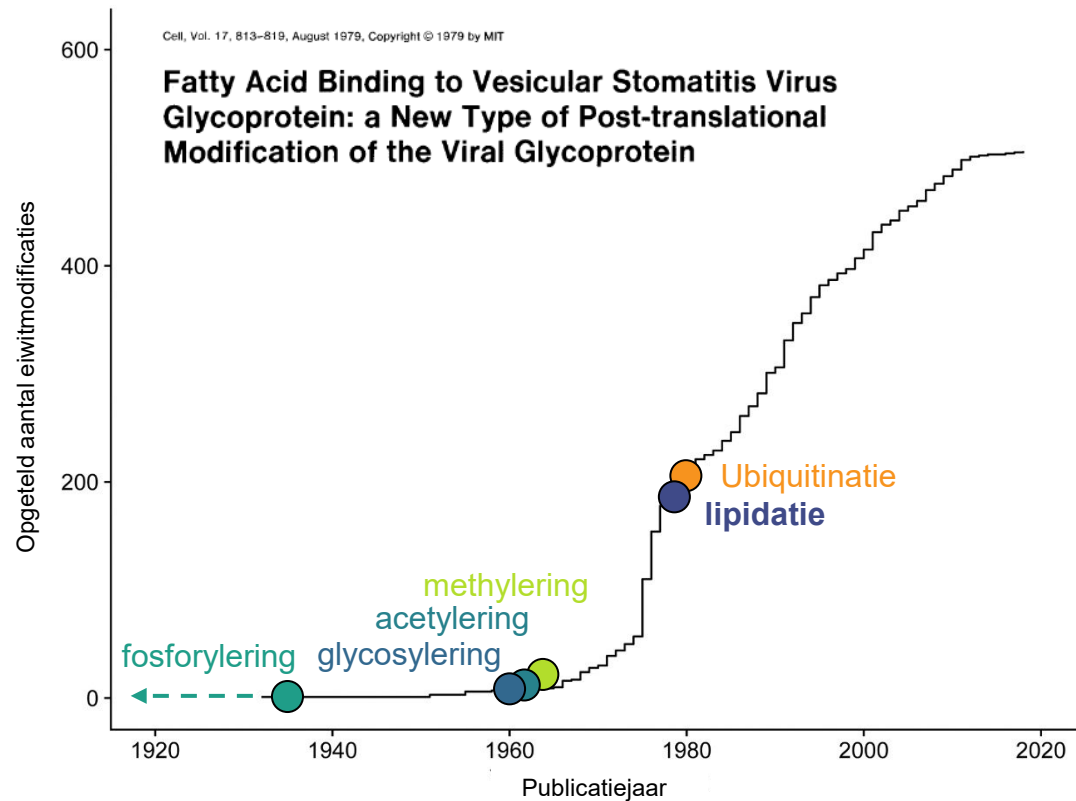
67

Aminozuren en eiwitten

H



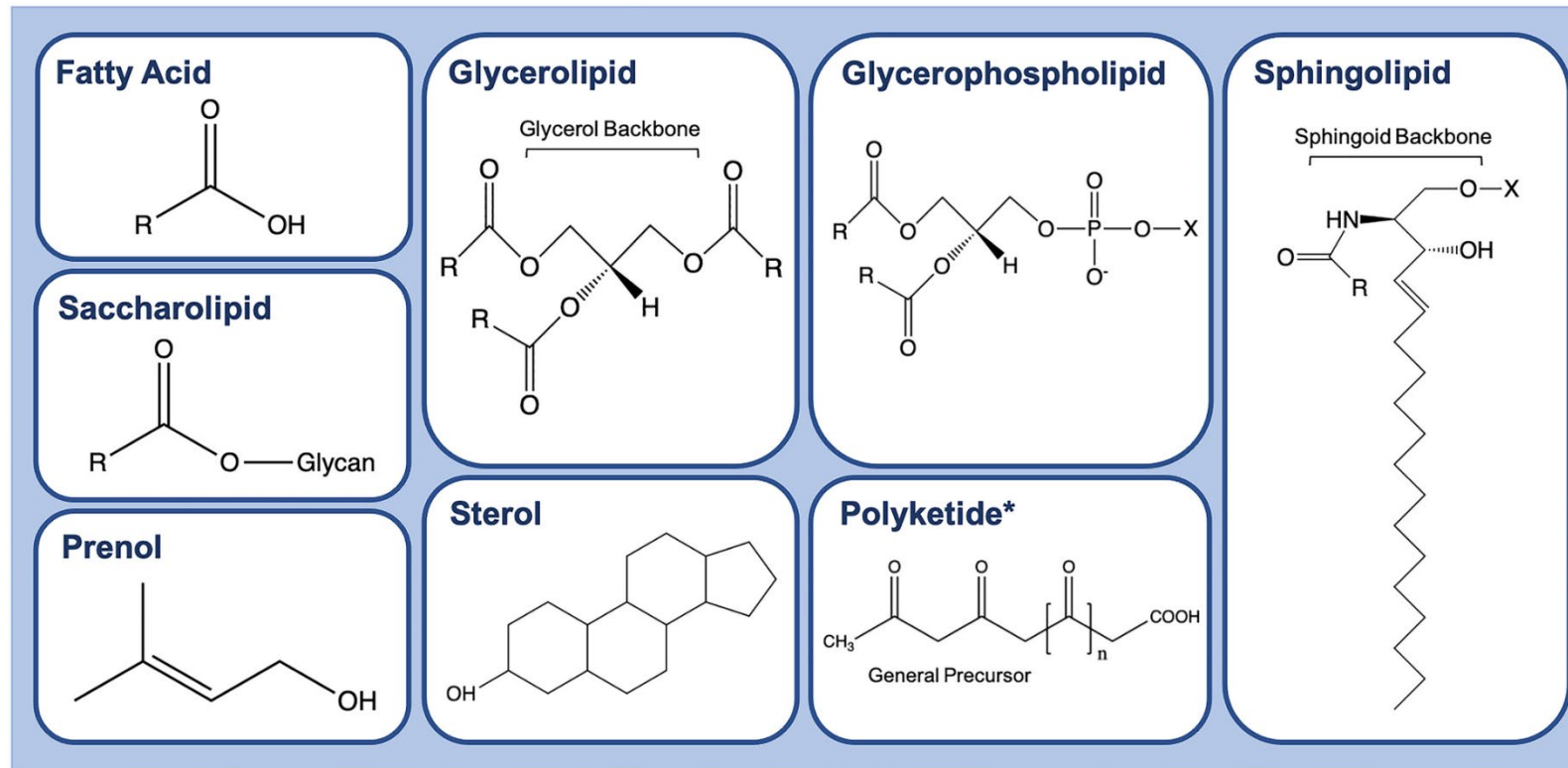
Essentiele aminozuren



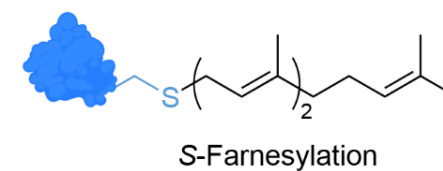
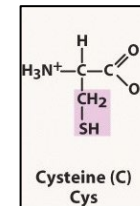
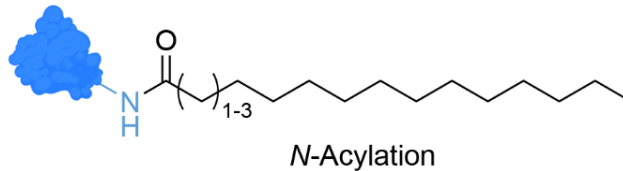
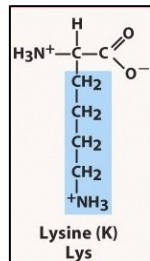
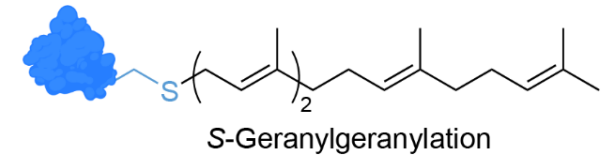
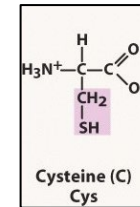
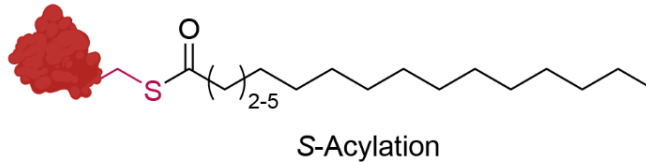
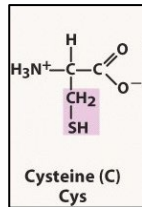
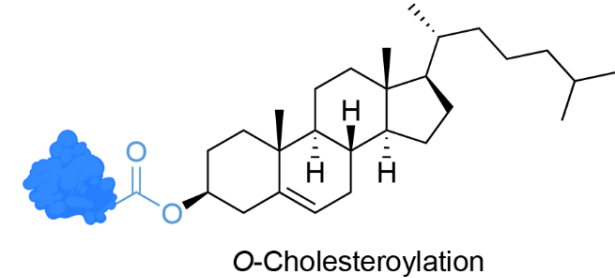
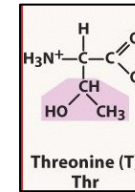
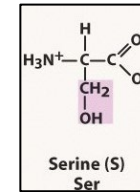
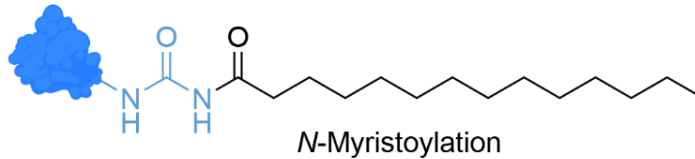
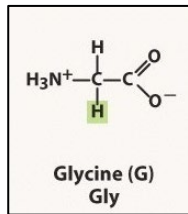
Keenan, E. K., et al. (2021). "Discovering the landscape of protein modifications." *Molecular Cell* **81(9)**: 1868-1878

Yuan, Y., Li, P., Li, J. et al. Protein lipidation in health and disease: molecular basis, physiological function and pathological implication. *Sig Transduct Target Ther* **9**, 60 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01759-7>

= de covalente binding van lipiden (vaak vetzuren) aan eiwitten

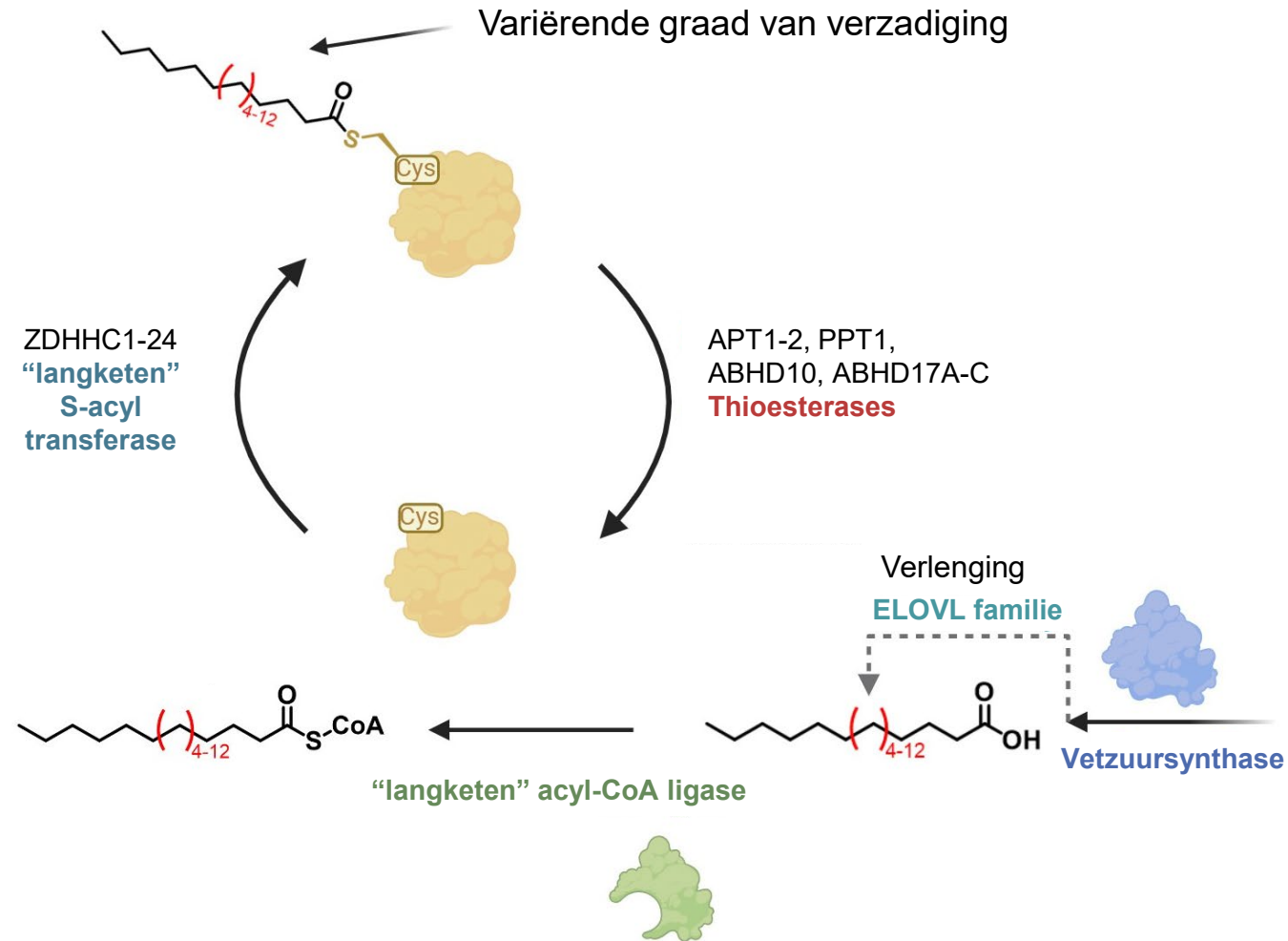


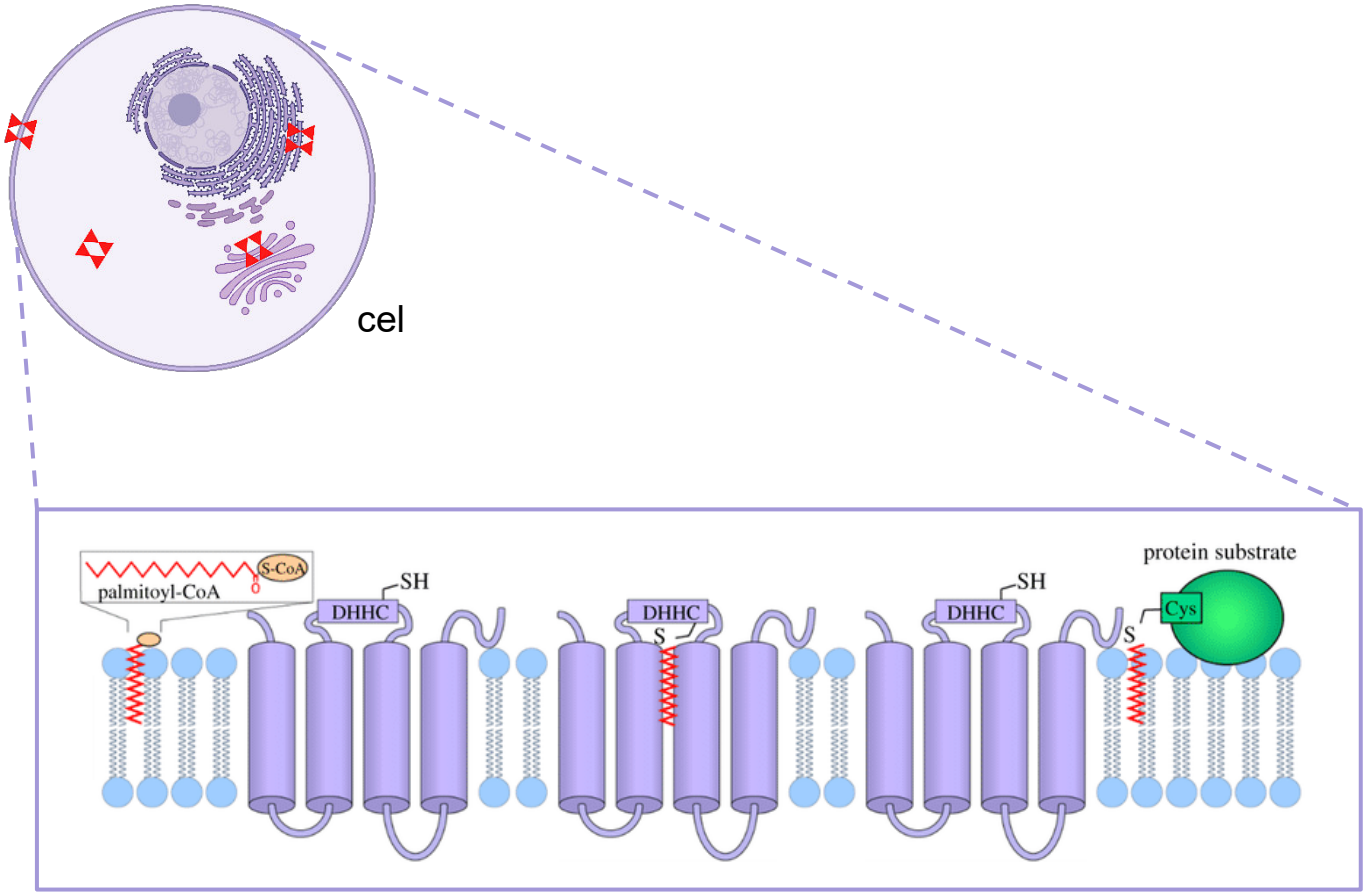
Eiwitlipidatie kan plaatsvinden op meerdere aminozuren via thioester, amide- en oxyesterverbindingen.



prenylatie

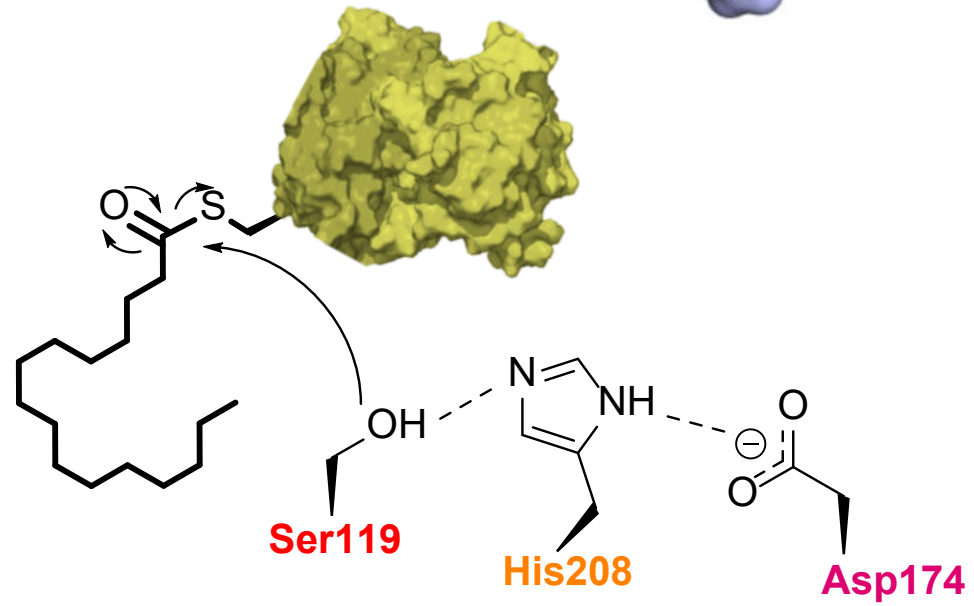
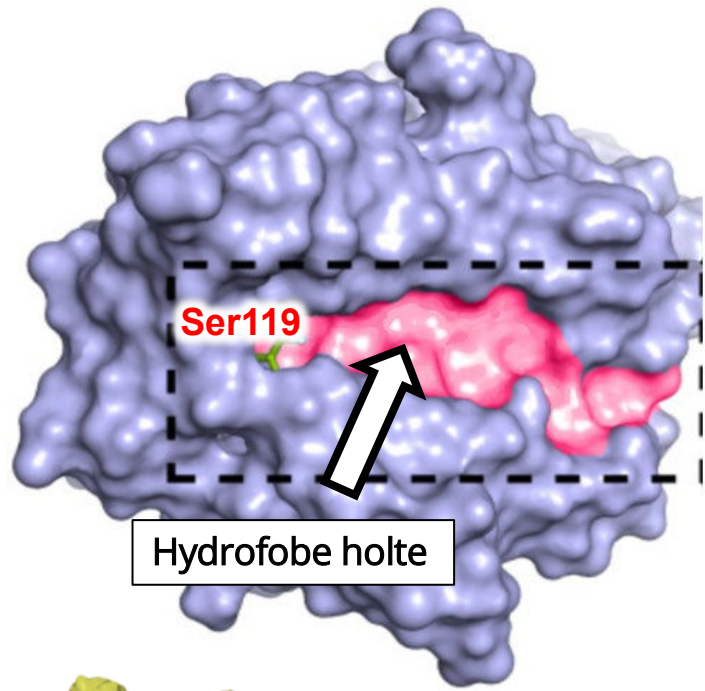
Eiwit S-acylatie wordt enzymatisch gecontroleerd (omkeerbaar)



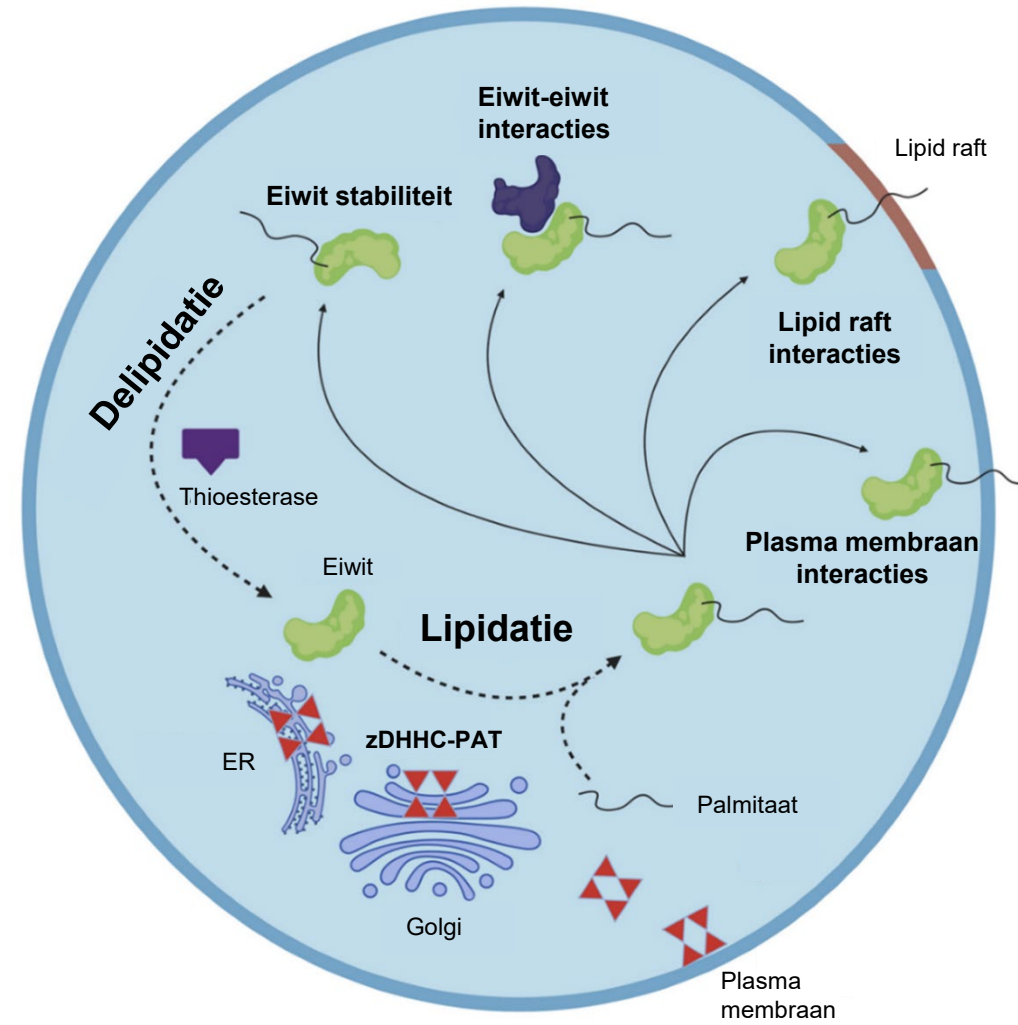


 **“schrijvers”** bevinden zich voornamelijk in membranen

“Gummen”

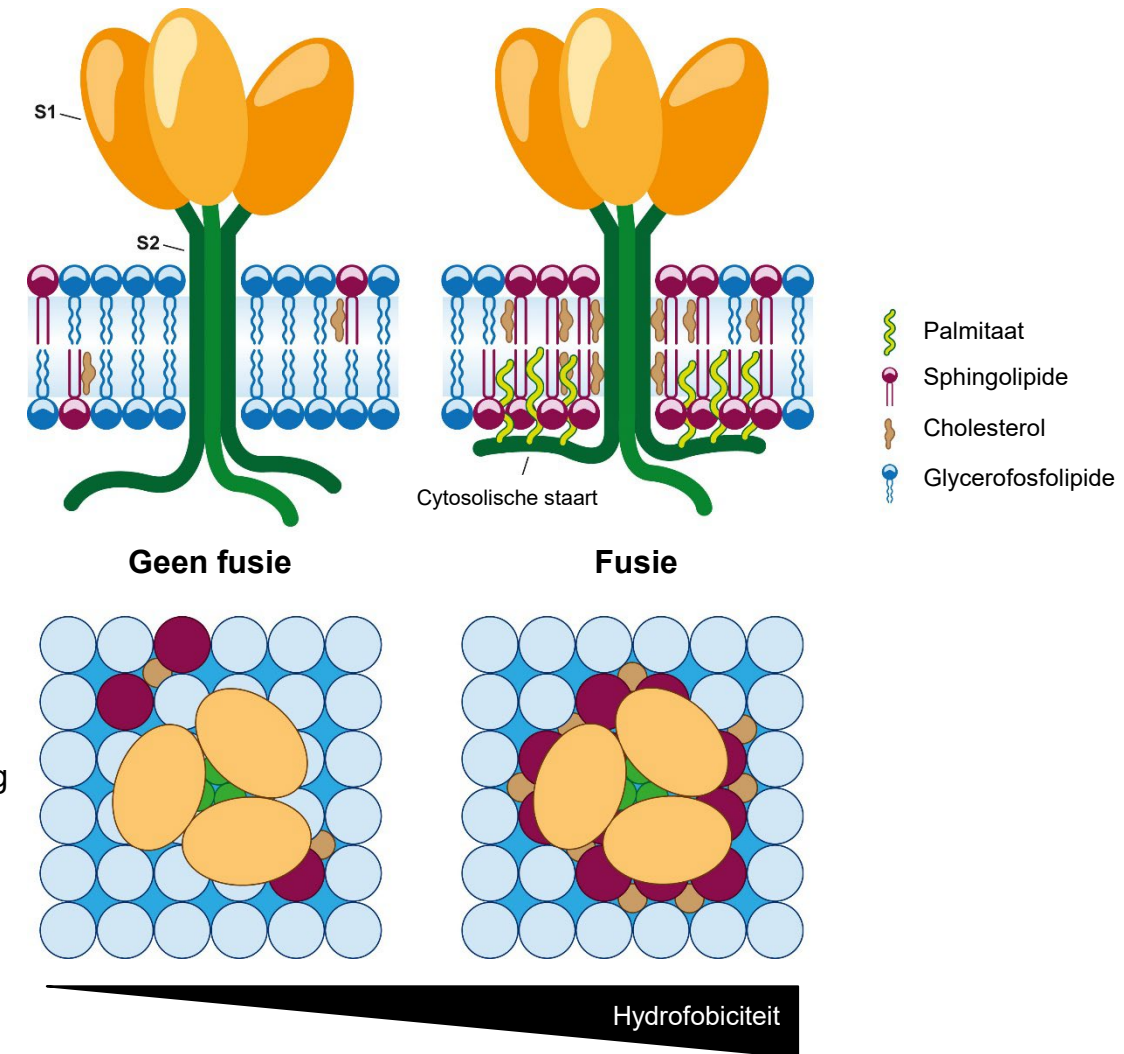


Eiwitlipidatie heeft vele belangrijke biologische functies



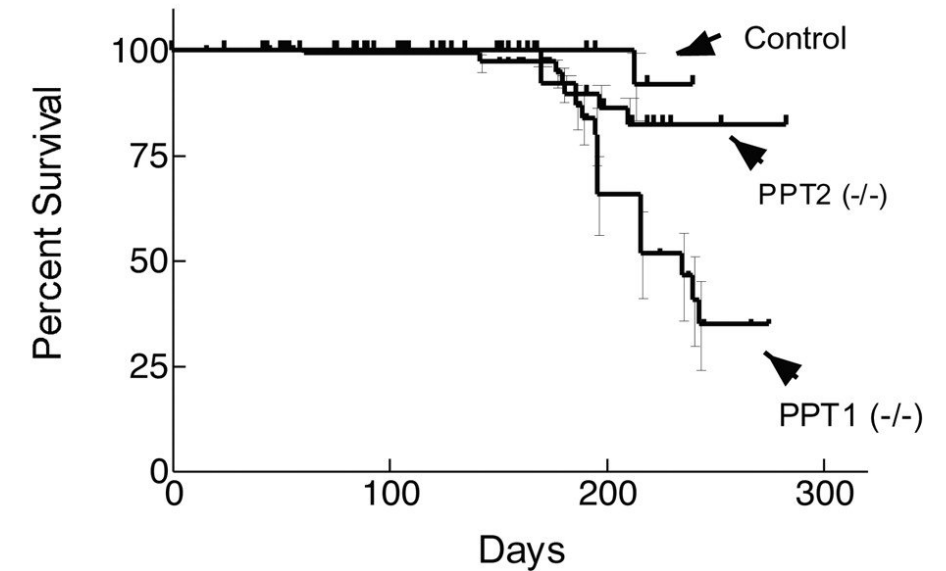
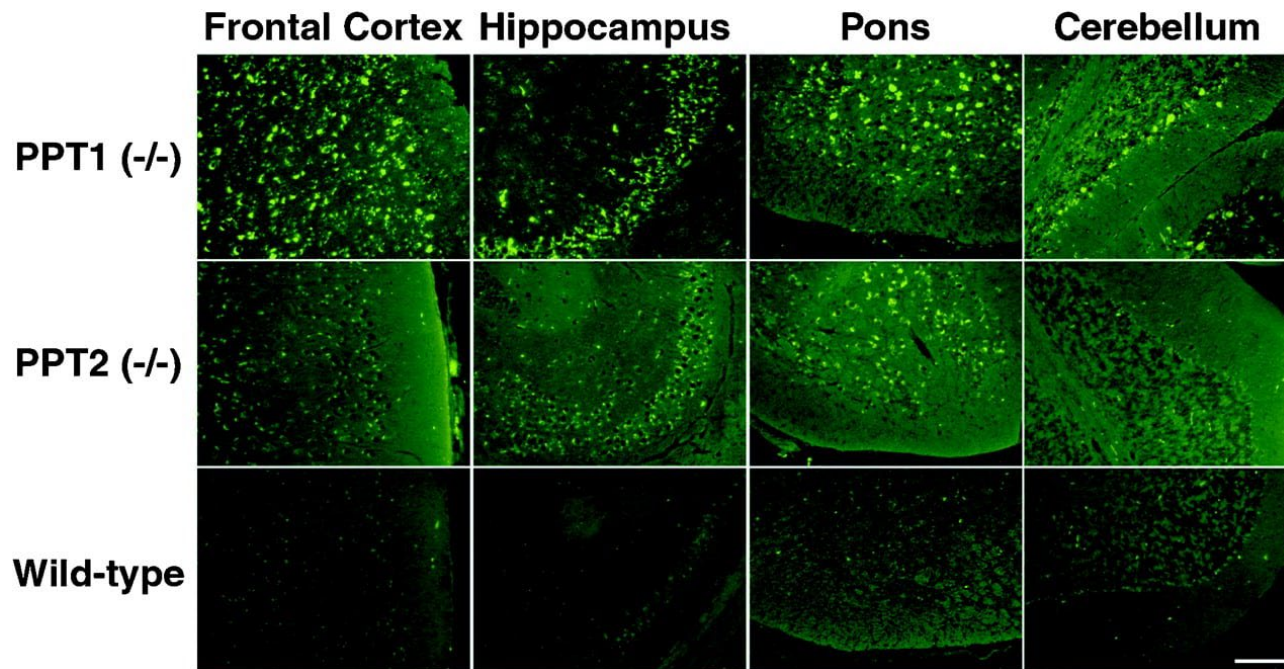
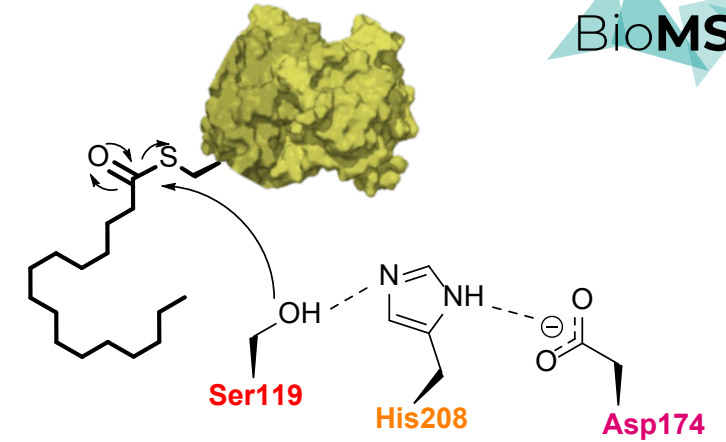
- SARS-CoV-2 spike protein herkent receptor ACE2
- Dit leidt tot de fusie van de membranen van het virus en de menselijke cel.

Zonder S-acylatie van het spike protein, kan deze fusie niet plaatsvinden, en is het virus niet in staat tot infectie.



Voorbeeld: neuronale ceroid lipofuscinoses (NCL)

- Stofwisselingsziekte met als gevolg hersen-en oogschade
- Resultaat van één genmutatie in PPT1 (Palmitoyl Protein Thioesterase 1)
- Ziekte van Batten



Gupta, P., et al. (2001). "Disruption of PPT1 or PPT2 causes neuronal ceroid lipofuscinosis in knockout mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98(24)**: 13566-13571.



Hoe kunnen we alle **gelipideerde eiwitten** in een cel, op een bepaald moment, **meten**?

PROTEOMICS

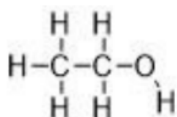
1. Workflow
2. Eiwitten vs. peptides
3. Mengsel complexiteit reduceren (chromatografie)
4. Hoe identificeren we een eiwit?
5. Detectie van **gelipideerde eiwitten**?



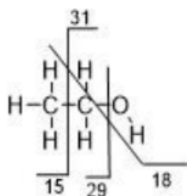
45

formules	m/z -verhouding	piekhoogte
$C_2H_5Br^+$ met Br-79	108	Laag, want instabiel
$C_2H_5Br^+$ met Br-81	110	Laag, want instabiel. Met vorige 1:1
CH_3Br^+ met Br-79	93	
CH_3Br^+ met Br-81	95	Met vorige 1:1
CH_3^+	15	hoog
$C_2H_5^+$	29	hoog

46 a



b



c

formules	m/z -verhouding
CH_3^+	15
$C_2H_5^+$	29
CH_2OH^+ (46 - 15)	31
$C_2H_5OH^+$	46

d Een molecuul-ion ($m/z = 46$) is vaak een instabiel deeltje. Komt dus weinig voor op een massaspectrum in vergelijking met een brokstuk zoals CH_3^+ .

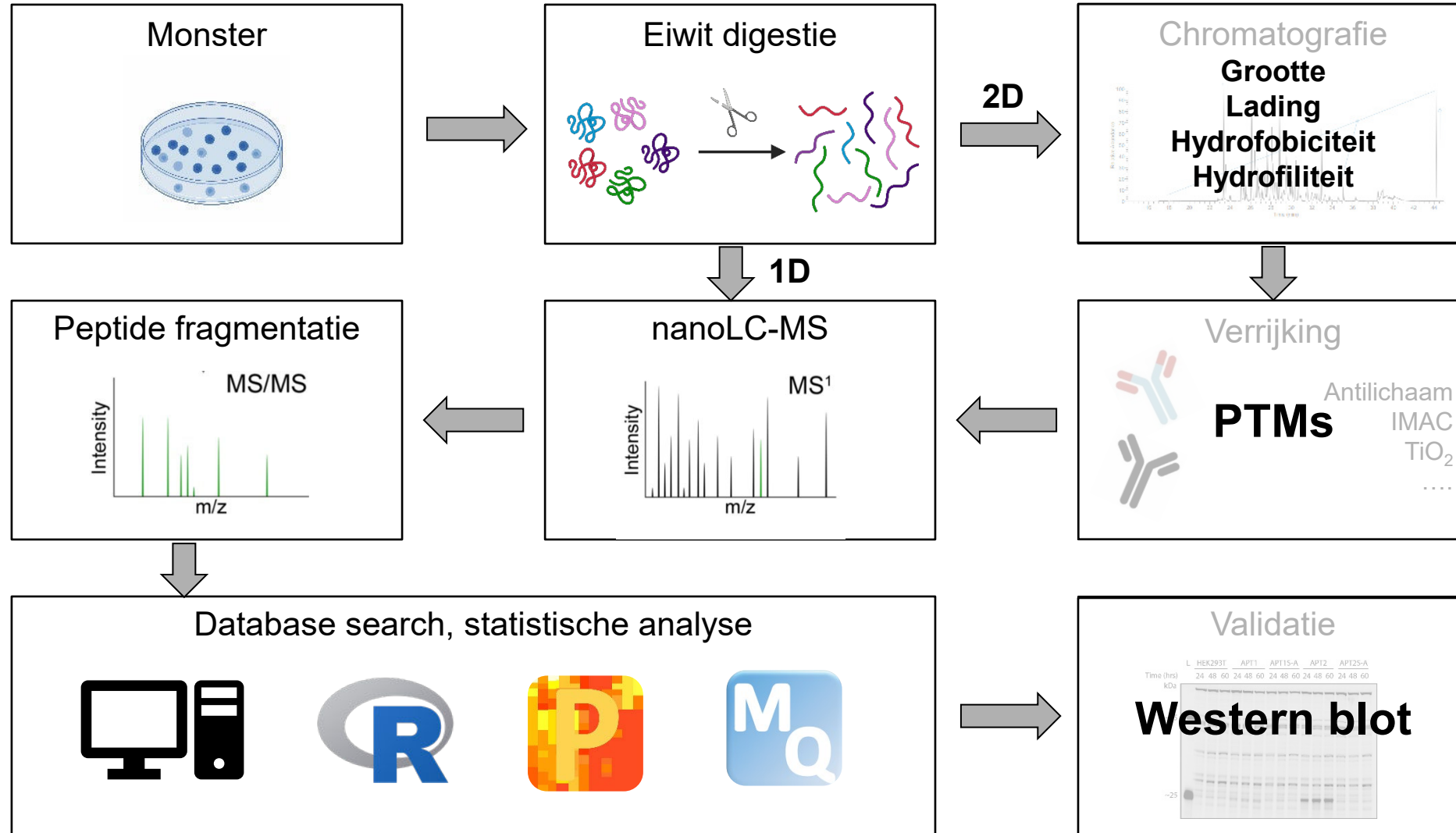
Proteomics

Type analyse die zich focust op één groep organische moleculen, eiwitten, met als doel ze te meten & identificeren met massaspectrometrie

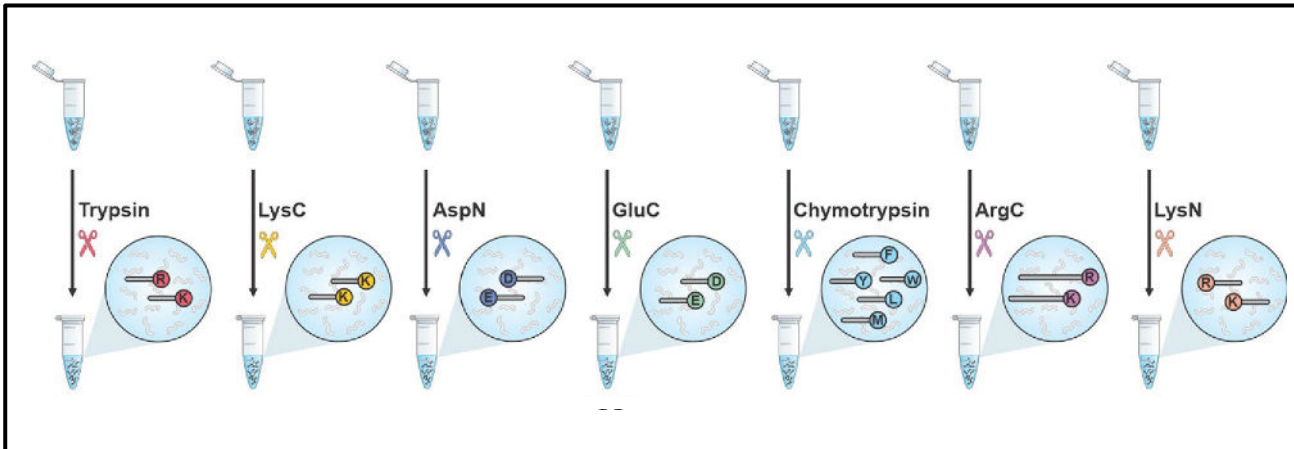
Eventueel "plus" onderwerp binnen het hoofdstuk "industriële chemie"



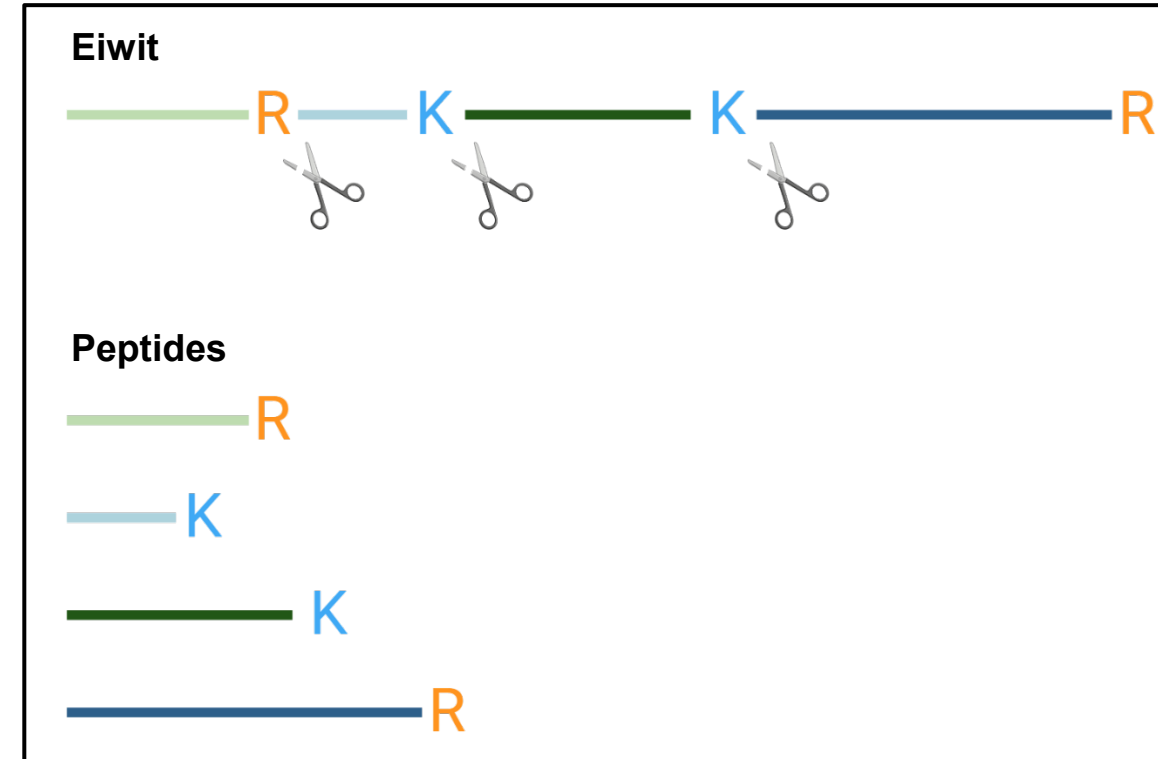
Overview van een proteomics workflow



Proteases knippen eiwitten op specifieke locaties

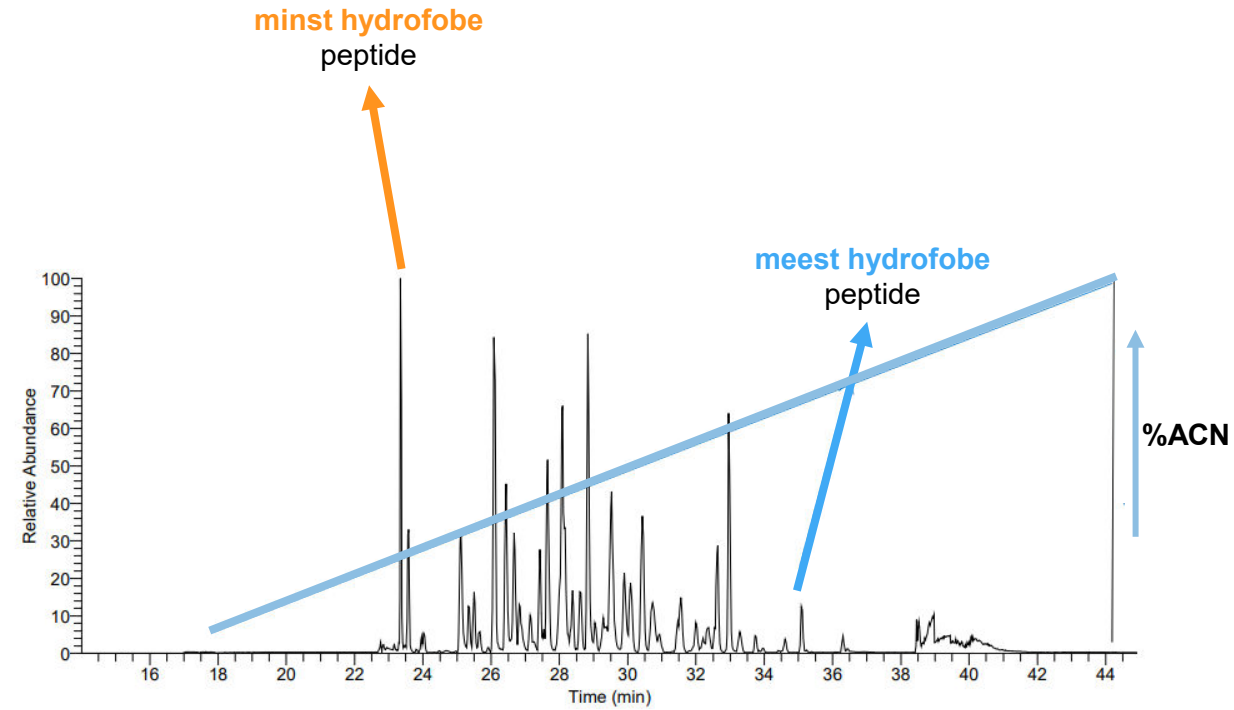
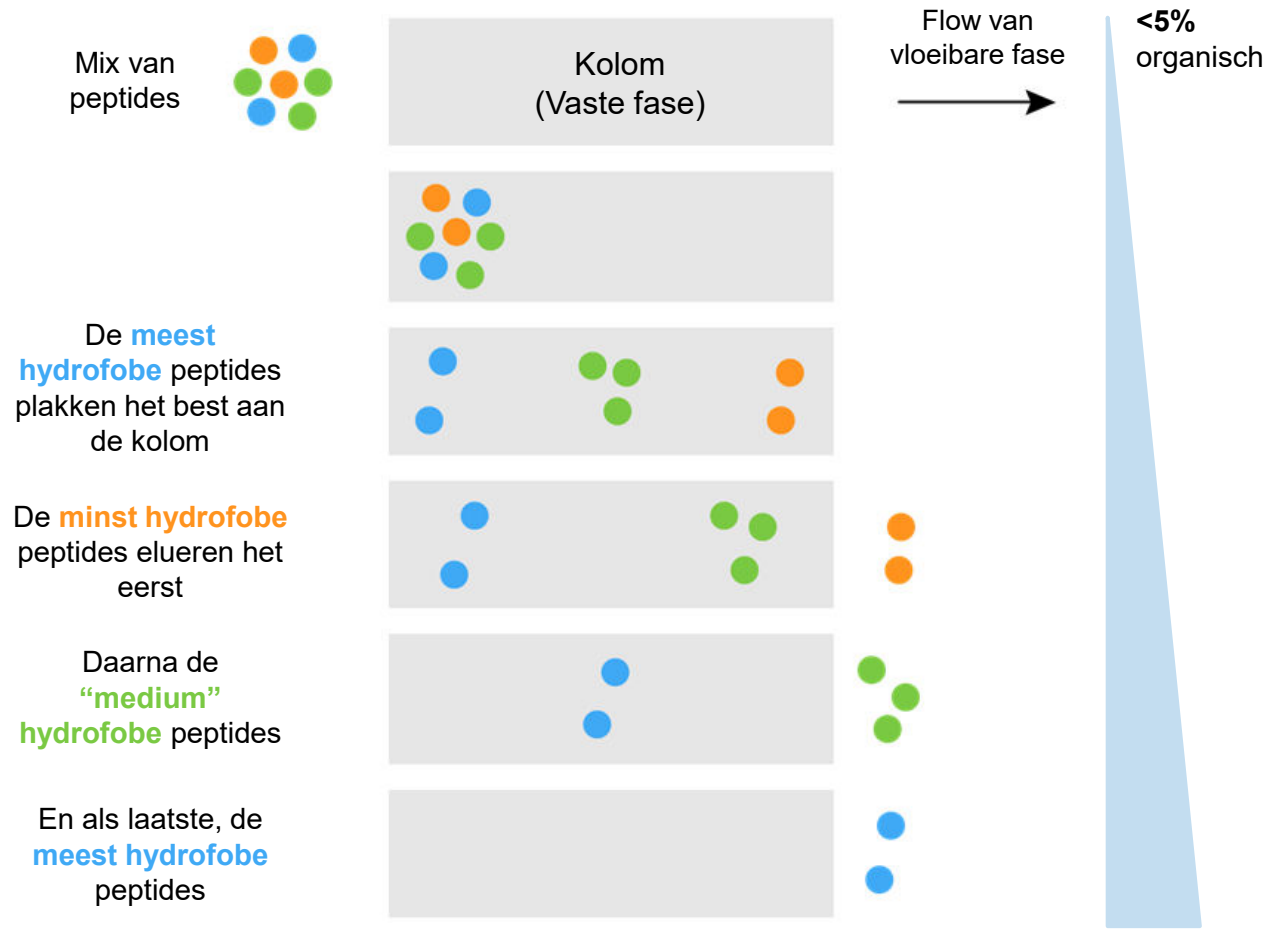


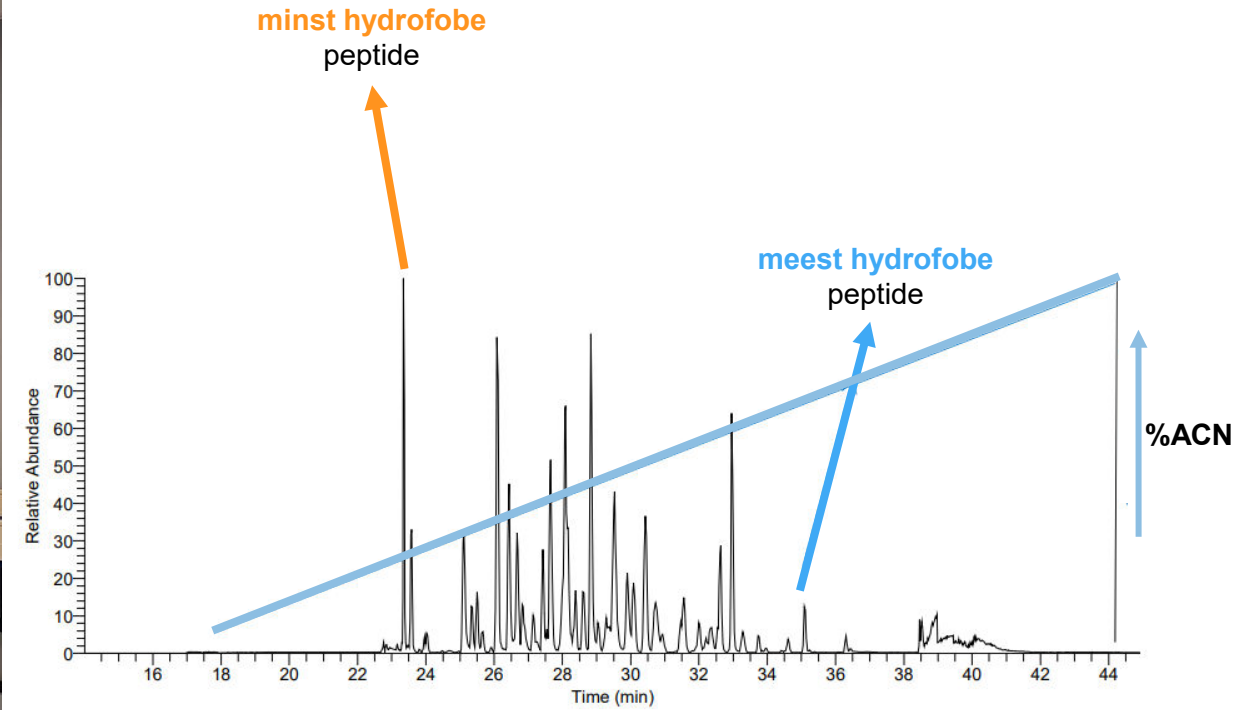
Trypsine knipt eiwitten na
arginine en lysine





Reverse phase liquid chromatography (RP-LC)





Peptides scheiden op basis van een tweede karaktereigenschap naast hydrofobiciteit

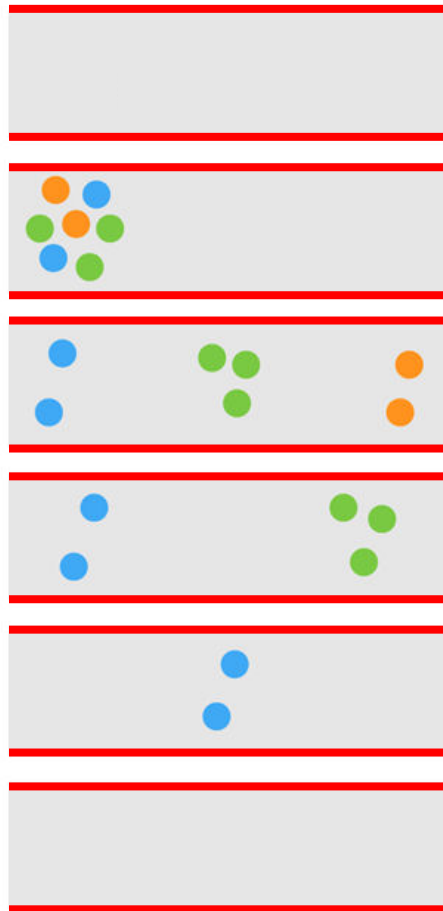
- **Positieve lading:** strong cation exchange (SCX)
- **Negatieve lading:** strong anion exchange (SAX)
- **Hydrofiliteit:** hydrophilic interaction LC (HILIC)
- **Grootte:** size exclusion chromatography (SEC)
- **Affiniteit:** immobilized metal affinity chromatography (IMAC)



Mix van
peptides



SCX

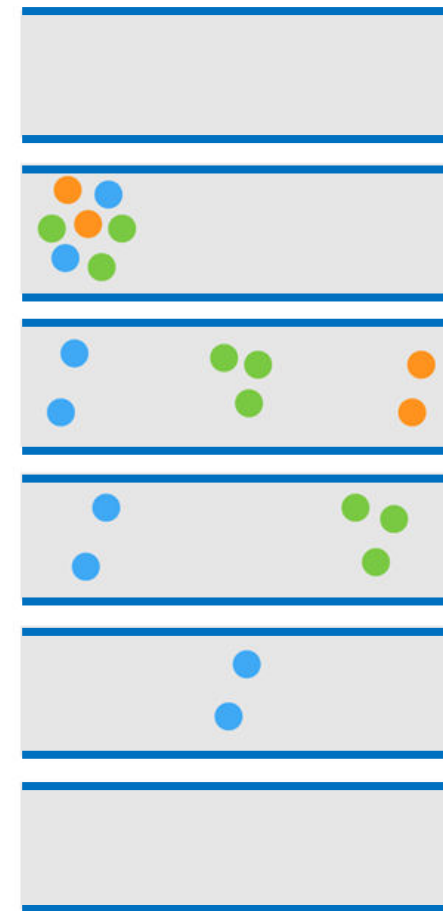


2+

3+

>3+

SAX



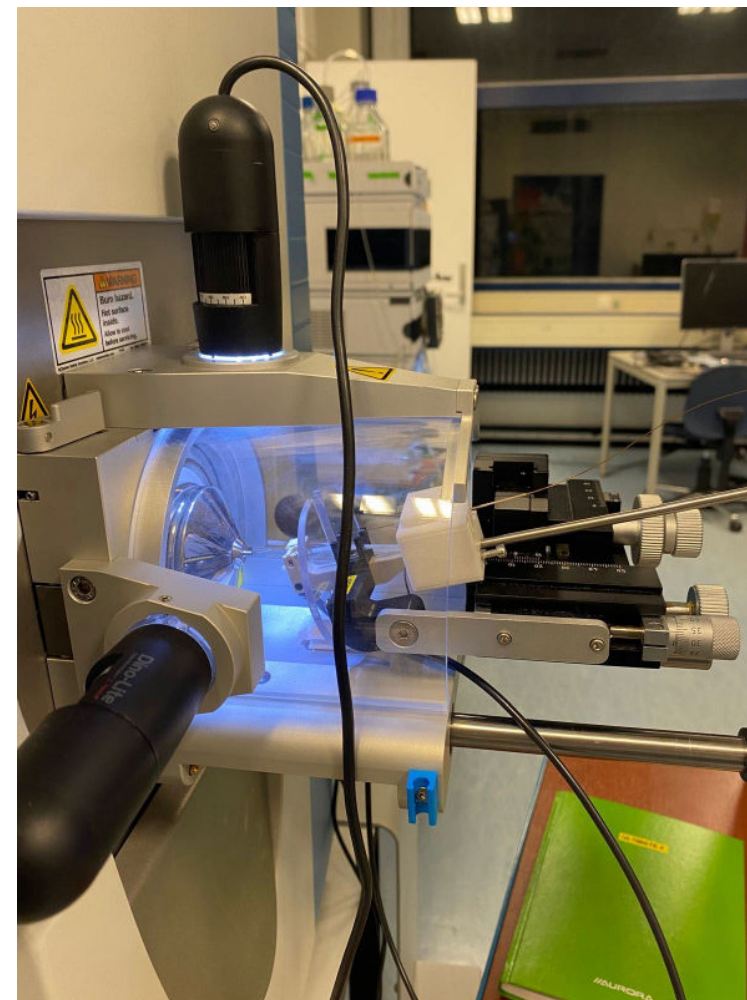
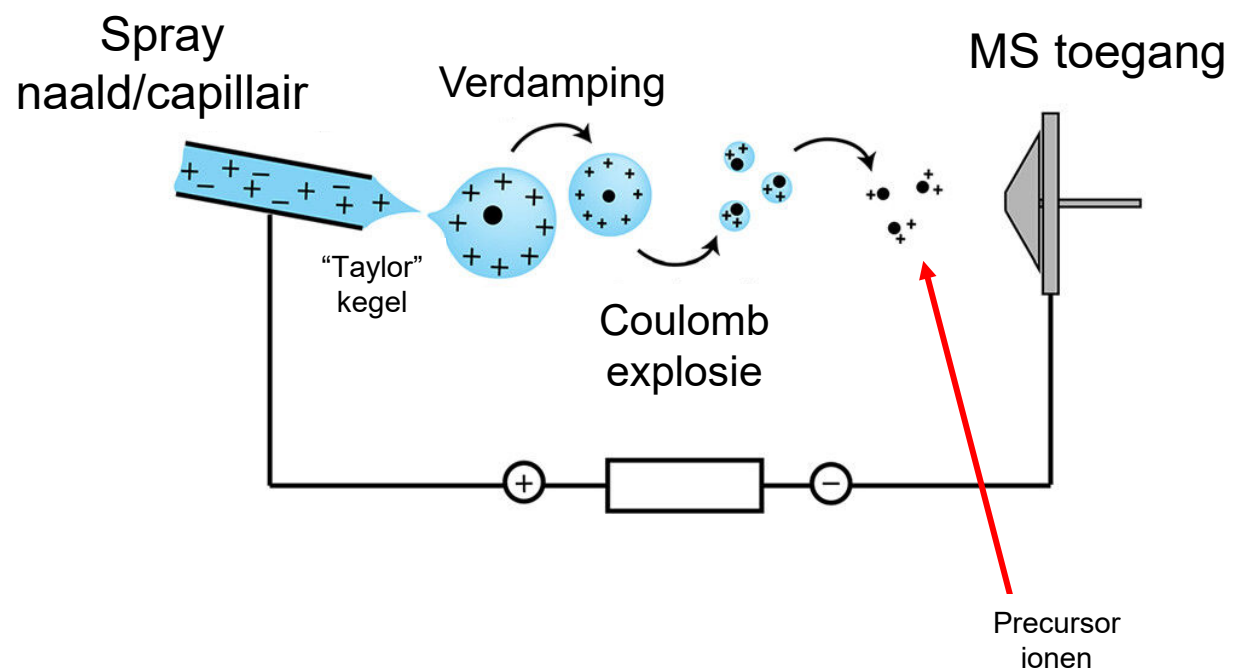
Flow van
vloeibare fase
→

2-

3-

>3-

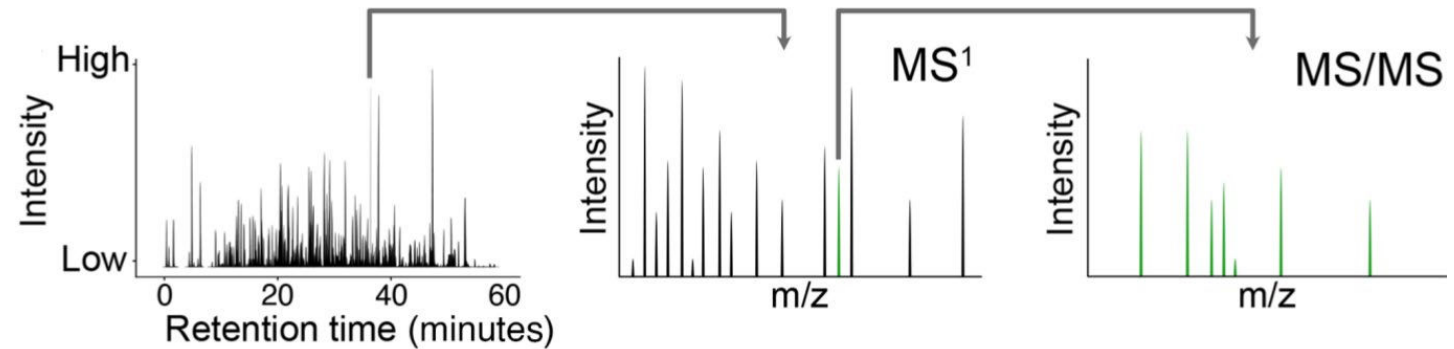
Zout concentratie



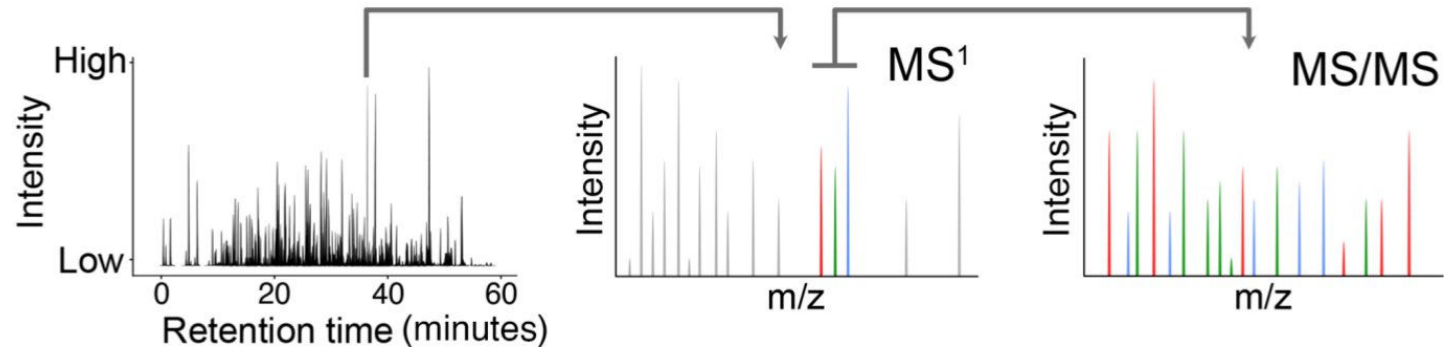


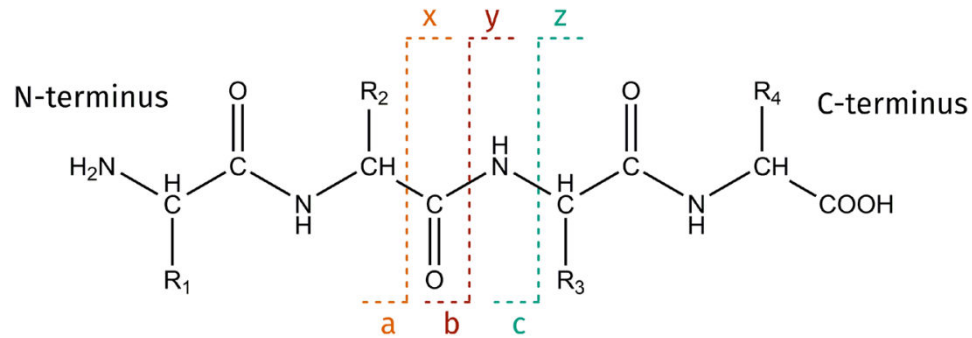
Hoe selecteer je **welke precursor ionen** je gaat fragmenteren?

Data-afhankelijk (DDA)

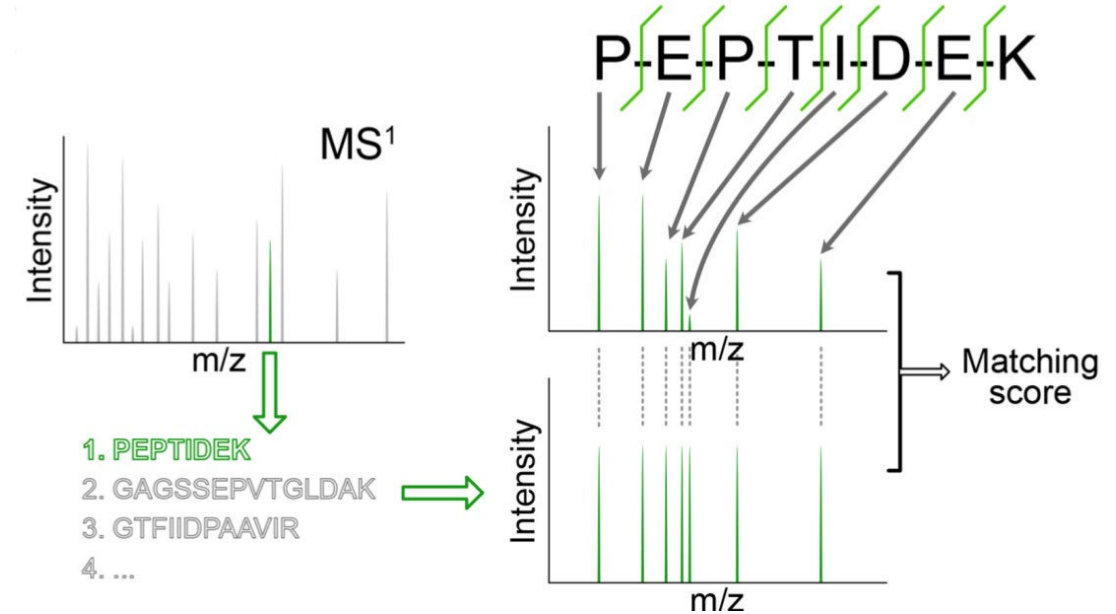


Data-onafhankelijk (DIA)





b-en *y*-ionen komen vrij na het breken van de peptide verbinding tijdens fragmentatie



De unieke combinatie van deze *b*-en *y*-ionen geeft een soort vingerafdruk

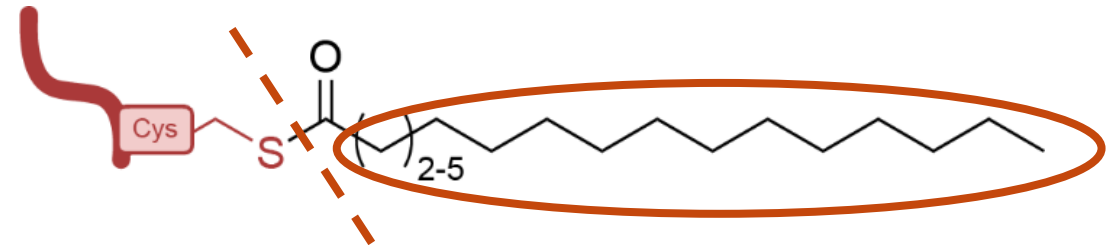
Door deze vingerafdruk te vergelijken met een database met alle mogelijke fragmenten, kunnen we de aminozuurvolgorde bepalen



Hoe bestuderen we eiwit S-acylatie met massaspectrometrie (proteomics)?

■ Uitdagingen

- Hydrofobiciteit
- Labiliteit van de thioester verbinding
- Relatief lage hoeveelheid van gelipideerde eiwitten in de cel
- Stoichiometrie



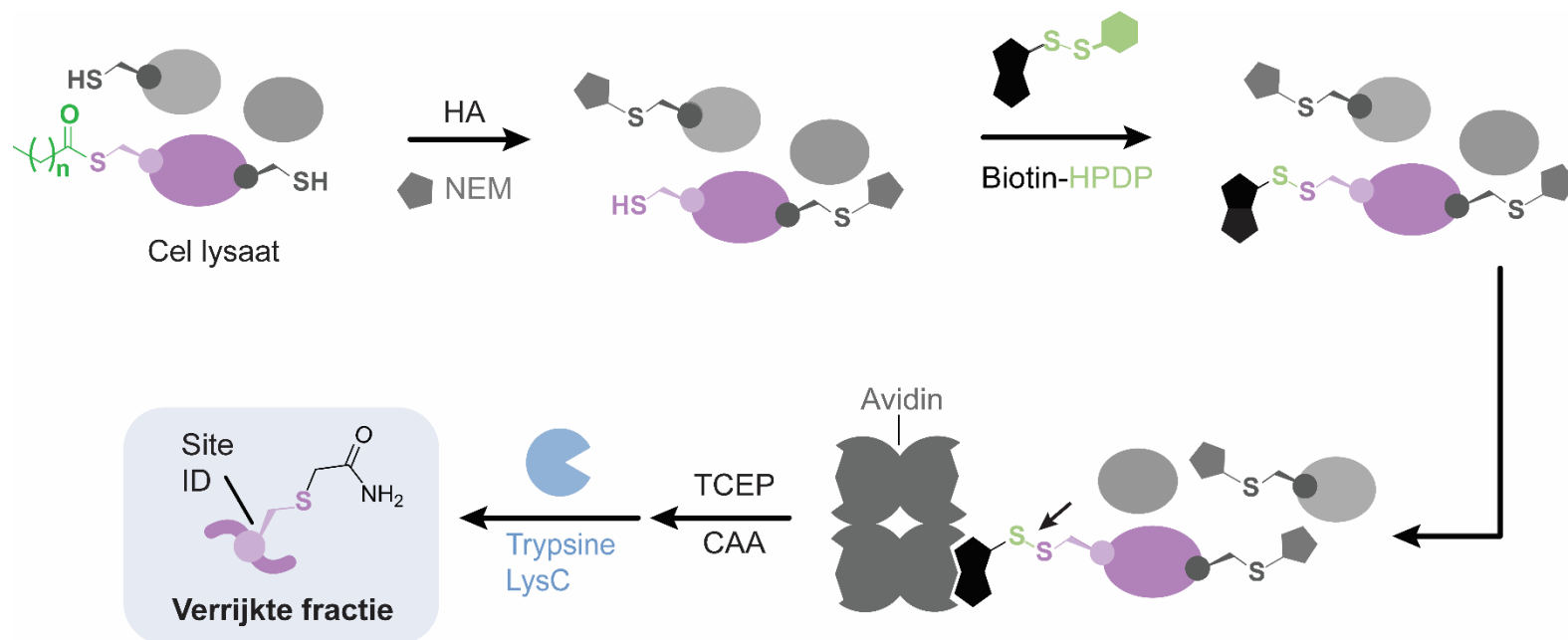
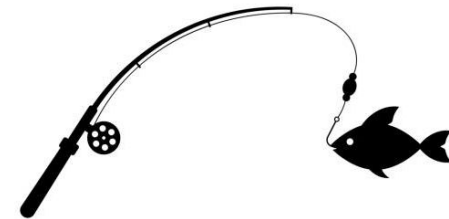
1. Indirecte methoden

- cysteïne-gericht (Acyl-biotine uitwisseling)
- Lipide-gericht (Labelen met “klikbare” lipiden)

2. Directe methoden

- Eiwitspecifiek
- Na derivatisatie

Indirecte methoden: acyl-biotine uitwisseling (cysteïne-gericht)



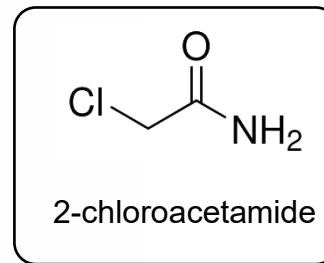
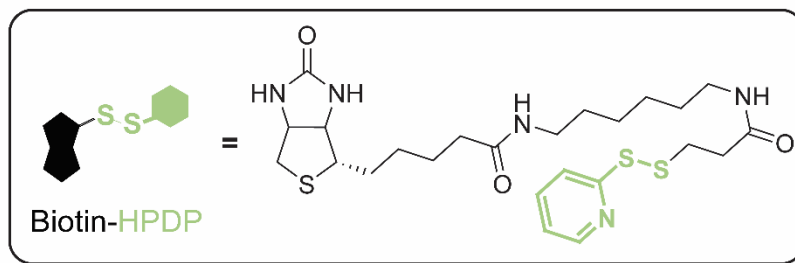
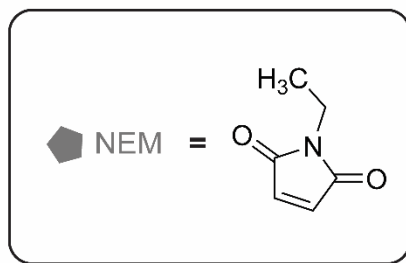
Voordeel

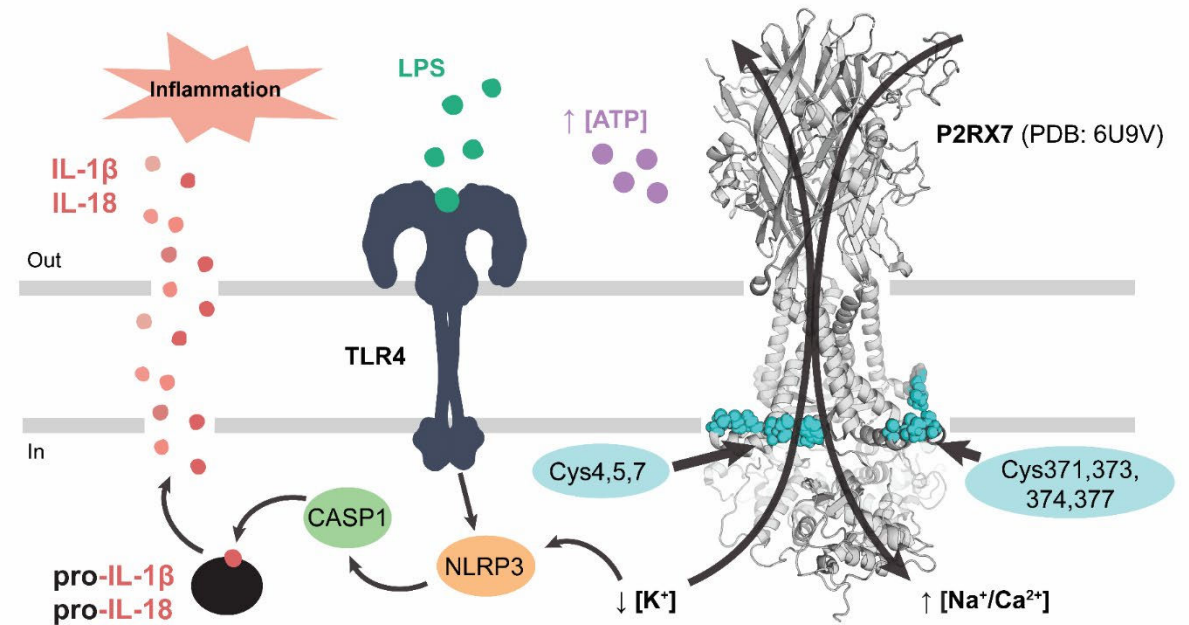
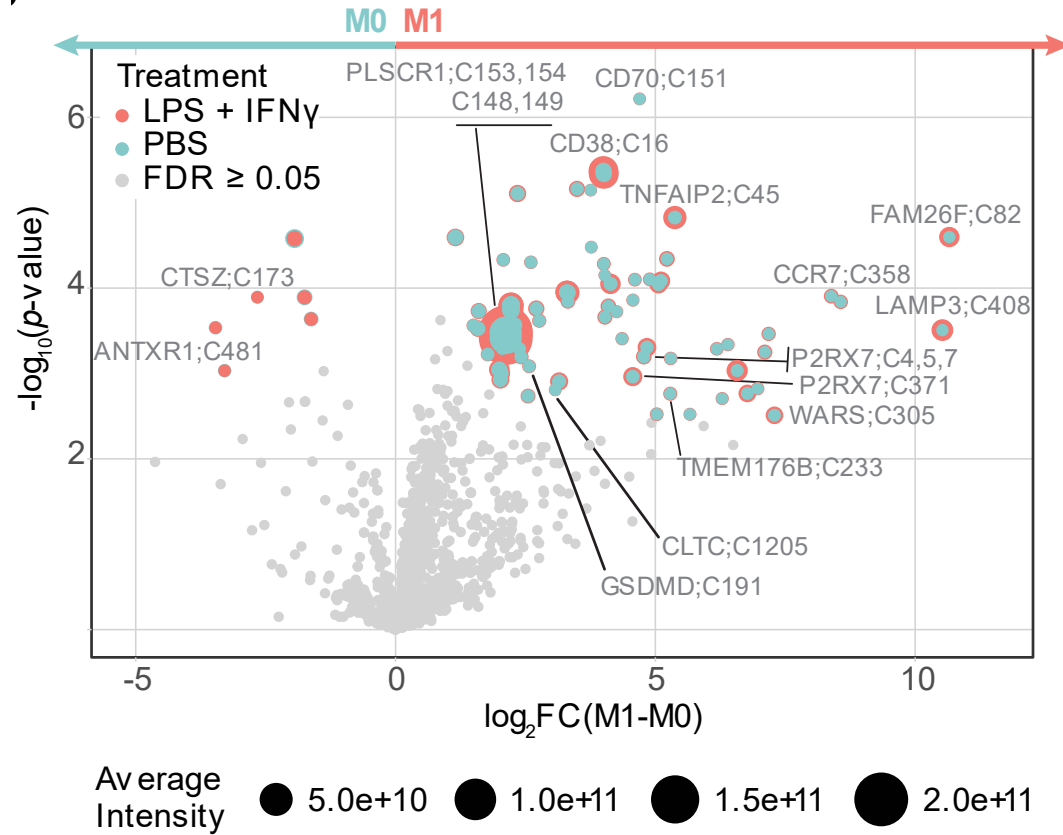
- Kunnen onbewerkt cel lysaat gebruiken
- We vangen alle mogelijke gelipideerde eiwitten, ongeacht "turnover"

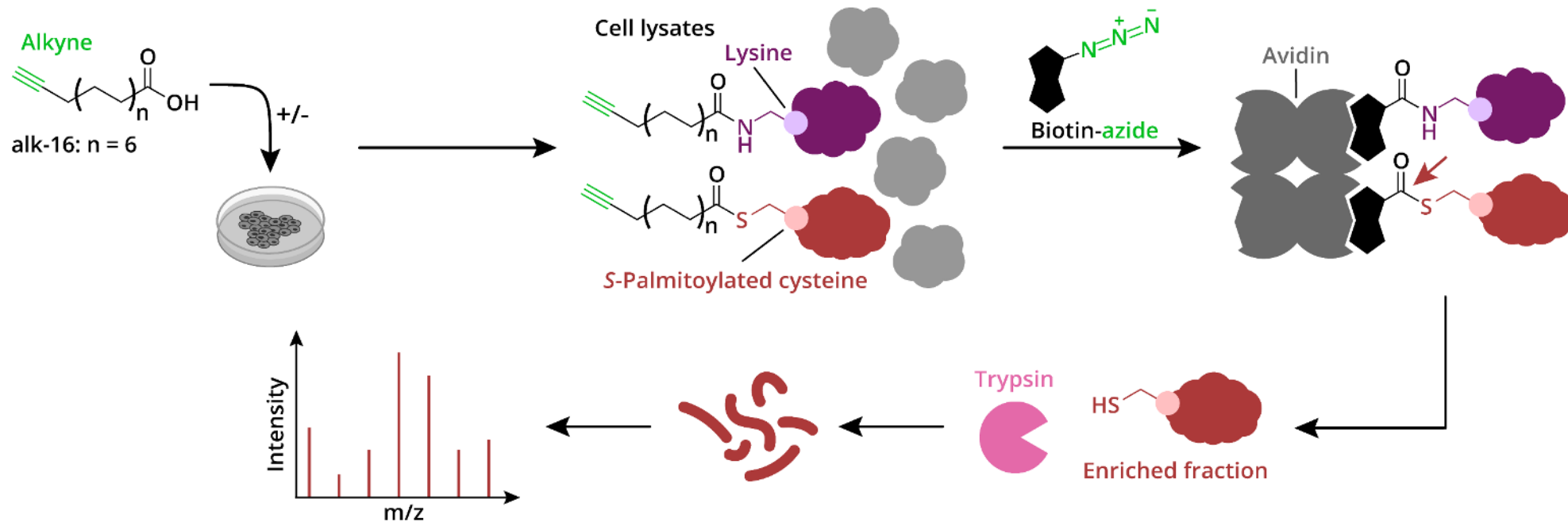
Nadeel

we verliezen:

- de identiteit van het lipide
- informatie over de exacte plek van modificatie







Voordeel

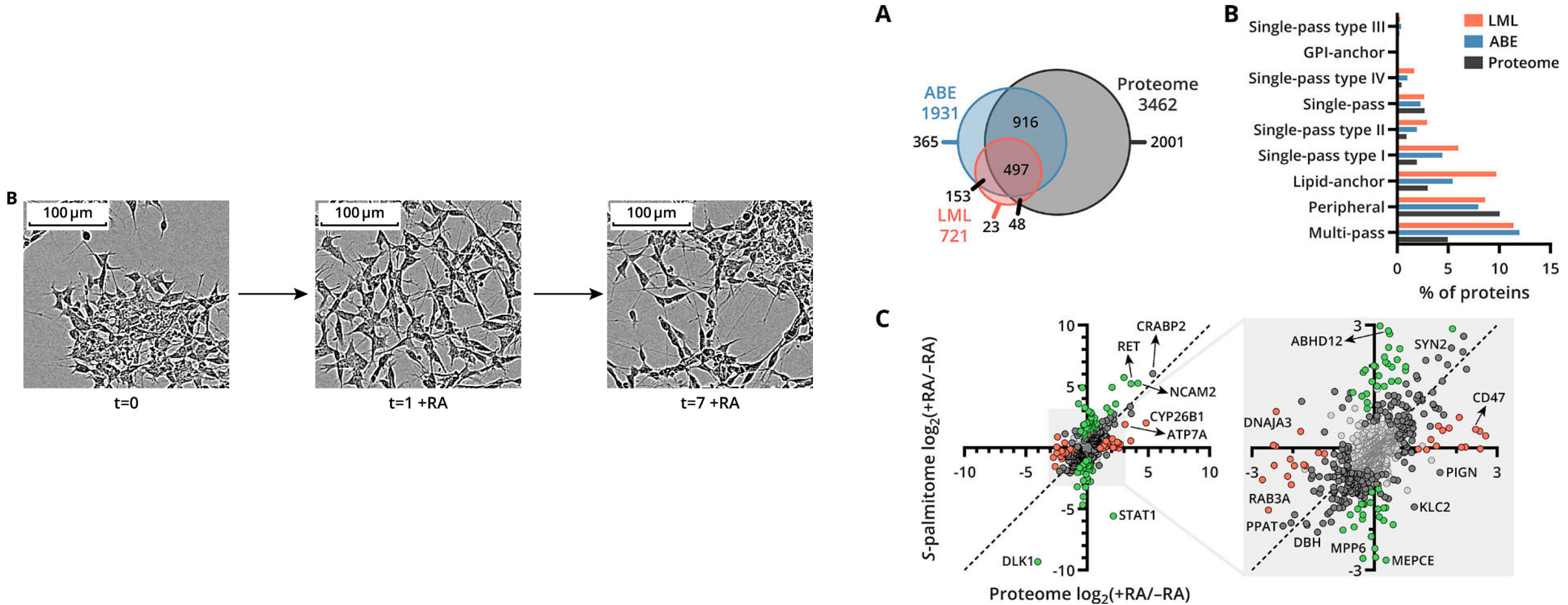
- de identiteit van het lipide is duidelijker

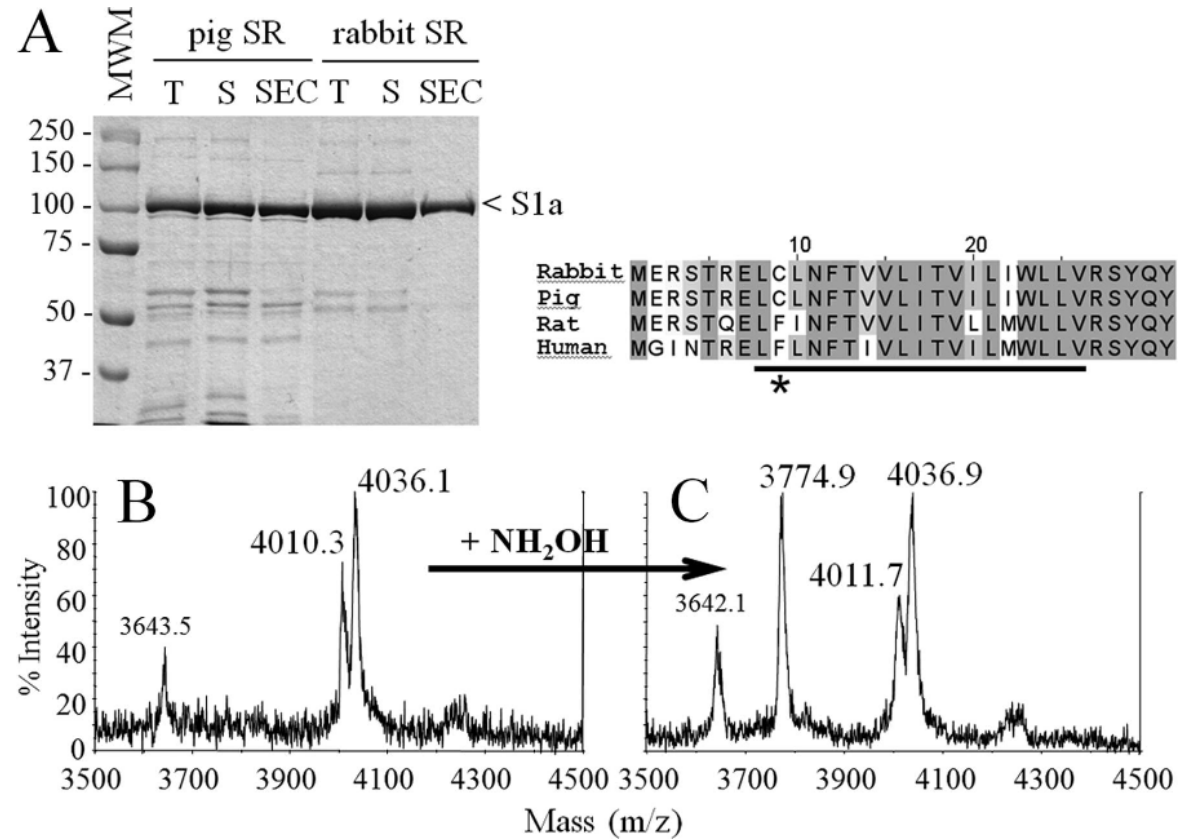
Nadeel

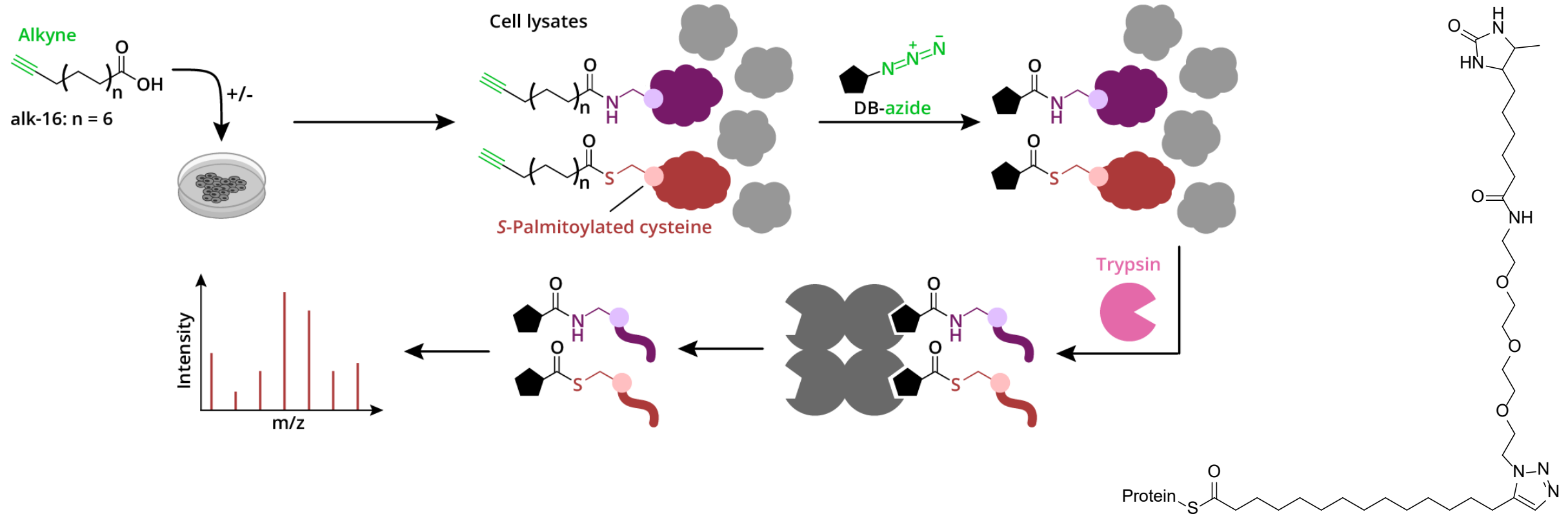
- Invloed van intracellulaire vetmetabolisme oncontroleerbaar
- Alleen “fast turnover” eiwitten kunnen gedetecteerd worden



Toepassing: S-acylatie in neuronale cellen







Voordeel

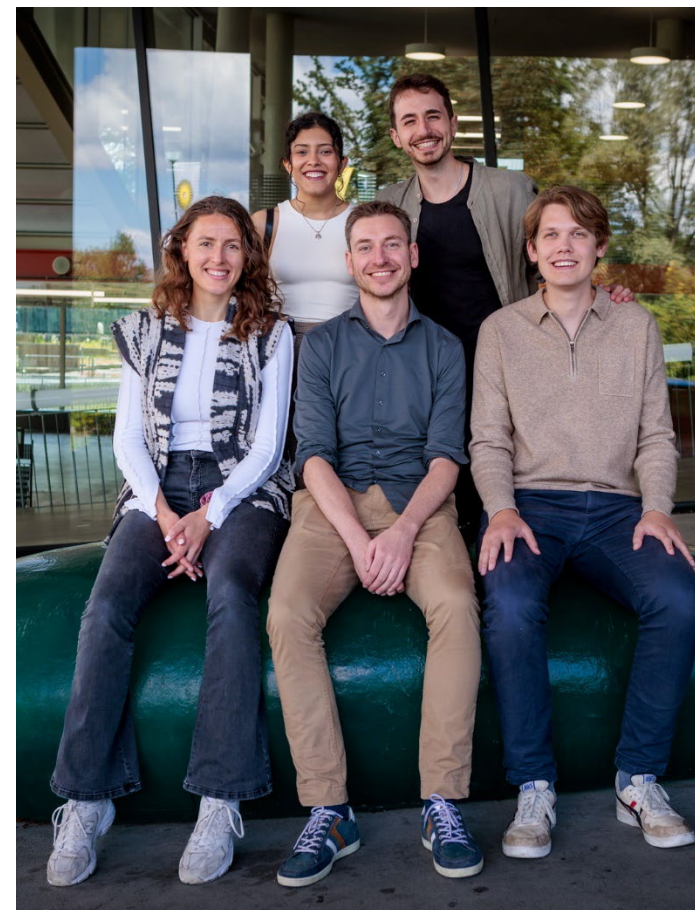
Identiteit van lipide gaat niet verloren

Nadeel

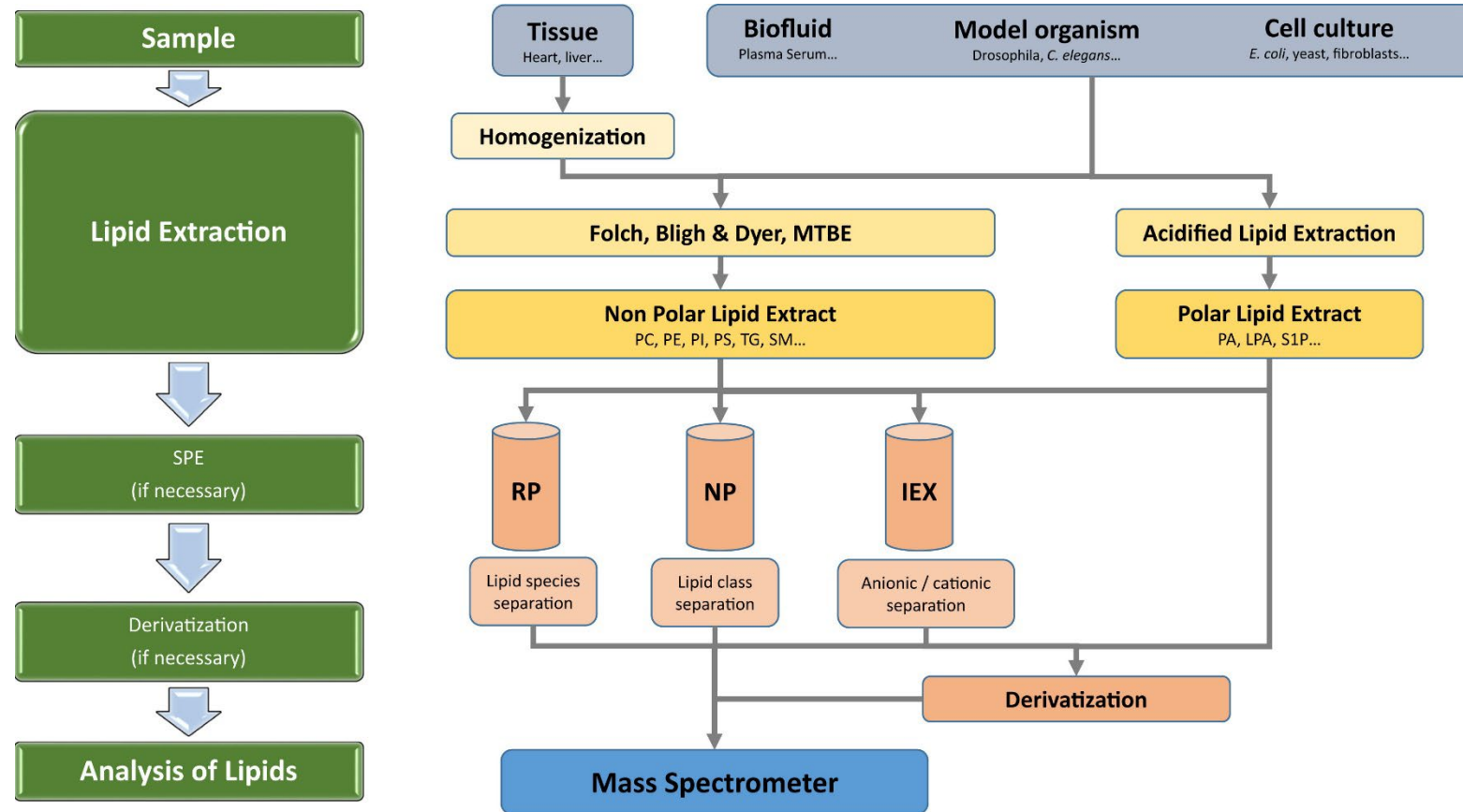
Vergt extra modificatie + detectie omvang is gelimiteerd



- **Verrijkingmethodes**
- **Incorporatie van AI/machine learning**
 - Voorspellen van “langketen” S-acylatie
- **Omvang**
 - Directe detectie
 - Oplosbaarheid
 - Chromatografie
 - Fragmentatie
- **Kwantificatie**



Hoe ziet een doorsnee lipidomics experiment eruit?





MeOH/water: polair

Interfase: eiwitten

Chloroform: nonpolair
(lipiden, etc.)

