

Leerlingenhandleiding

Niveau: **expert**

*Gezond of ziek
Een vouwtje verkeerd*



**Universiteit
Leiden**

Wiskunde en Natuurwetenschappen

Amgen Biotech Experience

Scientific Discovery for the Classroom

Ontwikkeld door Universiteit Leiden in samenwerking met het Centre for Medical Systems Biology

Op alle lesmaterialen is de Creative Commons Naamsvermelding-Niet-commercieel-Gelijk delen 3.0 Nederland Licentie van toepassing (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/nl/>).

CC BY-NC-SA 2017 - Universiteit Leiden

Met vragen en/of opmerkingen kunt u contact opnemen met het Reizende DNA-Lab van Universiteit Leiden (leiden@dnlabs.nl).

Disclaimer: Alle meningen, bevindingen en conclusies of aanbevelingen in dit materiaal zijn die van de auteur(s) en komen niet noodzakelijk overeen met de opvattingen van de Amgen Foundation of Education Development Center, Inc.

Inhoudsopgave

Reizende DNA-labs.....	4
Les 1: Voorbereidende les.....	5
Even oprfrissen: Cellen, DNA en eiwitten.....	5
Ziekten en eiwitten.....	6
Cystische fibrose: een instabiel eiwit.....	6
De ziekte van Alzheimer: een te stabiel eiwit.....	6
Stabiele en instabiele eiwitten.....	7
Structuur en vouwing van eiwitten.....	7
Driedimensionale weergave van eiwitten.....	8
De functie van eiwitten.....	8
Een vouwtje verkeerd.....	9
Onderzoek.....	10
De verschillen tussen eiwitten van gezonde en zieke mensen.....	10
Immunofluorescentie.....	11
Röntgendiffractie.....	12
De gevolgen van een structuurverschil.....	13
Practicum.....	13
Verdieping.....	14
De verkeerd gevouwen eiwitten bij cystische fibrose.....	14
De verkeerd gevouwen eiwitten bij de ziekte van Alzheimer.....	15
Vragen les 1.....	16
Les 2 en 3: Practicum.....	18
Experiment 1a: Immunofluorescentie.....	18
Doel van het experiment.....	18
Benodigdheden.....	18
Instructies en uitwerking.....	18
Experiment 2: Röntgendiffractie.....	19
Doel van het experiment.....	19
Benodigdheden.....	19
Instructies en uitwerking.....	19
Experiment 1b: Immunofluorescentie.....	20
Vragen les 2 en 3.....	21
Experiment 1.....	21
Experiment 2.....	21
Les 4: Afsluitende les.....	22
Opzet.....	22

Reizende DNA-labs

De Reizende DNA-labs slaan een brug tussen biologie en scheikunde op school en de nieuwste ontwikkelingen rond genomics, door leerlingen zelf aan de slag te laten gaan met geavanceerde technieken en actuele onderwerpen uit het hedendaagse wetenschappelijk onderzoek. De DNA-labs zijn ontwikkeld door Nederlandse universiteiten en de Genomics Centres of Excellence. De website www.allesoverdna.nl is speciaal geschreven voor leerlingen van het voortgezet onderwijs om wegwijs te raken in de wereld van genomics.

Er zijn zes verschillende DNA-labs, die ieder een verschillend aspect van het moderne DNA-onderzoek behandelen. Stuk voor stuk laten de DNA-labs zien dat kennis van genen en de moleculen in een cel een grote rol speelt in gebieden die voor iedereen belangrijk zijn: voeding, gezondheid en het milieu. Daarnaast maken de practica duidelijk dat wetenschappelijke vooruitgang soms maatschappelijke vragen oproept.

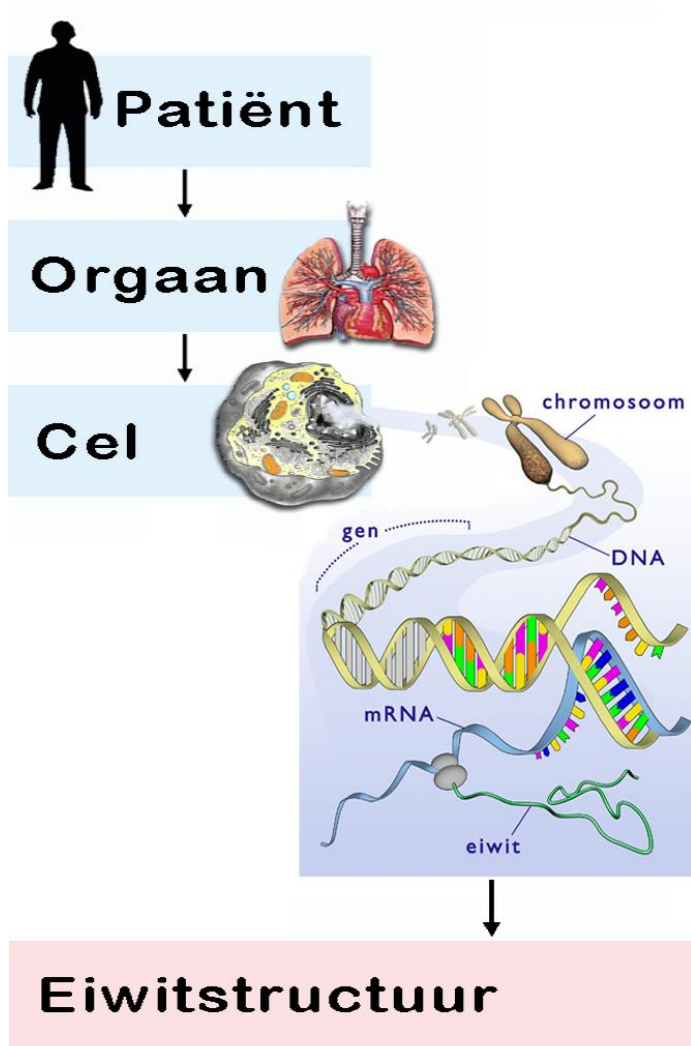
Opzet lesmethode

De module bestaat vier lessen. De voorbereidende les (les 1) en afsluitende les (les 4) worden door de eigen docent verzorgd. Het practicum (les 2 en 3) wordt volledig verzorgd door studenten van de Universiteit. Zowel de inleidende als afsluitende les zijn van groot belang voor het goed kunnen uitvoeren en begrijpen van het practicum.

Les 1: Voorbereidende les

Even oprissen: Cellen, DNA en eiwitten

Het menselijk lichaam is opgebouwd uit ongeveer honderdduizend miljard cellen. Die enorme hoeveelheid cellen kun je beschouwen als individuele kleine fabriekjes waarin zich alle processen afspelen die het leven mogelijk maken. DNA en eiwitten spelen hierbij een belangrijke rol. Het DNA bepaalt hoe de eiwitten eruit zullen zien en welke functie zij zullen hebben. Een foutje in een gen kan leiden tot een verandering in het eiwit met mogelijk desastreuze gevolgen als ziek worden. Eiwitten zijn dus de uiteindelijke producten die ontstaan wanneer de genen in een cel, die op het DNA liggen, vertaald worden naar RNA (Figuur 1).



Figuur 1: Bovenaan staat een patiënt, die aan symptomen merkt dat bepaalde organen in zijn lichaam niet goed functioneren. De oorzaak hiervan is terug te vinden in de cellen waaruit de organen zijn opgebouwd. De cel kan met behulp van eiwitten communiceren met andere cellen en er zo voor zorgen dat alle cellen samen een werkzaam orgaan vormen. Welke eiwitten een cel moet maken, wordt bepaald door het DNA. Alleen met de juiste structuur kan een eiwit de functie vervullen waarvoor het bedoeld is.

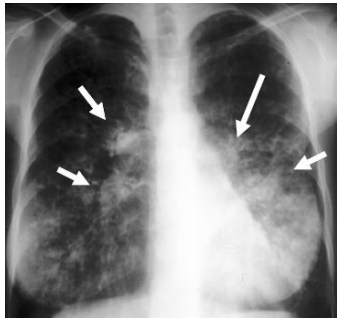
Ziekten en eiwitten

Omdat eiwitten zo belangrijk zijn bij alle processen in het lichaam, is het essentieel dat alle eiwitten in het lichaam de juiste functie vervullen. Deze functie wordt voor een groot deel bepaald door de vorm van een eiwit. De vorm wordt weer bepaald door de volgorde waarin verschillende aminozuren aan elkaar worden gekoppeld.

Wanneer er een foutje ontstaat in het DNA bestaat het risico dat een eiwit niet goed functioneert waardoor een bepaald proces in het lichaam niet meer verloopt zoals het moet. Hierdoor kunnen verschillende ziekten ontstaan zoals cystische fibrose, kanker en de ziekte van Alzheimer. Deze ziekten worden veroorzaakt door een eiwit dat een andere vorm heeft dan het eigenlijk zou moeten hebben. Daardoor kunnen deze eiwitten hun functie niet meer goed vervullen, wat moeilijkheden veroorzaakt in verschillende belangrijke processen in het lichaam.

Cystische fibrose: een instabiel eiwit

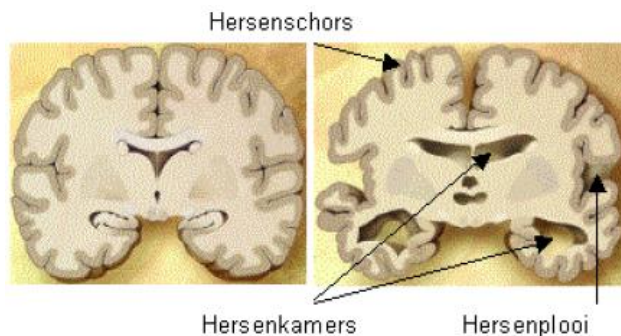
Paul is 16 jaar oud. Hij is geboren met een ernstige erfelijke aandoening die vooralsnog niet te genezen is. Hierdoor heeft Paul altijd problemen met zijn longen, wat sporten voor hem bijna onmogelijk maakt. Daarnaast heeft Paul door zijn ziekte een groeiachterstand en is een bezoek aan de fysiotherapeut voor hem een dagelijks ritueel. De levensverwachting van Paul ligt rond de 30 jaar, net als die van zijn ongeveer 1200 Nederlandse lotgenoten met cystische fibrose (CF), ook wel taaislijmziekte genoemd. Bij deze ziekte is een speciaal eiwit dat een rol speelt bij de slijmproductie in de longen instabiel. Het instabiele eiwit kan zijn functie niet meer goed uitvoeren en het wordt snel afgebroken in het lichaam. Daardoor wordt het slijm, dat normaal in de longen aanwezig is, veel te dik. Het wordt zo taai, dat het lichaam er niet goed mee om kan gaan. Slijmophopingen en infecties zijn de nare gevolgen hiervan (Figuur 2).



Figuur 2: Een röntgenfoto van een patiënt met cystische fibrose. Het slijm is bij gezonde mensen op zo'n foto niet zichtbaar, maar hier zie je het taai slijm van een CF-patiënt als witte vlekjes op de foto (zie pijltjes).

De ziekte van Alzheimer: een te stabiel eiwit

Meneer Den Oudsten is 72 jaar oud. Sinds enkele jaren merkt hij dat hij regelmatig vergeet waar hij mee bezig is en herkent hij zijn kinderen steeds minder goed. Net als ruim 250.000 andere Nederlanders lijdt meneer Den Oudsten aan de ziekte van Alzheimer. Bij deze ziekte verandert de structuur van de hersenen zodat de zenuwcellen (neuronen) hun werk niet goed meer doen. De veranderingen in de hersenen ontstaan doordat een specifiek eiwit te stabiel is, waardoor het niet meer afgebroken kan worden. Het gevolg hiervan is dat er in de hersenen van Alzheimer patiënten ophopingen van dit eiwit ontstaan (Figuur 3).



Figuur 3: Links een doorsnede van gezonde hersenen; rechts een doorsnede van hersenen van een Alzheimerpatiënt. De buitenkant van de hersenen (hersenschors) is verschrompeld; er is meer ruimte tussen de hersenplooien en de hersenkamers zijn vergroot.

Maak nu vraag 1.1 t/m 1.6

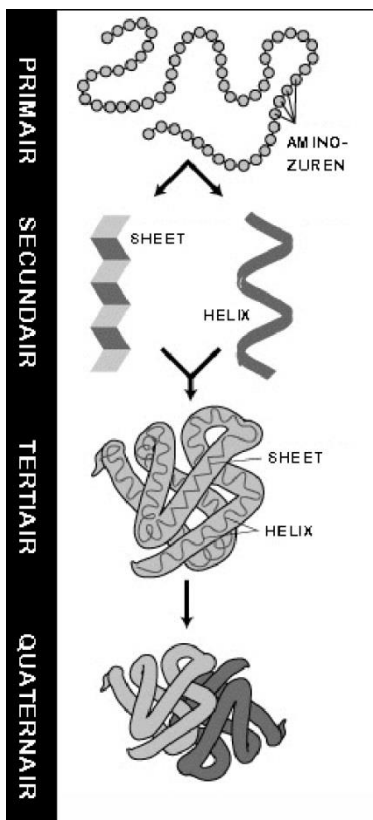
Stabiele en instabiele eiwitten

Een eiwit dat zijn functie niet goed vervult kan vervelende gevolgen hebben, zoals blijkt uit de twee beschreven ziekten cystische fibrose en de ziekte van Alzheimer. De reden waarom een eiwit zijn functie kan verliezen is niet altijd hetzelfde. Zo heb je gelezen dat bij patiënten die cystische fibrose (CF) hebben een belangrijk eiwit in de longen instabiel is. Dit eiwit zorgt er bij gezonde mensen voor dat het slijm in de longen niet te dik wordt, maar wordt bij CF- patiënten afgebroken waardoor het slijm te dik wordt en problemen veroorzaakt. Bij de ziekte van Alzheimer vindt het tegengestelde plaats. Daar vormt een eiwit dat te stabiel is en niet afgebroken kan worden ophopingen in de hersenen wat de problemen veroorzaakt.

Structurele vouwing van eiwitten

Eiwitten hebben een structuur of vouwing. De structuur van een eiwit wordt bepaald door de manier waarop de aminozuren waaruit het eiwit bestaat aan elkaar gekoppeld zijn en interactie met elkaar hebben. Afhankelijk van de volgorde waarin aminozuren aan elkaar zijn geschakeld in een eiwit, kunnen de aminozuren al of niet bij elkaar in de buurt komen. Aminozuren die elkaar aantrekken zullen naar elkaar toe gaan, terwijl aminozuren die elkaar afstoten zich in ruimtelijk opzicht juist van elkaar afwenden. Bepaalde aminozuren zijn zuur terwijl anderen juist basisch zijn. Hydrofiele aminozuren zullen zich naar buiten keren, terwijl hydrofobe aminozuren juist naar de binnenkant van een eiwit zullen gaan.

Aan de hand van de eigenschappen van de verschillende aminozuren neemt een eiwit dus een bepaalde vorm aan. Deze vorm wordt opgebouwd in vier verschillende niveaus waarop je de structuur van een eiwit kunt beschouwen. Figuur 4 geeft een overzicht van deze vier niveaus van eiwitvouwing.



Het primaire (eerste) niveau is een opsomming van de keten van aminozuren waaruit een eiwit is opgebouwd.

Het secundaire (tweede) niveau ontstaat wanneer de keten van aminozuren elkaar aantrekt door waterstofbruggen. De twee meest voorkomende vormen (sheet en helix) staan hiernaast weergegeven.

Het tertiaire (derde) niveau beschrijft hoe secundaire structuren elkaar aantrekken of afstoten. Zo krijgt het eiwit de vorm van een soort kluwen.

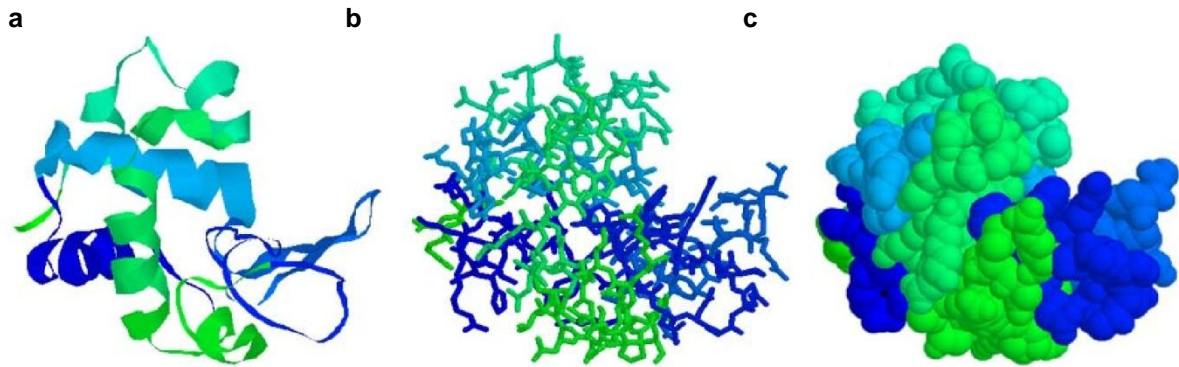
Het quaternaire (vierde) niveau ontstaat wanneer een eiwit is opgebouwd uit meer dan één keten van aminozuren. De manier waarop verschillende ketens aan elkaar gekoppeld zijn bepaalt de uiteindelijke structuur van complexe eiwitten en daarmee ook de functie van deze eiwitten.

Figuur 4: De vier niveaus van eiwitvouwing

Maak nu vraag 1.7 t/m 1.9

Driedimensionale weergave van eiwitten

De structuur van een eiwit kun je op verschillende manieren weergeven (Figuur 5). In de literatuur zal je vaak de verschillende representaties door elkaar tegenkomen. Afhankelijk van de context is een bepaald model geschikt om duidelijk te maken wat de driedimensionale structuur en de vouwing van een eiwit zijn.

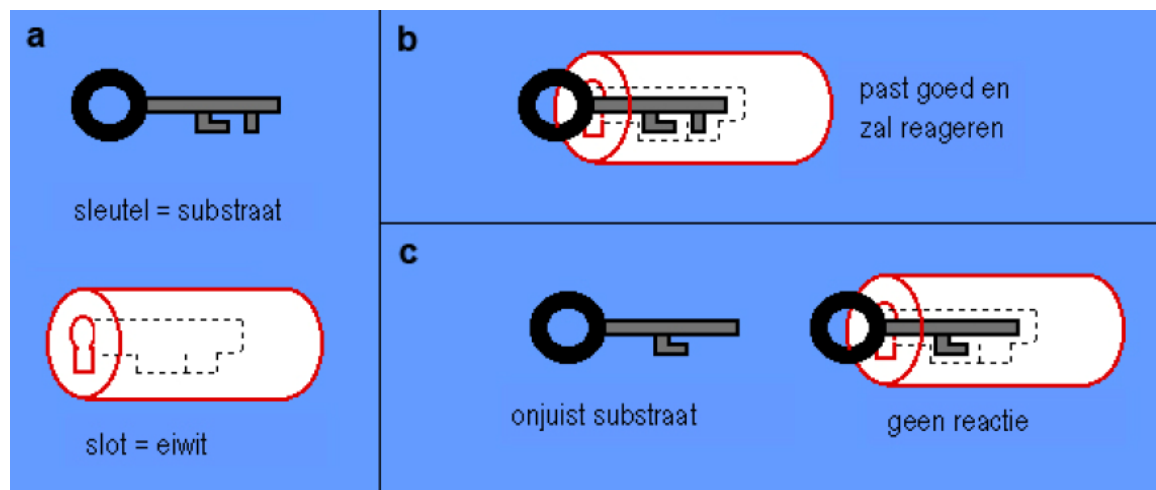


Figuur 5: De vouwing van een eiwit kan op verschillende manieren weergegeven worden. Hier zie je drie modellen van het eiwit lysozym, dat actief is in de afbraak van bacteriën. Bij het ribbonmodel (a) kun je verschillende secundaire structuren goed van elkaar onderscheiden, terwijl het stickmodel (b) de onderlinge verbindingen tussen de aminozuren inzichtelijk maakt. Het spacefilling model (c) geeft een beeld van de ruimte die het eiwit inneemt en vormt daarmee de beste benadering van het werkelijke voorkomen van een eiwit.

De functie van eiwitten

Eiwitten zijn er in allerlei soorten en maten. Elk proces in het lichaam wordt uitgevoerd door één of meerdere eiwitten die speciaal voor dat proces bestaan. Een voorbeeld is het eiwit amylase dat in het speeksel zetmeel uit voedsel omzet in suikers en zo dus een belangrijke rol vervult aan het begin van de spijsvertering.

De vouwing van eiwitten bepaalt welke functie het eiwit heeft. Je kunt je dit voorstellen als het principe van een slot en een sleutel, waarbij het slot het eiwit is en de sleutel het substraat. Substraten zijn erg specifiek voor het eiwit waarmee ze een reactie veroorzaken. Als het eiwit een klein beetje verandert, kan het zijn taak niet goed of helemaal niet meer vervullen. Figuur 6 geeft dit schematisch weer.



Figuur 6: De vorm van een eiwit bepaalt zijn werking. Het principe is vergelijkbaar met een slot en een bijpassende sleutel (a). Wanneer het juiste substraat bij een specifiek eiwit komt, zal het eiwit reageren (b), terwijl een onjuist substraat geen reactie zal uitlokken (c).

Een vouwtje verkeerd

Zoals je inmiddels duidelijk is, spelen eiwitten een erg belangrijke rol in de longen en hersenen. Dit geldt niet alleen voor deze twee organen, maar voor alle organen die het menselijk lichaam rijk is. Alle organen zijn opgebouwd uit gespecialiseerde cellen. Zonder eiwitten zal geen cel in het lichaam in staat zijn om zijn specifieke taak te vervullen. Juist omdat eiwitten zo belangrijk zijn bij alle processen in het lichaam, is het van het groot belang dat alle eiwitten in het lichaam de juiste functie vervullen. De functie van een eiwit wordt voornamelijk bepaald door de vorm die het eiwit heeft en de vouwing die daarbij hoort: de eiwitstructuur. In Figuur 4 is dit in een schema weergegeven. De structuur van een eiwit kan veranderen wanneer er een afwijking in het DNA aanwezig is. Een eiwit kan hierdoor zodanig van vorm veranderen, dat het bijvoorbeeld instabiel wordt en zijn functie niet meer kan vervullen, zoals bij cystische fibrose. Daarnaast kan een verkeerde eiwitvouwing er ook voor zorgen dat een eiwit juist te stabiel is, waardoor het niet afgebroken kan worden, zoals bij de ziekte van Alzheimer. Meerdere ziekten met heel verschillende kenmerken kunnen dus veroorzaakt worden door een verkeerd gevouwen eiwit.

Maak nu vraag 1.10

Onderzoek

Om beter te begrijpen hoe ziekten ontstaan door verkeerde eiwitvouwing wordt veel wetenschappelijk onderzoek verricht. Weten wat er precies fout gaat, geeft inzicht in hoe medicijnen zouden moeten aangrijpen en dit geeft uitzicht op mogelijke behandelingsmethoden. Bij eiwitvouwingsziekten moet je er eerst achter komen hoe je een verkeerd gevouwen eiwit kunt onderscheiden van dezelfde eiwitten die wel goed gevouwen zijn. De cellen van gezonde personen worden dan vergeleken met die van patiënten. Wanneer je eenmaal weet dat de eiwitten in de cellen van gezonde en zieke mensen verschillen, is het interessant om erachter te komen hoe die eiwitten dan verschillen. Hiervoor is het nodig dat de structuur van de eiwitten boven tafel komt. Tenslotte is het van groot belang om te controleren of het verschil in eiwitstructuur ook daadwerkelijk de functie van de eiwitten verstoort, waardoor je de ziekte mogelijk kunt verklaren.

Om een goed inzicht te krijgen in wat er precies verkeerd gaat bij eiwitvouwingsziekten zoals cystische fibrose en de ziekte van Alzheimer, kunnen onderzoekers de volgende experimenten uitvoeren.

**Lees de tekst goed door en beantwoord de bijbehorende vragen.
Tijdens de daadwerkelijke uitvoering van het practicum word je
aanvullend begeleid door een presentatie.**

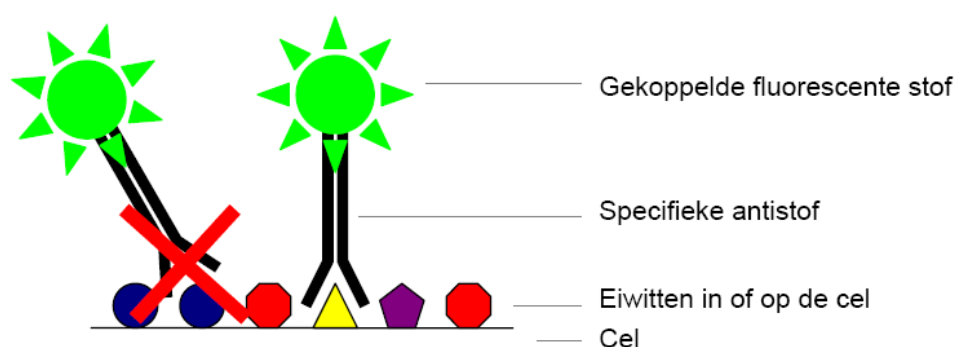
De verschillen tussen eiwitten van gezonde en zieke mensen

De verschillen tussen zieke en gezonde mensen zijn terug te vinden in hun cellen, waarin het DNA en de eiwitten zich bevinden. Om erachter te komen wat de verschillen zijn, kunnen de eiwitten in de cellen van gezonde en zieke mensen met elkaar vergeleken worden door middel van wetenschappelijk onderzoek.

Immunofluorescentie

Men kan specifieke eiwitten in cellen van gezonde en zieke mensen met elkaar vergelijken met behulp van immunofluorescentie. Bij deze techniek maak je gebruik van een antistof. Dit is een eiwit dat specifiek bindt aan een ander specifiek eiwit. Aan de antistof is een fluorescerend molecuul gekoppeld, wat ervoor zorgt dat je met een speciale microscoop (fluorescentiemicroscoop) kunt zien waar de antistof zich gebonden heeft en waar dus het eiwit zit waaraan de antistof zich specifiek bindt. Afhankelijk van welke stof het precies is, kan de kleur van de fluorescente stof variëren (Figuur 7).

Longcellen van gezonde mensen hebben een goed werkend CFTR eiwit. Door dit eiwit met behulp van immunofluorescentie zichtbaar te maken, kun je zien dat het zich inderdaad in de longcellen van gezonde mensen bevindt. Echter, in de longcellen van patiënten met cystische fibrose werkt het CFTR eiwit niet goed. Doordat het CFTR eiwit in de longcellen van zieke mensen anders gevouwen is, gedraagt het zich ook anders en zal het niet zichtbaar worden bij toepassing van immunofluorescentie.

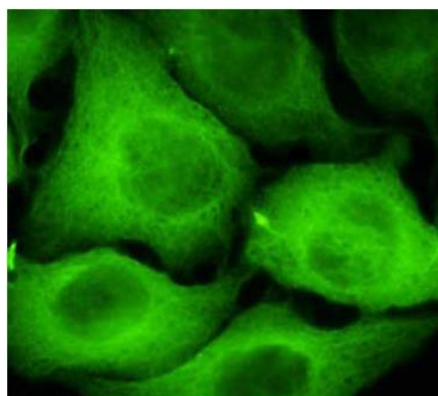


Figuur 7: Het principe van immunofluorescentiekleuring. Een antistof die specifiek aan een bepaald eiwit bindt bevat een gekoppeld fluorescent molecuul die zichtbaar maakt waar het specifieke eiwit zich bevindt. De antistof zal niet binden aan andere eiwitten dan het eiwit waarvoor hij specifiek gevoelig is.

Omdat er geen commercieel beschikbare antistof is die specifiek bindt aan het CFTR eiwit, zullen jullie in het experiment gebruik maken van een antistof die specifiek aan het eiwit tubuline bindt. Tubuline speelt een belangrijke rol bij de stevigheid van sommige cellen en onderdeel is van het skelet van sommige cellen – het cytoskelet. Een deel van de cellen die met de antistof in contact komen bevat geen tubuline, terwijl het andere deel wel tubuline bevat. De antistof is gekoppeld aan een groen fluorescerend molecuul, genaamd fluoresceïne isothiocynaat (FITC).

Na afloop van het experiment zal een groene kleur waargenomen worden waar de antistof zich gebonden heeft en waar tubuline aanwezig is (Figuur 8). Bij cellen waarin geen tubuline aanwezig is, zal niets waargenomen worden. Zo kun je goed onderscheid maken tussen cellen die een bepaald eiwit wel of niet hebben.

Wanneer bekend is dat een goed werkend eiwit aanwezig is in de longcellen van gezonde mensen, maar dat datzelfde eiwit bij zieke mensen niet functioneert, is het de volgende stap om te achterhalen wat dan het verschil is tussen die eiwitten van gezonde en zieke mensen.



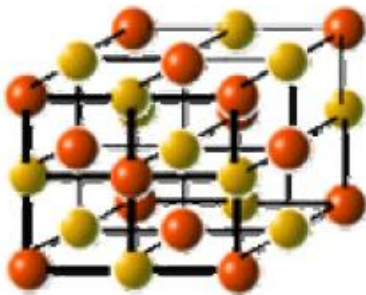
Figuur 8: Cellen waarin tubuline zichtbaar is door binding van een groen fluorescente gelabelde antistof.

Röntgendiffractie

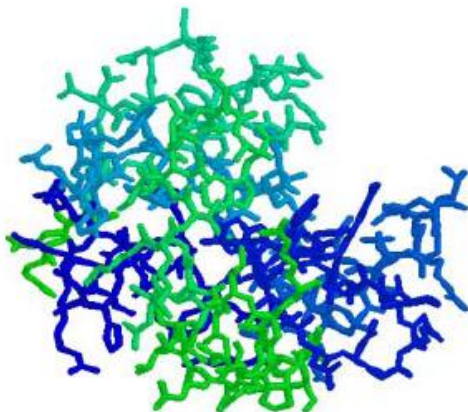
Wanneer de relevante eiwitten van gezonde en zieke mensen eenmaal beschikbaar zijn, zijn er mogelijkheden om de verschillen tussen de eiwitten te achterhalen. Eén van de technieken die hiervoor gebruikt wordt, is röntgendiffractie. Met deze techniek wordt de driedimensionale moleculaire structuur van de eiwitten achterhaald. De eiwitvouwing wordt op die manier zichtbaar gemaakt.

Bij röntgendiffractie wordt een eiwit in kristalvorm gebracht. In een kristal zijn alle moleculen geordend, zoals bij bevroren water (ijskristallen) of in keukenzout (NaCl, Figuur 9). Vervolgens worden de kristallen bestraald met röntgenstraling. Deze straling wordt afgebogen door de moleculen in het kristal en de afgebogen straling wordt opgevangen. Uit het opgevangen patroon kan berekend worden waar de verschillende atomen in het eiwitmolecuul zich ten opzichte van elkaar bevinden. Uiteindelijk ontstaat er dan een driedimensionale structuur van het eiwit (Figuur 10).

Wanneer je zowel van het goed functionerende eiwit als van het slecht functionerende eiwit zo'n 3D-structuur bepaalt, kun je verschillen in vouwing waarnemen door beide afbeeldingen met elkaar te vergelijken. Men kan met behulp van een eiwitoplossing kristallen maken. De vorming van de kristallen, of het randschikkingsproces waarbij moleculen of atomen zich ordenen verloopt in het algemeen in twee fasen. Eerst moet een groeikern of nucleus gevormd worden (nucleatie). Als deze kern er eenmaal is, kunnen meer en meer deeltjes zich geordend op de kern nestelen en zo wordt het kristal groter (groei). Eenmaal groot genoeg kan het kristal blootgesteld worden aan de röntgenstralen en de structuur achterhaald worden.



Figuur 9: De kristalstructuur van keukenzout (NaCl).



Figuur 10: 3D-structuur (stickmodel) van het eiwit lysozym.

De gevolgen van een structuurverschil

De structuur van een eiwit houdt nauw verband met de functie ervan. Wanneer een eiwit anders is gevouwen dan zou moeten, heeft dat gevolgen voor de werking van het eiwit. Bij cystische fibrose is de vouwing van het eiwit zodanig, dat het eiwit zijn functie niet meer kan uitoefenen: er wordt geen chloride meer uit de cel getransporteerd.

Echter, het is niet altijd duidelijk of een veranderde eiwitvouwing het eiwit altijd inactief maakt en of de veranderde eiwitvouwing te maken heeft met de ziekte die onderzocht wordt. Het kan bijvoorbeeld gebeuren dat een eiwit gewoon in verschillende vormen voorkomt, of dat het onderzochte eiwit helemaal niet specifiek is voor de onderzochte ziekte.

Maak nu vraag 1.11 en 1.12

Practicum

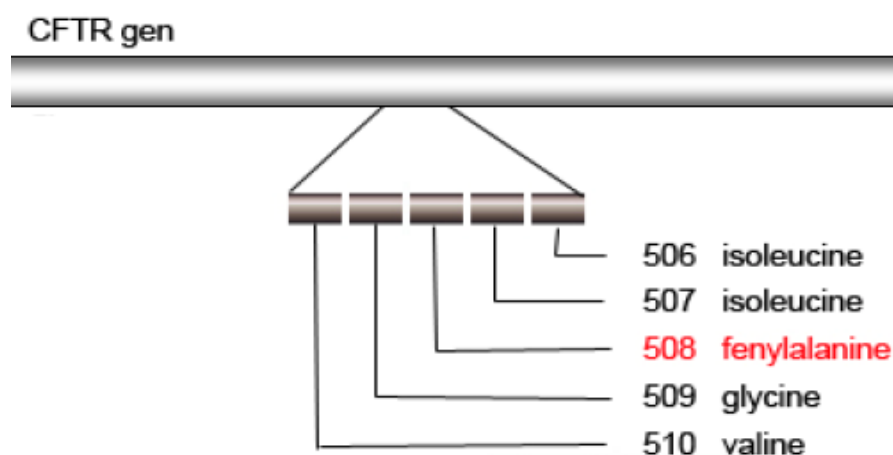
Bij het practicum dat op deze les volgt, ga je jezelf verplaatsen in de onderzoeker en bovengenoemde experimenten uitvoeren. Je zal dus met immunofluorescentie en röntgendiffractie te maken krijgen en ervaren hoe deze experimenten in zijn werk gaan.

Verdieping

De verkeerd gevouwen eiwitten bij cystische fibrose

Bij mensen die lijden aan cystische fibrose is een bepaald eiwit instabiel, waardoor het te snel afgebroken wordt door het lichaam. De volledige naam van het eiwit is het cystische fibrose transmembraan conductie eiwit, wat we aanduiden met de afkorting CFTR. Dit eiwit bevindt zich in het membraan van de cellen in de longen die slijm produceren. Het zorgt er voor dat het geproduceerde slijm de juiste samenstelling heeft. In het bijzonder reguleert het CFTR eiwit de hoeveelheid chloride in het slijm door chloride de cel uit te sturen. Wanneer chloride de cel verlaat stroomt er water mee, waardoor het slijm vloeibaar wordt en zonder problemen door de longen kan stromen om daar te helpen om afvalstoffen af te voeren en de longen schoon te houden.

Bij patiënten die lijden aan cystische fibrose is het CFTR eiwit verkeerd gevouwen. De oorzaak hiervan is terug te vinden in de primaire structuur van het eiwit, dus in de volgorde van aminozuren waaruit het eiwit is opgebouwd. Normaal gesproken bestaat het CFTR eiwit uit 1480 aminozuren met op positie 508 het aminozuur fenylalanine. Bij 70% van de patiënten met cystische fibrose is het aminozuur fenylalanine op deze positie niet aanwezig. In Figuur 11 is het CFTR gen en de plaats van deze mutatie schematisch weergegeven. De mutatie van het CFTR gen op positie 508 heeft een dusdanige invloed op de secundaire en tertiaire vouwing van het eiwit, dat het niet goed meer functioneert. Zo zie je dat een hele kleine verandering in de opbouw van een eiwit van grote invloed kan zijn op de functie ervan.



Figuur 11: Schematische weergave van het CFTR gen en de plaats waar bij de meeste cystische fibrose patiënten een mutatie optreedt: de fenylalanine op positie 508 is dan niet aanwezig.

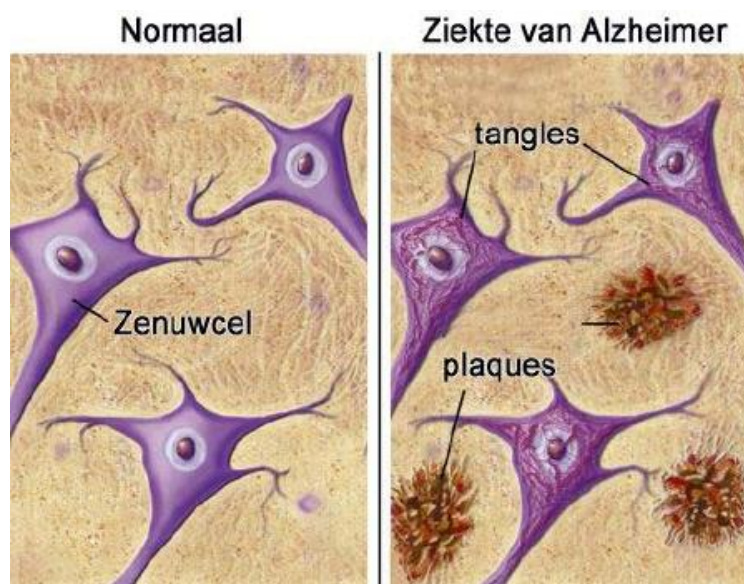
Door de slechte werking van het CFTR eiwit bij cystische fibrose patiënten wordt het slijm in de longen veel te dik. Dit maakt de luchtwegen smaller waardoor ademen moeilijk wordt. Daarbij zorgt de taaie slijmlaag op de longen van cystische fibrose patiënten ervoor dat bacteriën zich in het slijm kunnen nestelen. Ernstige bacteriële infecties zijn hiervan het gevolg en dat is dan ook de voornaamste oorzaak van het overlijden van cystische fibrose patiënten.

De verkeerd gevouwen eiwitten bij de ziekte van Alzheimer

Bij patiënten die lijden aan de ziekte van Alzheimer zorgt een te stabiel eiwit in de hersenen voor problemen omdat het niet afgebroken kan worden door het lichaam. Het eiwit vormt ophopingen in de hersenen, die goed te zien zijn wanneer je de hersenen van gezonde ouderen vergelijkt met die van Alzheimer patiënten.

In de hersenen van mensen die leiden aan de ziekte van Alzheimer bevinden zich namelijk zogenaamde plaques en tangles (Figuur 3 en Figuur 12).

Plaques zijn ophopingen van een bepaald eiwit tussen de hersencellen. Dat eiwit heet amyloïd. Bij ouderen en in het bijzonder bij ouderen met de ziekte van Alzheimer verloopt de afbraak van dit eiwit niet goed. Hierdoor ontstaan een soort eiwitbergjes tussen de hersencellen die waarschijnlijk de overdracht van berichten tussen de hersencellen belemmeren. Op den duur worden ook de zenuwcellen aangetast. Dit is onder andere te zien aan de aanwezigheid van tangles. Een tangle (kluwen) is een wirwar van draadvormige eiwitten in een zenuwcel, die het functioneren van de zenuwcel onmogelijk maakt.



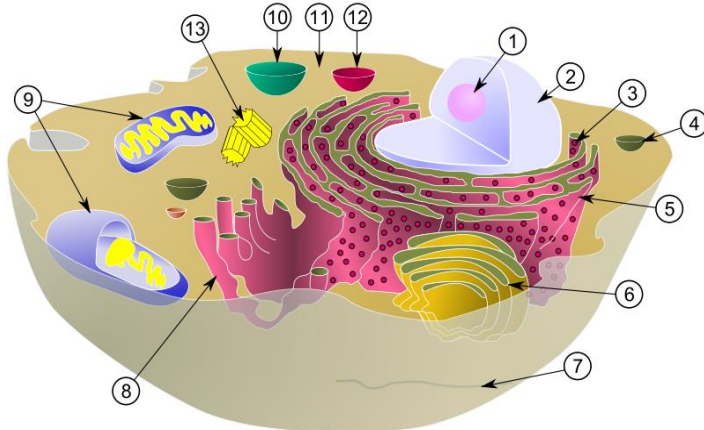
Figuur 12: Verschil tussen de zenuwcellen bij gezonde ouderen (links) en die van patiënten die lijden aan de ziekte van Alzheimer (rechts). Bij de ziekte van Alzheimer ontstaan er in de hersenen zogenaamde plaques, ophopingen van het amyloid - eiwit. Daarnaast ontstaan in de zenuwcellen tangles, onoplosbare eiwitkluwen in de zenuwcellen.

Maak nu vraag 2.1 t/m 2.6

Vragen les 1

Vraag 1.1

Benoem de verschillende celorganellen in onderstaande figuur.



Vraag 1.2

Wat is DNA en wat zijn genen?

Vraag 1.3

Welke belangrijke rol spelen DNA en eiwitten bij de processen die zich in de cel afspelen?

Vraag 1.4

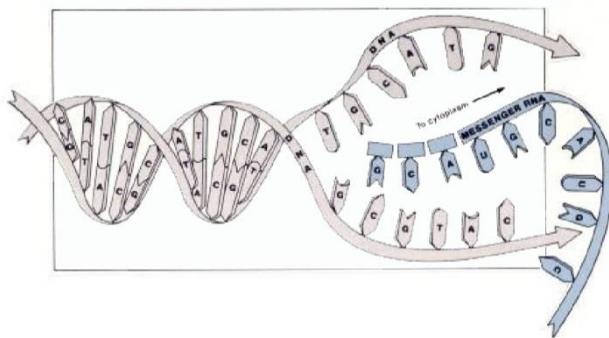
Wat zijn aminozuren en hoeveel verschillende aminozuren bestaan er?

Vraag 1.5

Noem op basis van de gegeven informatie een overeenkomst en een verschil tussen cystische fibrose en de ziekte van Alzheimer.

Vraag 1.6

Beschrijf kort hoe de cel eiwitten maakt van de informatie die zich op de genen in het DNA bevindt. Gebruik daarbij onderstaande afbeelding.



Vraag 1.7

Waarom gaan hydrofiele aminozuren naar de buitenkant van een eiwit?

Vraag 1.8

Wanneer je in een eiwit één aminozuur in de keten verandert, op welk niveau van eiwitvouwing kun je dit het beste aangeven?

Vraag 1.9

Denk je dat de verandering van één aminozuur ook invloed heeft op de rest van de niveaus van eiwitvouwing? Zo ja, hoe?

Vraag 1.10

Hoe zou jij wetenschappelijk onderzoek naar eiwitvouwingsziekten aanpakken?

Vraag 1.11

Waarin denk je dat eiwitten van gezonde en zieke patiënten van elkaar kunnen verschillen?

Vraag 1.12

Hoe denk je dat je de eiwitten toch kunt onderzoeken zonder de longen of hersenen uit een patiënt te halen?

Vraag 2.1

Waarom is het handig om verschillende manieren te hebben om de vouwing van een eiwit weer te geven?

Vraag 2.2

Noem drie processen in het lichaam waarbij eiwitten betrokken zijn en noem de bijbehorende eiwitten als je ze weet.

Vraag 2.3

Stel je voor dat een niet-passend substraat langs een bepaald eiwit komt. Zal het eiwit op deze stof reageren en zo ja, hoe?

Vraag 2.4

Bij patiënten met cystische fibrose kunnen de cellen in de longen geen chloride meer uitscheiden. Waarom kan dit leiden tot dikker slijm?

Vraag 2.5

Hoe kan het dat het ontbreken van slechts één aminozuur in het CFTR eiwit zulke ernstige gevolgen heeft?

Vraag 2.6

Hoe zorgen de plaques in de hersenen van Alzheimer patiënten voor verwardheid, een van de symptomen van deze ziekte?

Les 2 en 3: Practicum

Experiment 1a: Immunofluorescentiekleuring

De verschillen tussen cellen van gezonde en zieke mensen

Doel van het experiment

De cellen van gezonde en zieke mensen verschillen van elkaar. Deze verschillen kunnen zich op veel manieren presenteren, bijvoorbeeld in de vorm of de grootte van de cellen of in de samenstelling van de cellen. Bij cystische fibrose ligt het verschil in stabiliteit van het CFTR eiwit. Op het oog zien de cellen er hetzelfde uit, maar het verschil tussen een stabiel, goed werkend eiwit en een instabiel eiwit dat niet goed werkt is zichtbaar te maken met een fluorescente kleuring. Behalve CF-cellen kunnen ook menselijke tumorcellen als voorbeeld dienen voor een eiwit dat niet meer gemaakt kan worden. CF-cellen zijn niet te verkrijgen maar (gefixeerde) tumorcellen wel. Daarom zullen jullie een proefje uitvoeren met gefixeerde, dode, HeLa cellen.

De groene fluorescente stof FITC is gekoppeld aan een antistof dat specifiek bindt aan het tubuline eiwit. Wanneer een cel dit eiwit bevat, zie je na de reactie in de cellen een groene kleur verschijnen onder de fluorescentiemicroscopie. Bij cellen waarin geen/weinig tubuline aanwezig is, vindt de kleuring niet/minder plaats.

Maak nu eerst vraag 1.1

Benodigdheden

- Een dekglasje met gefixeerde tumorcellen (HELA)
- PBS/tween buffer
- Pasteur pipet
- Anti-tubuline gelabeld met FITC (AB)
- Propidium-jodide (PI)
- Fluorescentiemicroscopie

Instructies en uitwerking

Volg altijd nauwkeurig de aanwijzingen van de assistenten en neem de informatie in de presentatie goed in je op!

- Was het dekglasje met gefixeerde tumorcellen door 1 à 2 mL PBS/tween-buffer in het schaalpje te pipetteren met een pasteur pipet. Zwenk 10 seconden en verwijder de vloeistof met hetzelfde pipet. Hierbij kan je het petrischaaltje licht schuin houden.
- Verspreid 80 µl antistof (AB; FITC-geconjugeerd anti-tubuline) over de cellen op het dekglasje.
- Dek je petrischaaltje af met aluminiumfolie en incubeer minstens 15 minuten in het donker bij kamertemperatuur.

Tijdens de incubatie zal experiment 2 uitgevoerd worden. Let er op dat je deze twee proeven gescheiden houdt!

Experiment 2: Röntgendiffractie

Het bepalen van de 3D-structuur van een eiwit

Doel van het experiment

Om te achterhalen wat nu precies het verschil is tussen een actief (goed gevouwen) en inactief (verkeerd gevouwen) eiwit, is röntgendiffractie een geschikte techniek. Bij deze methode moeten de eiwitten in kristalvorm zijn. Het hele onderzoek valt of staat met de kwaliteit van deze kristallen. De moleculen moeten heel regelmatig gerangschikt zijn willen ze leiden tot de juiste driedimensionale structuur.

Maak nu eerst de vragen 2.1 en 2.2

Benodigdheden

- Lysozym: 100 mg/ml stockoplossing
- Neerslagmix: 30% mono-methyl-PEG 5000 in 1M NaCl, 50 mM Na acetaat, pH 4.7
- Objectglasje
- Pipet met een pipetteervolume van 15 µl

Instructies en uitwerking

Volg altijd nauwkeurig de aanwijzingen van de assistenten en neem de informatie in de presentatie goed in je op!

- Gebruik de rand van het objectglasje om je microscoop scherp te stellen.
- Leg je objectglasje weer op je werkblad en pipetteer er 15 µl lysozymoplossing op.
- Pipetteer 15 µl neerslagmix ongeveer 1 cm naast de lysozymoplossing.
- Meng de vloeistoffen door met een pipetpunt een brug te vormen tussen beide vloeistoffen (3x heen en weer).
- Leg het objectglasje onder de microscoop en kijk wat er gebeurt (elke paar min).

Maak nu de vragen 2.3 en 2.4

Experiment 1b: Immunofluorescentiekleuring

De verschillen tussen cellen van gezonde en zieke mensen

Het vervolg van experiment 1a

- Haal je dekglasje uit het donker en was het 3x keer met de PBS/tween-buffer door 1 à 2 mL PBS/tween-buffer in het schaaltje te pipetteren met een pasteur pipet. Zwenk 10 seconden en verwijder de vloeistof met hetzelfde pipet. Hierbij kan je het petrischaaltje licht schuin houden. Zorg ervoor dat het dekglasje niet kan opdrogen.

Let bij de volgende stap goed op de aanwijzingen van de assistent!

- Verspreid 80 µl propidium-jodide (PI) over de cellen op het dekglasje en laat dit maximaal(!) 20 seconden in het donker incuberen.
- Haal je dekglasje weer uit het donker en was het nu 3x met PBS/tween-buffer.
- Bekijk het objectglasje met de gefixeerde kankercellen samen met een van de assistenten onder de fluorescentiemicroscoop bij een vergroting van 1000x. Teken hoe de cellen er nu uitzien. Gebruik bij voorkeur kleurpotloden.

Heb je dit gedaan, zorg ervoor dat je cellen in het donker staan tot de assistent bij je langs komt om er een preparaat voor onder de fluorescentiemicroscoop van te maken.

Maak nu de vragen 1.2 en 1.3

Vragen les 2 en 3

Experiment 1

Vraag 1.1

Formuleer de onderzoeksvraag van experiment 1.

Vraag 1.2

Zie je in de HELA cellen de tubuline aangekeurd? Geef het verschil aan met het aangekleurde fibronectine en leg uit wat dit betekent.

Vraag 1.3

Conclusie: Je hebt zojuist onderzocht wat het verschil is tussen de cellen van een gezond persoon en die van een ziek persoon. Wat is je conclusie uit dit experiment? Denk hierbij aan de onderzoeksvraag die je bij vraag 1.1 hebt geformuleerd.

Experiment 2

Vraag 2.1

Formuleer de verschillende stappen die nodig zijn om via de röntgendiffractie-techniek de driedimensionale structuur van eiwitten op te helderen. (de informatie in de presentatie kan je hierbij helpen).

Vraag 2.2

Formuleer de onderzoeksvraag van experiment 2.

Vraag 2.3

Teken wat je door de lichtmicroscopie ziet op de volgende tijdstippen: 1, 3, 5 en 7 minuten.

Vraag 2.4

Conclusie: Je hebt zojuist onderzocht hoe je een eiwitkristal kunt maken om met behulp van röntgendiffractie de driedimensionale structuur van eiwitten zichtbaar te maken. Wat is je conclusie uit dit experiment? Denk hierbij aan de onderzoeksvraag die je bij vraag 2.1 hebt geformuleerd.

Les 4: Afsluitende les

Na voltooiing van zowel de voorbereidende les als het practicum, volgt een afsluitende les. De docent heeft hiervoor een aantal keuzemogelijkheden, waardoor hier een aparte handleiding voor uitgereikt zal worden. Voor meer informatie over de onderwerpen uit het practicum kun je ook terecht op www.allesoverdna.nl