

CORONA ONDER DE LOEP (33)

Je maakte inmiddels kennis met de zes stappen in het penetratieproces:

1. de conformatieverandering in de S1 subunit (open versus gesloten vorm),
2. de binding aan de ACE2-receptor in de celmembraan van de gastheer,
3. de splitsing S1 subunit <> S2 subunit o.i.v. furine,
4. de splitsing in de vrije S2 subunit ter hoogte van S2' o.i.v. TMPRSS2,
5. de helix-vorming van de domein HR1 met domein HR2
6. de werking van het fusiepeptide (wordt aanstands toegelicht).

Waarom toch al deze details?

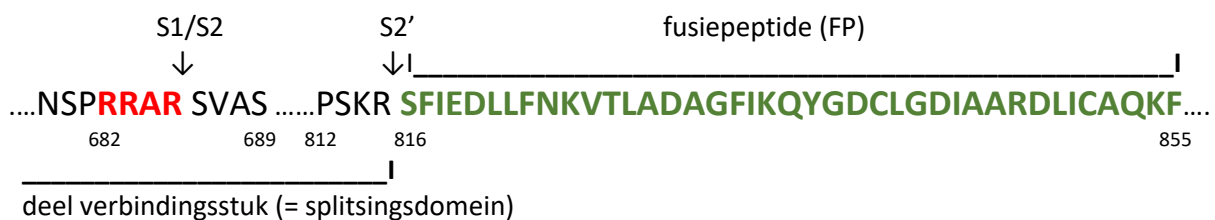
Hierom: als je in deze processen enig inzicht hebt gekregen, dan

- a. sta je er versteld van hoe 'de natuur' in de loop van miljarden jaren dit alles zo nauwkeurig (voor virussen) heeft geregeld en verbaas je je over de moeite die *ons eigen lichaam* kennelijk doet om virusdeeltjes in onze cellen op te nemen, te vermenigvuldigen en te verspreiden,
- b. zul je gaan begrijpen op grond waarvan bepaalde varianten (mutanten) besmettelijker kunnen zijn,
- c. kun je je enigszins verplaatsen in de denkwijze van deskundigen die in deze reactieketen aangrijpingspunten trachten te vinden voor de ontwikkeling van geneesmiddelen die de celpenetratie van SARS-CoV-2 kunnen blokkeren.

De laatste stap.

Het fusiepeptide (FP) speelt de hoofdrol in de laatste stap in het fusieproces. Het precieze werkingsmechanisme van het FP is niet volledig bekend; er wordt nog volop onderzoek naar gedaan. We zetten de belangrijkste aspecten op een rij.

Om een beeld te krijgen van wat er allemaal gebeurt, kijken we nog eens naar het uitgerolde S-eiwit, althans naar een gedeelte daarvan.



Geheel links zie je een deel van het verbindingstuk tussen de subunits S1 en S2. Je herkent dit aan de aanwezigheid van het motief **RRAR**, de sequentie waar het enzym furine specifiek op aangrijpt (afl. 32).

En inderdaad: tussen het aminozuur arginine in **RRAR** en het aminozuur serine (S), dus op het scheidingspunt tussen S1 en S2 tussen 685 en 686, wordt het S-eiwit (glycoproteïne) door het enzym furine in tweeën gedeeld.

Wat we nu overhouden aan de rechterkant is een aminozuurketen (een peptide) die begint met het aminozuur serine (S) gevolgd door V (valine), door A (alanine) en S (serine; op positie 689). De tussenliggende aminozuren (690 tot en met 811) zijn kortheidshalve niet vermeld. Daarna volgen proline (P op plaats 812), serine (S), lysine (K) en arginine (R). Nu zijn we op het punt aangekomen,

gemarkt S2', waar de protease TMPRSS2 zijn schaar zet. Door die splitsing ontstaan een minder belangrijk restpeptide SVAS.....PSKR, dat in totaal 130 aminozuren omvat én het overgebleven deel van de S2 subunit van 816 tot 1273. Van deze ketting stellen de met groene kleur weergegeven aminozuren het fusiepeptide (FP) voor. Dit deel omvat 40 aminozuren en begint dus met S (serine) op plaats 816 en eindigt met F (fenylalanine) op positie 855. De taak van het fusiepeptide is om als het ware te versmelten met de celmembraan van de gastheer. Dan is de omstandigheid gecreëerd waarin beide celmembranen, die van het virusdeeltje en die van de gastheercel, in elkaar opgaan.

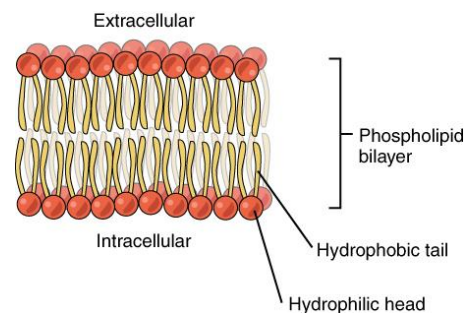
Om de versmelting van de virusmembraan met de celmembraan o.i.v. het FP beter te kunnen begrijpen, is het nodig enige kennis te hebben van de structuur van (cel)membranen.

Uitstapje

De membranen van onze lichaamscellen bestaan hoofdzakelijk uit vetachtige structuren.

Het microscopisch beeld toont ons naast elkaar gerangschikte moleculen in de vorm van kikkervisjes die twee staarten dragen. Elk 'kikkervisje' vertegenwoordigt één molecuul, zij het dat elk van deze moleculen weer is opgebouwd uit verschillende onderdelen.

Onze celmembranen tonen een regelmatig patroon van deze moleculen: de koppen zijn van elkaar afgewend en de staarten naar elkaar toe gericht. Ze vormen op die manier een dubbele laag (*bilayer*)¹ van **fosfolipiden**, want zó worden deze kikkervisjes genoemd.



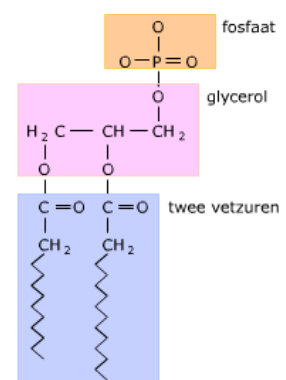
We onderscheiden aan een fosfolipide drie bouwstenen:

- 1 een onderdeel dat het element **fosfor** bevat (we noemen dit deel: een *fosfaat*-groep); in de tekening aangeduid met de rode bol;
- 2 een **lipide**-deel, dit is een vetachtige structuur, getekend als staarten die met de fosfaatgroep verbonden zijn: dit zijn **vetzuren**;
- 3 een molecuul **glycerol** (glycerine) dat de verbinding vormt tussen de fosfaatgroep en de staart (zie hierna).

Je ziet rechts een simpele vorm van een fosfolipide-molecuul afgebeeld. De 'kop' bestaat dus uit de fosfaatgroep (oranje). Deze is gebonden aan een molecuul glycerol (roze). Dit geheel is gekoppeld aan twee vetzuren (blauw). Deze laatste vormen het lipiden-gedeelte van het molecuul en geven, gebonden aan glycerol, het fosfolipide zijn vette karakter. De (vettige) buitenkant van al onze celmembranen is dus opgebouwd volgens het patroon kop-staart-staart-kop.

Voor de bespreking van de laatste stap in het fusieproces is het van belang dat je de volgende eigenschappen van de fosfolipiden leert kennen.

- ✓ De fosfaatgroep bezit een zekere lading. Die geeft dit deel van de fosfolipiden de eigenschap zich tot water(moleculen) aangetrokken te voelen. Die eigenschap noemt men in de chemie: hydrofiel, letterlijk vertaald: water liefhebbend. Een fosfolipide bezit dus een hydrofiële kop.
- ✓ Aan glycerol gebonden **vetzuren** (zie de formule) daarentegen houden helemaal niet van water; vetten zijn niet zonder meer mengbaar met water. Die afkeer is te verklaren door het feit dat een aan glycerol gebonden vetzuur geen lading draagt. Hierdoor wordt het heel lastig zich met water(moleculen) te mengen. Een dergelijke eigenschap van een chemische stof



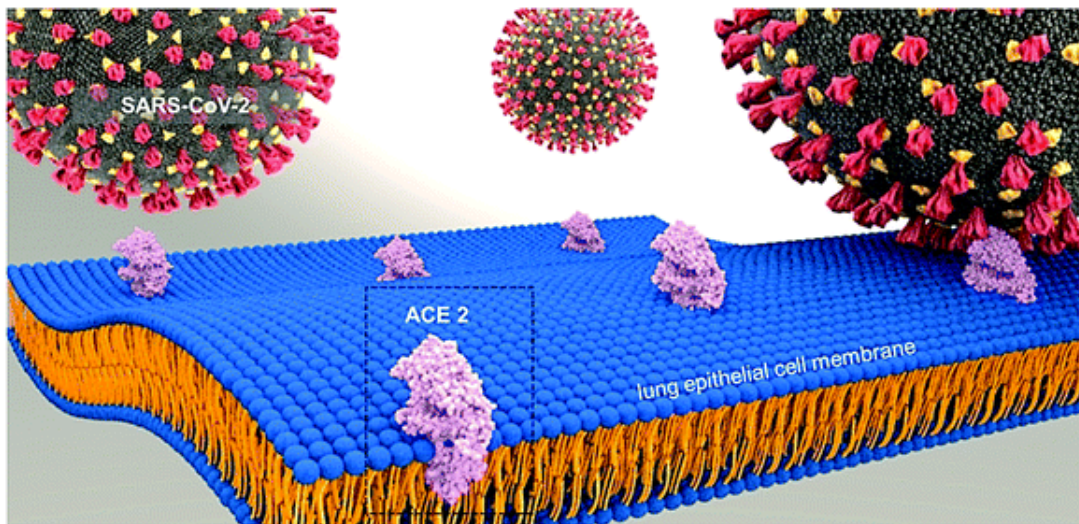
¹ Ik zal in de tekst die volgt als de vertaling van het Engelse *bilayer* gemakshalve bilaag gebruiken.

noemt men hydrofoob (water vrezend). Dat geldt voor de beide staarten van een fosfolipide-molecuul. Je zou ook kunnen zeggen dat ze van vet houden, en dat verklaart de term *lipofiel* die men vaak in plaats van hydrofoob gebruikt. In kwantitatieve zin overheerst het hydrofobe (lipofiele) karakter van onze celmembranen. Ook de virusenvelop (virusmembraan) bestaat uit fosfolipiden. Immers, de celmembraan van virussen zijn in feite afkomstig van de celmembraan van de gastheer die ermee werd geïnfecteerd.

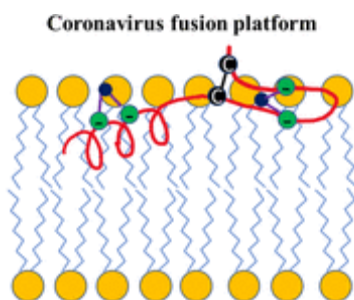
Samengevat: onze celmembranen bestaan uit een bilaag van naast en achter elkaar gelegen fosfolipidenmoleculen; ieder fosfolipide bestaat uit een hydrofiel deel (de kop van het kikkervisje) en een hydrofoob deel (de staart).

Hieronder zie je een fantasierijk plaatje dat niettemin tot de verbeelding spreekt.

Afgebeeld is de interactie tussen het SARS-CoV-2 virus met de membraan van een epitheelcel. Uit de bilaag van fosfolipiden (vetzuurstaarten oranje en de polaire koppen blauw) steken hier en daar ACE2 moleculen (roze) - de bindingsplaatsen voor het virusdeeltje – naar buiten.



Terug naar het fusiepeptide.



We vragen ons af hoe het fusiepeptide te werk gaat in de finale stap in het fusieproces. Er moeten tenslotte twee membranen samenvloeien tot één en dat proces moet leiden tot de vorming van een endosoom dat het virusdeeltje in zich draagt. De tekening geeft schematisch weer hoe dit gaat gebeuren. We zien hier de membraan van – laten we zeggen – een epitheelcel in onze luchtweg. Inmiddels is door de vormverandering van HR1 en HR2 (stap 5) de virusmembraan tegen de celmembraan aan gedrukt (niet getoond).

Getekend is alleen het fusiepeptide (FP), dat zich als een gevouwen keten van aminozuren (rood) aan het oppervlak heeft vastgeklampt en zich vooral óók *in* het 'vette' deel (de fosfolipidenlaag) van de celmembraan heeft gemanoeuvreed. In de Engelstalige literatuur wordt dit gebied *fusion platform* genoemd.

Het binnendringen van FP in de bilaag van fosfolipiden van onze celmembranen is dus een voorwaarde voor de fusie van het virusdeeltje, want door die vermenging wordt de membraanstructuur van onze cellen substantieel ontwricht.

Om het belang van deze gebeurtenissen te benadrukken (de 'indringende' werking van het FP), stel ik nu reeds vast dat de structuur van het FP in hoge mate bepalend is voor het gemak waarmee FP zich

met de fosfolipidenlaag kan mengen en *dus* voor **de snelheid** waarmee het virusdeeltje het interne van onze cellen kan bereiken.

Samengevat is dit de achtergrond:

Het FP komt dus op zijn pad de overwegend 'vette' celmembraan van de gastheer tegen. Die (lipofiele) "vetlaag" is moeilijk binnen te dringen door hydrofiële chemische stoffen en veel gemakkelijker door hydrofobe (lipofiele) structuren: slaolie mengt goed met olijfolie, maar slaolie stoot water af.

We constateren echter dat het FP in de spike van het coronavirus erin slaagt zijn werk te doen en dus óók dat dit peptide kennelijk hydrofoob (lipofiel) genoeg is om zich te mengen met de 'vette' fosfolipiden in onze celmembranen. Waar ligt dat aan?

Een peptide bestaat uit een ketting van aminozuren. De afzonderlijke aminozuren bezitten niet allemaal dezelfde lading; het ene aminozuur is hydrofieler dan het andere en dus ook: het ene aminozuur is lipofiel dan het andere. Een dergelijke eigenschap hangt af van de chemische structuur van elk afzonderlijk aminozuur.

Stel je voor dat alle aminozuren in het FP de eigenschap hebben hydrofiel te zijn, dan wordt het voor het hele molecuul heel erg lastig zich te mengen met de hydrofobe (lipofiele) fosfolipiden van onze celmembranen. Stel je aan de andere kant voor dat deze aminozuren alle lipofiel zijn, dan kan het FP veel gemakkelijker onze 'vette' celmembraan binnendringen. Het is echter wél zo dat het FP van bijvoorbeeld SARS-CoV-2 (het wildtype) een aantal hydrofobe en een aantal hydrofiële aminozuren bevat. Welke hebben de overhand? Je zult begrijpen dat de verhouding hydrofoob/hydrofiel bepalend is voor het gemak waarmee het FP de fosfolipidenlaag binnen kan dringen en deze kan ontregelen. Hoe groter dit gemak (de snelheid van penetratie), des te besmettelijker het virus! Een voorbeeld ter illustratie:

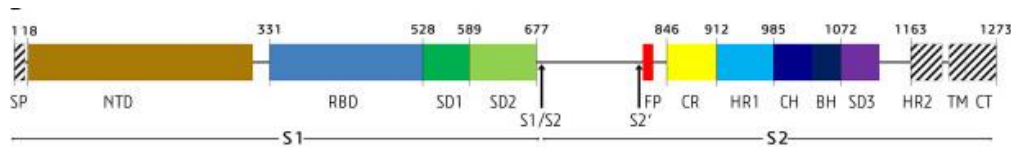
Je haalt je hand uit een bak met olie. Je hebt een heel vette hand en wil deze reinigen. Je spuit er één halve dosering vloeibare zeep op en na wassen met water blijkt dat je hand nog behoorlijk vet is: er was te weinig zeep om de hand helemaal vetvrij te maken. Het lukte bij lange na niet om alle olie met het toegevoegde water zó te mengen dat het vet in een emulsie kon worden weggespoeld. Als je één hele dosering zeep had genomen was het resultaat wellicht nóg steeds onbevredigend. Maar met twee porties zeep had je hoogstwaarschijnlijk in één keer al het vet kunnen wegwassen.

Het fusiepeptide bestaat uit aminozuren. Als van de pakweg 40 aminozuren in de ketting er maar één een lading bezit (en de rest dus neutraal is) zal het peptide door het grote aantal hydrofobe (niet-geladen) aminozuren waarschijnlijk héél gemakkelijk mengen met de fosfolipiden van de celmembraan. Maar... wat zal er gebeuren als het FP vijf aminozuren met een lading bezit en dus het hele peptide wat hydrofieler wordt, wat dan? Dan zal de penetratie in de celmembraan lastiger worden. En hoe zit het als dat er wel tien zijn?

Hoe meer zeep, des te gemakkelijker mengt de olie met water; hoe meer hydrofobe (lipofiele) aminozuren in het FP, des te gemakkelijker mengt de aminozuurketting met de ('vette') fosfolipiden in de celmembraan.

Microbiologen stelden de sequentie vast van zowel het fusiepeptide in de spikes van SARS-CoV-2 als SARS-CoV-1. Je weet het misschien nog: SARS-CoV-1 veroorzaakte in de jaren 2002 en 2003 óók een coronapandemie.

De onderzoekers brachten de aminozuren in kaart direct rechts van S2', dus na het punt waar het enzym TMPRSS2 het overgebleven deel van het S-eiwit splitst (zie de volgende figuur). Dat is precies rechts van positie 816. Ze brachten twintig aminozuren in beeld.



SARS-CoV-2 Spike Protein

Hieronder staat op de eerste regel de sequentie in dit gebied van SARS-CoV-2 en op de tweede regel die van SARS-CoV-1. De letters verwijzen, zoals inmiddels bekend, naar aminozuren.

SARS-CoV-2 >>

SFIEDLLFNKVTLDAGF **I** KQYG**D**CLGDI**A**ARDLICAQKF
816

SARS-CoV-1 >>

SFIEDLLFNKVTLDAGF **M** KQYG**E**CLGDINARDLICAQKF
816

Beide kettingen beginnen met aminozuur S (serine) op plaats 816. We kijken naar de overeenkomsten. Deze zijn erg groot. De verschillen zijn in rood aangegeven: isoleucine (I) i.p.v. methionine (M), asparaginezuur (D) i.p.v. glutaminezuur (E), alanine (A) i.p.v. asparagine (N).

In de wetenschappelijke literatuur vinden we een aantal keren de hiernavolgende conclusies en veronderstellingen die betrekking hebben op fusiepeptiden in het algemeen:

“Uit het oogpunt van membraanfusie is het virale fusiepeptide misschien wel het meest kritische domein van het S-eiwit, omdat dit gedeelte op directe wijze een interactie aangaat met de gastheercel en deze uiteenscheurt. Meestal bestaat een FP uit veel *hydrofobe* aminozuren. Ook zitten er altijd wel wat *geladen* (hydrofiele) aminozuren tussen. Het domein van fusiepeptiden in het S-eiwit is uiterst gevoelig voor mutaties, en wel in die mate dat een enkele substitutie binnen een FP resulteert in een verandering van fusie-activiteit. Tijdens het fusieproces zal de hydrofobe regio van het peptide zich in de celmembraan dringen, wat een conformatieverandering van het FP tot gevolg heeft, wat weer leidt tot een sterkere desintegratie van de fosfolipiden bilaag. Hoe het binnendringen van een FP in de celmembraan ter hoogte van het fusieplatform precies verloopt is nog grotendeels onbekend. Zeker is dat de fysieke aanwezigheid van het FP in de bilaag beide membranen – die van het virus én die van de gastheercel – samen laat vloeien”.

Hoewel beide virussen slechts op drie plaatsen verschillen, veroorzaakt het FP van SARS-2 een significant grotere membraanverstoring dan het FP van SARS-1. De verklaring hiervan zou zijn dat de vetoplosbaarheid van die drie afwijkende aminozuren in het FP van SARS-2 groter is dan de drie in het FP van SARS-1. Dat zou kunnen bijdragen aan de grotere besmettelijkheid van SARS-2 t.o.v. SARS-1.

Verder is met zekerheid komen vast te staan dat de werking van fusiepeptiden afhankelijk is van de aanwezigheid van (voldoende) calcium. Voordat FP zijn werk kan doen, bindt het aan calcium. Deze koppeling stimuleert het FP van SARS-2 beter dan dat van SARS-1, zo bleek uit onderzoek.

In aflevering 35 duiken we weer in de mutanten, waarbij met name de Britse, de Braziliaanse en de Zuid-Afrikaanse variant de aandacht krijgen. Aflevering 34 gaat geheel over de (zeldzame) bijwerking van het Astra-Zeneca vaccin. Hoe bijzonder!

Arijan Porsius
11 april 2020

Naschrift.

Een drama, maar ook iets over vetten en zeep (mocht je dit willen weten).

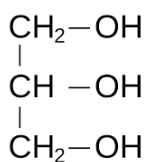
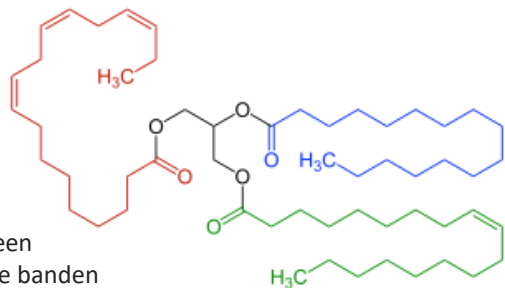
IN EEN KUIP MET VETZUREN GEVALLEN.

4 maart 1930.

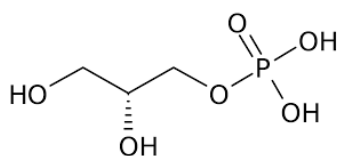
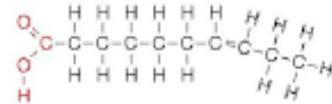
Vannacht hééft in de oliefabriek *de Engel*, van de firma Crok & Laan te Wormerveer, een ongeluk met dodelijke afloop plaats gehad. De 23-jarige ongehuwde fabrieksarbeider L. uit Schermerhorn, was belast met het opkoken, van een kuip vetzuren. In deze kuip waren ongeveer 10.000 liter vetzuren, welke door middel van een stoomleiding werden verhit. L. was belast met het openen en sluiten van de stoomkraan. Toen, de voorman bemerkte, dat de kuip overkookte, werd L. vermist en men vermoedde, dat hij door de gladheid in de kuip was gevallen. Nadat de inhoud was weggevoerd, vond men den arbeider in de kuip. Vermoedelijk is L. bij het sluiten, van de kraan in de kokende massa gevallen, doordat hij van een loopplank uitgleed. Het lijk is per politiebrancard naar het gemeentelijk ziekenhuis vervoerd. [Uit: *Het Vaderland* van 5 maart 1930]

Oliën als olijfolie, zonnebloemolie en arachideolie behoren tot de vetten. Kijk je met een chemische blik naar een vet, dan zie je aan de chemische structuur dat het is opgebouwd uit **drie** vetzuurmoleculen (die verschillend van structuur kunnen zijn) én glycerol. Daarom rangschikt de chemicus vetten onder de verzamelnaam triglyceriden (>> glycerol en drie [tri] vetzuren).

Het plaatje rechts toont de structuurformule van een bepaald vet. In het midden zie je een molecuul glycerol (glycerine), weergegeven in zwart; glycerol kan op **drie** plaatsen in zijn molecuul binden aan de zure groepen van vetzuren; we zien hier dan ook in de kleuren groen, blauw en rood **drie** vetzuren; ze verschillen in structuur. Je ziet een vetzuur zonder dubbele band (blauw); dit noemen we een verzadigd vetzuur; je ziet een vetzuur met één dubbele band (groen); dit noemen we een enkelvoudig onverzadigd vetzuur én een vetzuur dat drie dubbele banden herbergt (rood): een meervoudig onverzadigd vetzuur.



Links zie je een molecuul glycerol; het zijn de **OH**-groepen die binden aan de zure groepen van een vetzuurmolecuul. Zo'n zure groep (in de chemie genoemd: een carboxylgroep) zit aan een uiteinde van een vetzuur (rood) (de formule rechts). De drie OH-groepen in glycerol kunnen onder bepaalde condities reageren met de drie carboxylgroepen van drie vetzuren. Dan ontstaat er dus een vet!



Onze celmembranen (en die van virussen) zijn, zoals we lazen, opgebouwd uit een geladen kop (bestaande uit een fosfaatgroep en glycerol) én 'slechts' **twee** vetzuren (twee 'staarten'). Je begrijpt dat dit er geen drie kunnen zijn, omdat één OH-groep van het glycerolmolecuul gebonden is aan (bezet wordt door) de fosfaatgroep (zie de structuur links; in deze formule zijn de

C-atomen niet aangegeven). Op die plek reageerde die OH-groep met fosforzuur, zodat er voor het derde vetzuur geen plek meer is. Je begrijpt nu waarom onze celmembranen een *vet* karakter hebben!

Dit nog even terzijde:

1. Het vervangen van verzadigde vetten door onverzadigde vetten in ons dieet heeft een positief effect op het cholesterolgehalte in het bloed. Het verlaagt het gehalte aan LDL-cholesterol (d.i. het ongezonde vet) en vermindert zo de kans op het krijgen van hart- en vaatziekten.
2. *Triglyceriden* zijn vetten die voornamelijk dienen voor het leveren van energie, en komen uit de voeding. Een te hoge triglyceriden-concentratie in ons bloed heeft een negatief effect op onze gezondheid: samen met cholesterol kunnen ze verkalking van de slagaderen teweegbrengen.
3. Uit vet/olie wordt zeep bereid. Men laat het vet reageren met loog, te weten natronloog (NaOH) of kaliloog (KOH). Hierbij ontstaat een zout van vetzuren = zeep. Bij de zogenaamde 'warme methode' wordt het mengsel gedurende enkele uren tot tegen het kookpunt verwarmd, waarna de zeep in principe direct kan worden gebruikt. Mogelijk was dit de arbeid waarmee de jongeman L. uit Schermerhorn zijn brood verdiende en die hem op zo'n gruwelijke wijze het leven kostte.