



.....Met enzymen

PROF. DR. WILLEM J.H. VAN BERKEL

Inaugurale rede bij de aanvaarding van het ambt van
persoonlijk hoogleraar in de Moleculaire Enzymologie
aan Wageningen University op 28 april 2011



WAGENINGEN UNIVERSITY

WAGENINGEN **UR**

Met enzymen

PROF. DR. W.J.H. VAN BERKEL

Inaugurele rede bij de aanvaarding van het ambt van persoonlijk
hoogleraar in de Moleculaire Enzymologie aan Wageningen University
op 28 april 2011



WAGENINGEN UNIVERSITY

WAGENINGEN **UR**

ISBN 78-90-8585-893-5

• • •

2

Prof. dr. W.J.H. van Berkel Met enzymen

Met enzymen

Mijnheer de Rector Magnificus, dames en heren

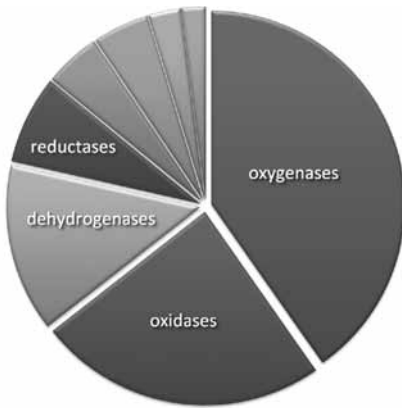
Wie kent er niet de fabel over Sissa die het schaakspel uitdacht voor koning Shiram. De koning uitte zijn dankbaarheid en vreugde over deze gunst, en sprak tot Sissa: 'Vraag mij alles wat gij verlangt.' Nou zei Sissa, dan wens ik één graankorrel op het eerste veld, twee op het tweede veld en zo steeds een verdubbeling tot het laatste veld. De koning vond dit maar een bescheiden wens, maar toen zijn rentmeester berekend had dat al het graan van de wereld niet voldoende was om aan de wens te voldoen, sprak hij tot Sissa: 'Kunt U niet bij de WUR solliciteren? Daar zijn ze verzot op creatievelingen zoals U.'

Waarom vertel ik U dit? Het schaakspel heeft mijn wetenschappelijke carrière behoorlijk beïnvloed en gestimuleerd. Bij het schaken kun je allerlei varianten verzinnen, maar de perfecte combinatie ontstaat pas wanneer je de strategie en dwarsverbanden begrijpt. Zo is het ook met enzymen die allemaal iets anders kunnen maar vooral interessant worden wanneer je begrijpt hoe, waarom, waar en wanneer ze wat doen.

Enzymen spelen een centrale rol in de biochemie, de chemie van de levende natuur. Zij zorgen voor onze spijsvertering en bepalen vaak het verschil tussen ziek of gezond. Enzymen hebben een revolutie teweeggebracht in de moleculaire biologie, waardoor we nu allerlei eiwitten naar wens kunnen produceren en veranderen. Ik verwacht dat enzymen nog veel belangrijker gaan worden en dat zij een sleutelrol zullen spelen bij de ontwikkeling van een duurzame samenleving.

Geïnspireerd door hun biologische en chemische veelzijdigheid heb ik me in Wageningen verdiept in de werking en toepassing van redoxenzymen, katalysatoren die voor hun activiteit een of meerdere cofactoren nodig hebben. Figuur 1 geeft een overzicht van 40 bestudeerde enzymen, ingedeeld op activiteit. Hierbij moet worden aangetekend dat dit moleculaire onderzoek door de jaren heen is uitgevoerd binnen de schuivende panelen van alternatieve energie, milieubewustwording, gezonde voeding, welzijn en duurzaamheid.

Hoe gaat dat bestuderen van die enzymen eigenlijk? Moleculair enzymologisch onderzoek is sterk interdisciplinair en houdt zich vooral bezig met de relatie tussen de chemie, de structuur en de dynamica van enzymen. Daarnaast is er een toenemend streven om de 'in vitro' eigenschappen van enzymen te relateren aan de metabole activiteit van de cel. De moleculair enzymoloog bestudeert de mechanistische details van biomoleculaire processen, die kunnen variëren van complexe multi-component systemen tot een enkel eiwitmolecuul. Structuurchemie en rekenmethoden worden daarbij gekoppeld aan reactiedynamiek, engineering, spectroscopie, chemische analyse en theorie.



.....

Fig. 1. Favoriete enzymen in de onderzoeksgroep Enzymes@Work.

Enzymkatalyse

Emil Fischer postuleerde in 1890 dat een substraat in het actieve centrum van een enzym past als een sleutel in een slot. Hij kon toen nog niet bevroeden dat er vele manieren zijn om de activiteit van een enzym te reguleren door modificatie of allosterie. Daniel Koshland introduceerde in 1958 zijn induced-fit theorie. Deze theorie gaat er van uit dat door substraatbinding het actieve centrum van het enzym de juiste conformatie aanneemt voor katalyse. Mede door ons onderzoek aan flavoenzymen weten we nu dat ook dit model te simplistisch is (Fig. 2). Enzymen zijn dynamische eenheden die continu in beweging zijn en net als andere biomoleculen gebruik maken van het principe van conformationele selectie (Boehr *et al.*, 2009). Tijdens de katalyse ondergaan zowel enzym als substraat veranderingen in geometrie, lading en interacties. De dynamica zorgt daarbij voor een landschap aan energietoestanden.

.....

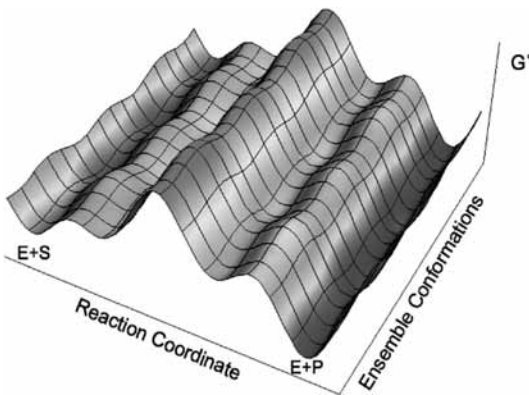


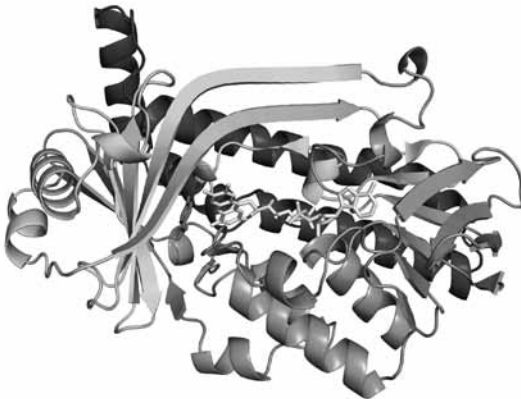
Fig. 2. Landschap van energietoestanden tijdens enzymkatalyse.

Enkele hoogtepunten

In de eerste jaren van mijn onderzoek heb ik me vooral beziggehouden met de werking van oxidatieve enzymen die betrokken zijn bij het opruimen van aromatische verbindingen in de bodem. Dit leidde in samenwerking met de Universiteit van Groningen tot een hoge-resolutie kristalstructuur van het

enzym-substraat complex van 4-hydroxybenzoaat 3-hydroxylase, liefkozend PHBH genoemd (Fig. 3). Dit mono oxygenase katalyseert een loepzuivere regioselectieve hydroxyleringsreactie die niet na te bootsen is met chemische middelen. De eiwitstructuur van PHBH is opgebouwd uit drie domeinen die alle drie betrokken zijn bij de katalyse. In oranje ziet U het domein dat verantwoordelijk is voor de binding van de gele flavine cofactor. Deze stevig gebonden cofactor, ook wel prosthetische groep genoemd, is nodig voor de activering en splitsing van moleculaire zuurstof. In groen ziet U het domein dat het in rood weergegeven aromatische substraat bindt. Aan de achterkant ziet U in blauw het domein dat zorgt voor de interactie met nog eenzelfde eiwitmolecuul. Het enzym is namelijk een dimeer, een soort Siamese tweeling.

.....



.....

Fig. 3. Kristalstructuur van PHBH (PDB code 1pbe).

Verdere studies aan PHBH resulteerden in de formulering van een nieuw principe van cofactor-afhankelijke katalyse (Entsch & van Berkel, 1995). Het concept dat een prosthetische groep niet altijd star gebonden is maar kan swingen in het enzym is inmiddels algemeen geaccepteerd. Door het swingen van de flavine cofactor kan PHBH 50 keer per seconde met drie verschillende substraten reageren die één voor één naar binnen moeten en daarna als producten ook weer één voor één naar buiten gaan (Fig. 4). In kinetische termen noemen we dat een bi-uni-uni-

.....

uni ping-pong mechanisme. De eerste reactie met het NADPH coenzym gebeurt in een meer polaire omgeving, terwijl de uiteindelijke hydroxylering van het substraat plaatsvindt in een van water afgeschermd apolaire omgeving. Daarbij moet U bedenken dat we van heel veel enzymen niet weten waar het substraat naar binnen komt en hoe het product het enzym verlaat. Ook weten we niet hoe de dynamische processen binnen enzymen zijn geëvolueerd zodat ze in staat zijn reacties, die normaal nauwelijks verlopen, enorm te versnellen. Het mag daarom duidelijk zijn dat het belangrijk is om de functionele verschillen van enzymen die veel op elkaar lijken vast te stellen. Op deze manier zijn ingeburgerde, vaak starre ideeën nog bij te stellen.

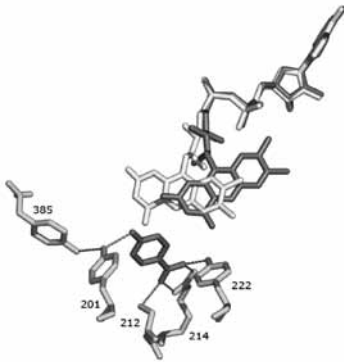
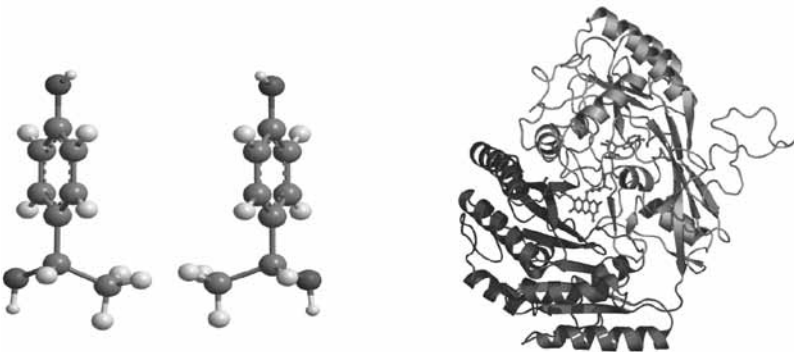


Fig. 4. Swingende cofactor in PHBH (Schreuder et al., 1994). Door het swingen kan de flavine cofactor achtereenvolgens met NADPH, zuurstof en p-hydroxybenzoesaat reageren.

Een ander oxidatief enzym waar we veel van hebben geleerd is vanillyl-alcohol oxidase. Dit in Wageningen ontdekte flavoproteïne produceert naast de bekende smaakstof vanilline ook verschillende geurstoffen waaronder kaneelderivaten. Het werkingsmechanisme van vanillyl-alcohol oxidase is in al zijn eenvoud wonderschoon (Fraaije & van Berkel, 1997). Eerst wordt het substraat in het actieve centrum gebonden en door het enzym geactiveerd. Vervolgens wordt het perfect gepositioneerde substraat door de flavine cofactor geoxideerd. Met andere

woorden: het substraat wordt schaakmat gezet. Hierdoor ontstaat een reactief stofje dat normaal gesproken met allerlei biomoleculen zou kunnen reageren. Het gereduceerde enzym houdt dit toxische intermediair echter keurig in toom en activeert een watermolecuul om het om te zetten in het uiteindelijke aromatische product. Vrijwel gelijktijdig komt zuurstof in actie om de gereduceerde flavine cofactor terug te oxideren naar zijn oorspronkelijke toestand. U weet wel, een enzym wordt niet verbruikt tijdens de reactie, maar werkt 'slechts' als katalysator. Als laatste stap verlaat het product het enzym waarna we met het 'vrije' enzym weer aan een nieuw rondje kunnen beginnen.

Als je weet hoe zo'n katalytisch mechanisme in elkaar steekt, dan kan je er misschien op een slimme manier gebruik van maken (Fig. 5). De heilige graal van de organisch chemicus is het synthetiseren van enantiomeerzuivere verbindingen. Dat is geen sinecure omdat je meestal wordt opgescheept met een racemisch mengsel. Door twee aminozuren in het actieve centrum van vanillyl-alcohol oxidase gericht te veranderen zijn wij er als eersten in geslaagd om de enantioselectiviteit van een redoxenzym om te draaien waardoor het enzym het spiegelbeeld maakt van zijn natuurlijke product (van den Heuvel *et al.*, 2000). Dit heeft brede implicaties, omdat zuivere links- of rechtsdraaiende moleculen erg belangrijk zijn voor de farmacie en voedingsindustrie.



.....

Fig. 5. Omkering van de enantioselectiviteit van vanillyl-alcohol oxidase.

.....

Onze structuur-functie studies aan vanillyl-alcohol oxidase hebben ook geleid tot de beschrijving van een nieuwe familie van flavoenzymen (Fraaije *et al.*, 1998) die inmiddels tal van leden omvat (Leferink *et al.*, 2008; Fig. 6).

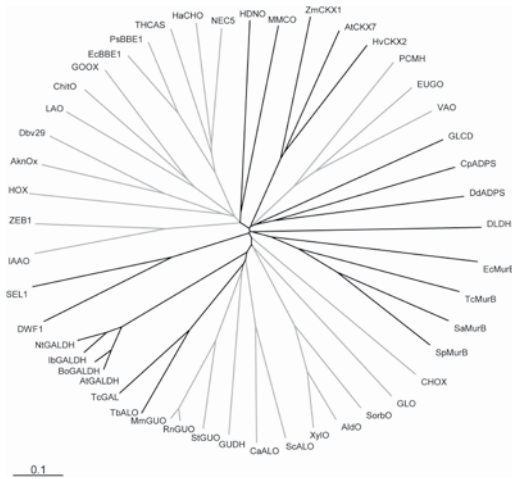


Fig. 6. Stamboom van de vanillyl-alcohol oxidase enzymfamilie.

Deze enzymen reageren met zeer verschillende substraten maar bevatten allemaal een sterk geconserveerd flavine bindingsdomein. Opmerkelijk is dat de flavine in deze familie in de meeste gevallen covalent gebonden is aan het apo-eiwit en dat het type covalente binding een evolutionaire achtergrond heeft. Zo zit de flavine cofactor van de groen en geel gemarkeerde enzymen vast aan de stikstofatomen van een histidine zijketen en zijn de in rood weergegeven enzymen aan de cofactor gekoppeld door twee covalente bindingen.

Zuurstofdiffusie in enzymen is een proces dat o.a. gebruik maakt van het principe van conformationele selectie (Baron *et al.*, 2009). Zuurstof diffundeert niet zomaar door een enzym maar maakt gebruik van tunnels en kanalen die in meer of mindere mate open en dichtgaan. Sommige flavoenzymen reageren daardoor heel snel met zuurstof en anderen totaal niet. Dehydrogenases zijn enzymen die niet of nauwelijks

met zuurstof reageren, maar waarom ze dat niet doen is verre van duidelijk. Door een subtiele chirurgische ingreep hebben we de toegang voor zuurstof tot het actieve centrum van L-galactonolacton dehydrogenase geopend. Hierdoor kan dit planten-enzym dat vitamine C produceert nu *in vitro* werken als een oxidase (Leferink *et al.*, 2009ab). Dit concept kan mogelijk breder toegepast worden omdat zuurstof een milieuvriendelijke en goedkope electronenacceptor is. In zijn natuurlijke omgeving in de plant mag het enzym juist niet met zuurstof reageren omdat dit in de mitochondriën waar het enzym werkzaam is zou leiden tot oxidatieve stress.

Veel flavoenzymen binden hun cofactor spontaan nadat het apoenzym is gevouwen. In sommige gevallen echter zijn er hulptrouwen nodig en moet de assistentie worden ingeroepen van andere liganden of chaperone eiwitten die het enzym beschermen tegen afbraak of misvouwing (Hefti *et al.*, 2003). In zo'n tien procent van de gevallen wordt de flavine cofactor covalent vastgezet aan het enzym. Voor vanillyl-alcohol oxidase hebben we laten zien dat deze verankering auto-katalytisch verloopt en zorgt voor een hogere redoxpotentialiaal (Fraaije *et al.*, 2000). Hierdoor wint het enzym aan oxidatiekracht, krijgt het een beetje meer power.

Sommige flavoproteïnen assembleren spontaan tot hun uiteindelijke quaternaire structuur, maar bij anderen treedt deze assemblage pas op na binding van de cofactor (Fig. 7). In samenwerking met de Universiteit van Utrecht hebben we een methode ontwikkeld waardoor we via massaspectrometrie inzicht kunnen verkrijgen in cofactor gestuurde eiwit assemblage processen. Een wetenschappelijk hoogstandje met veel media aandacht was daarbij de verbetering van het wereldrecord molecuulwegen (van Berkel *et al.*, 2000).

Cofactor binding kan het dynamisch gedrag van een eiwit behoorlijk beïnvloeden. Zo heeft Dr. Carlo van Mierlo met behulp van waterstof-deuterium uitwisselings-experimenten aangetoond dat de binding van een flavine cofactor een eiwit op vele plekken kan stabiliseren tegen locale ontvouwing. Wanneer we de transmissie van dergelijke effecten beter begrijpen kunnen we daar op verschillende manieren ons voordeel mee doen. Het op de juiste manier inbouwen en verankeren van cofactor-analogen kan bijvoorbeeld gebruikt worden in analytische toepassingen zoals biosensoren (Posthuma *et al.*, 2007).

. . .

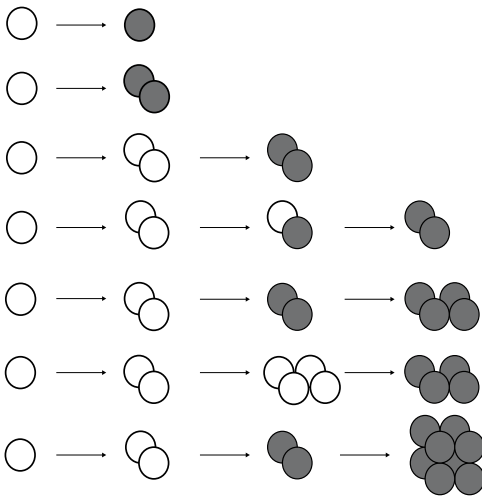


Fig. 7. Voorbeelden van assemblage van flavoenzymen.

Huidig onderzoek

Een van de speerpunten binnen mijn onderzoeksgroep *Enzymes@Work* is het ontwikkelen van nieuwe biokatalysatoren die gebruikt kunnen worden voor de productie van waardevolle verbindingen. Voor het opsporen van kandidaatenzymen maken we dankbaar gebruik van genoom informatie (Butler, 2010). Uit deze informatie blijkt onder andere dat het arsenaal aan flavoenzymen enorm afhangt van het type organisme en dat het percentage van het totaal aantal genen dat codeert voor deze enzymen varieert tussen de 0.1 en 3,5% (Macheroux *et al.* 2011). Organismen met een flavine-intensieve levensstijl houden van zuurstof en zijn vooral bezig met het produceren van bioactieve verbindingen of het oppeuzelen van organisch materiaal. Voorbeelden zijn de zandraket *Arabidopsis thaliana*, de schimmel *Neurospora crassa*, de saprovoor *Streptomyces coelicolor* en de humane pathogeen *Mycobacterium tuberculosis*. Hebben we eenmaal de geschikte genen geselecteerd, dan worden deze gecloneerd en tot expressie gebracht in een gastheer cel. Soms leidt dit tot inactieve eiwitaggregaten en is onderzoek naar een

beter vouwingsgedrag van het enzym gewenst. Postdoc Elena Kudryashova heeft aangetoond dat omgekeerde micellen geschikte nanocontainers kunnen zijn voor dit soort herstelwerkzaamheden (Kudryashova *et al.*, 2011; Fig. 8).

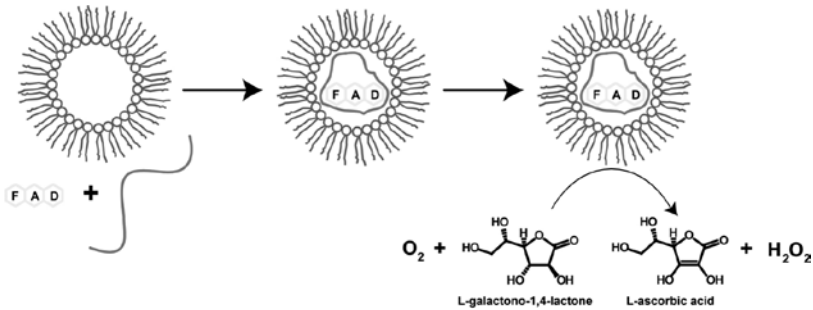


Fig. 8. Eiwitvouwing en cofactor inbouw in omgekeerde micellen.

Bij een goede eiwitproductie worden na zuivering alle registers opengetrokken om het enzym spectroscopisch, katalytisch en structureel te karakteriseren. Dit leidt soms tot verrassingen omdat de annotatie van het gen niet altijd blijkt te kloppen. Zo heeft PhD Stefania Montersino onlangs de functie en structuur opgehelderd van Stefamox, een flavoenzym dat oorspronkelijk geannoteerd stond als Salimox. Net een andere variant, je zult er als schaker maar intrappen. Verdere mutagenese studies aan dit enzym hebben nieuwe inzichten verschaft in de structurele en dynamische parameters die van belang zijn voor de unieke regioselectiviteit van hydroxylering door flavine-afhankelijke monoxygenases. Zo is gebleken dat deze enzymen door spiegeling van hun actieve centrum soms op twee verschillende manieren met hetzelfde substraat kunnen reageren.

Kwallen uit de Stille Oceaan bevatten calcium-gereguleerde eiwitten die een coelenterazine cofactor en zuurstof gebruiken voor de productie van licht (Fig. 9). Deze foto-eiwitten, waaronder aequorine, obeline en clytine, zijn de natuurlijke bioluminescentie partners van het alombekende green fluorescent protein (GFP). Door protein engineering kunnen meerkleuren varianten van deze foto-eiwitten

verkregen worden die gebruikt kunnen worden voor diverse analytische toepassingen zoals bijvoorbeeld de *in vivo* imaging van cellulaire processen. Sandwich PhD Elena Eremeeva heeft een procedure ontwikkeld voor de hervouwing van de recombinant foto-eiwitten en de reconstitutie met coelenterazine (Eremeeva *et al.*, 2009). Hierdoor kunnen we het mechanisme van zuurstofactivering van de foto-eiwitten en hun interactie en samenwerking met GFP nu in detail bestuderen.

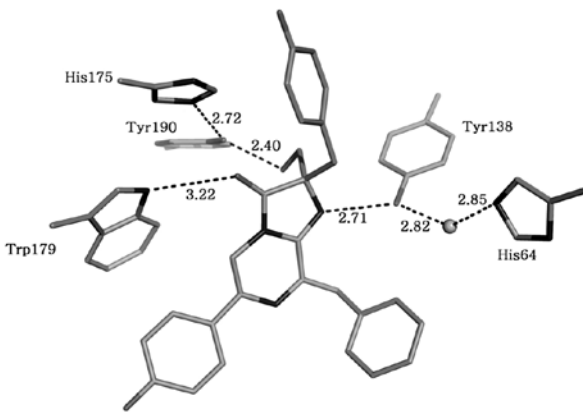


Fig. 9. Binding van 2-hydroperoxycoelenterazine in obeline (PDB code 1QV0).

Koper-afhankelijke polyfenol oxidases zijn verantwoordelijk voor de ongewenste bruinkleuring van groenten- en fruitproducten, sappen en wijn. Sulfit is het bekende additief dat ervoor moet zorgen dat deze verouderingsprocessen worden tegengegaan. Maar dit chemisch middel zorgt ook voor koppijn en andere gezondheidsproblemen. De uitdaging is dus om nieuwe ‘gezonde’ enzymremmers te vinden die de oxidatie reacties van polyfenol oxidases in voedingsmiddelen voorkomen (Fig. 10). In een Europees samenwerkingsproject kijken we hierbij naar appel- en aardappelproducten die voor de consument een verse uitstraling moeten hebben. Samen met Wageningse partners richten we ons op de polyphenol oxidase isoenzymen uit de champignon, die door verschillende *Agaricus bisporus* genen

worden gecodeerd. Recentelijk is de kristalstructuur van een van deze isovormen opgehelderd (Ismaya *et al.*, 2011) en postdoc Teunie van Herk gaat nu via een structuur-functie aanpak uitzoeken hoe dit enzym efficiënt en op een moleculair gezonde manier geremd kan worden.



Fig. 10. Bruinkleuring van appelschijfjes door polyphenol oxidase.

Heem-afhankelijke peroxidases katalyseren de oxidatieve cross-linking van eiwitten. Deze verknopingsreactie geeft stevigheid aan planten en weekdieren, maar kan mogelijk ook gebruikt worden voor het maken van nieuwe biomaterialen en het verbeteren van de schuim- of gelerings-eigenschappen van levensmiddelen. De door peroxidase gekatalyseerde radicaalreactie wordt algemeen beschouwd als zijnde niet selectief. Samen met Wageningse en Amsterdamse collega's hebben we aangetoond dat dit niet geldt voor de eerste stap in de cross-linking van het melkeiwit α -lactalbumine (Fig. 11). Wanneer we de structuur van het α -lactalbumine een beetje luchtiger maken door het gebonden calcium te verwijderen (apo-eiwit), katalyseert het peroxidase in eerste instantie de vorming van een intermoleculaire brug tussen twee verschillende tyrosine residuen (Heijnis *et al.*, 2011). Deze specifieke koppeling komt waarschijnlijk tot stand door de gunstige ladingsverdeling van het lactalbumine oppervlak die ervoor zorgt dat de tyrosines elkaar kortstondig kunnen ontmoeten. Een soort Meet & Greet. Deze intermoleculaire dityrosine koppeling suggereert tevens dat we lineaire α -lactalbumine polymeren kunnen maken en dat we de reactie kunnen sturen in de richting van het gewenste product.

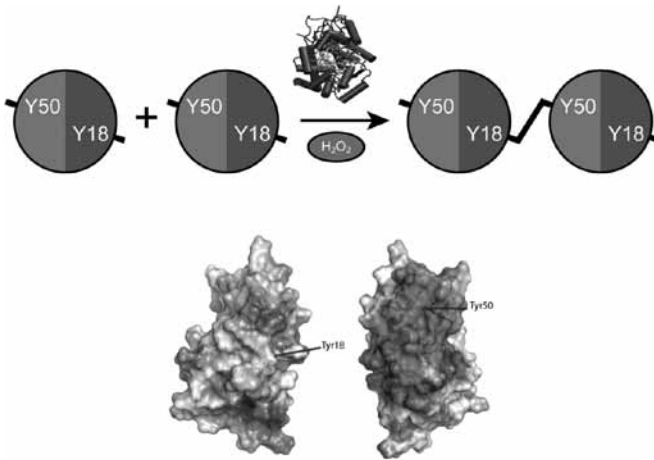


Fig. 11. Oxidatief verknopen van het melkeiwit α -lactalbumine door mierikswortel peroxidase.

Hyperthermostabiele enzymen zijn dankbare onderzoeksobjecten voor het bestuderen van enzymdynamiek en enzymstabiliteit (Ippel *et al.*, 2010). Hyperthermostabiele enzymen werken vaak optimaal rondom het kookpunt van water maar verstijven bij kamertemperatuur. Samen met Wageningse en Twentse partners proberen wij deze eigenschappen te benutten voor de ontwikkeling van nieuwe bioaffiniteitsmaterialen. Door een endoglucanase uit de vulkaanbacterie *Pyrococcus furiosus* genetisch te modificeren hebben we dit enzym omgebouwd tot een passief suiker bindertje. Verder kunnen we door het aanbreien van reactieve residuen het eiwit selectief bestoken met chemische liganden. Dit geeft allerlei mogelijkheden voor specifieke en robuuste koppelingen aan vaste dragers en oppervlakken voor applicaties in de scheidingstechnologie. Postdoc Astrid Volmer heeft laten zien dat het thermostabiele enzym tijdens zijn productie in de *E. coli* gastheer niet altijd goed vouwt en gedeeltelijk aggregeert. Dit stressgedrag kan echter verholpen worden door het eiwit na zuivering te verwennen in een chaotropisch saunabad.

Toekomstig onderzoek

Binnen de *moleculaire enzymologie* wil ik me de komende jaren verder verdiepen in de dynamiek, fitheid en levensstijl van enzymen. Wanneer we beter begrijpen welke eigenschappen de katalytische efficiëntie en plasticiteit beïnvloeden wordt het mogelijk enzymen naar wens te ontwerpen (Siegel *et al.* 2010). Een belangrijke ontwikkeling hierbij is de koppeling naar de cellulaire biochemie. In de cel bevinden enzymen zich in een omgeving met lage wateractiviteit, kunnen substraat en enzym concentraties lokaal sterk verschillen en spelen eiwit-eiwit interacties een prominente rol. De rol van water in zo'n drukke omgeving is razend interessant, maar lastig te bestuderen. Door enzymen in te pakken in polymeren kan informatie verkregen worden over de dynamica van gebonden watermoleculen. Uit recente NMR studies is gebleken dat de geometrische eigenschappen van eiwtoppervlakken zorgen voor verschillende soorten oplosmiddel netwerken die coöperatief kunnen werken (Nucci *et al.*, 2011). Meer inzicht hierin is essentieel voor het begrijpen van enzymwerking en evolutie, voor het creëren van goede substraat bindingsplaatsen, en voor het *de novo* ontwerpen van enzymen op maat.

.....

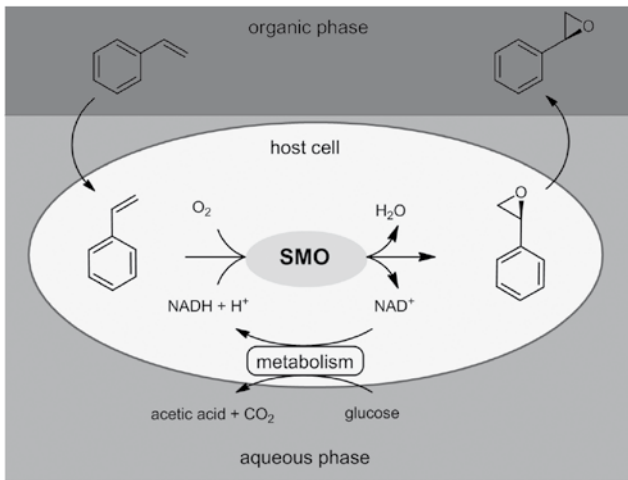


Fig. 12. Twee-fasen systeem voor de enzymatische productie van enantiomeerzuivere epoxides.

Multifunctionele enzymsystemen maken vaak gebruik van substraat kanalisering. Hierbij diffundeert een reactief intermediair van het ene actieve centrum naar het andere zonder vrij te komen in het oplosmiddel. Samen met partners uit Freiberg hebben we onlangs een nieuwe biotechnologisch relevante styreen monoxygenase (Fig. 12) beschreven waarbij de normaal onafhankelijk van elkaar functionerende reductase en epoxidase componenten zijn gefuseerd (Tischler *et al.*, 2010).

Het ontrafelen van hoe dit enzymstelsel zijn labiele tussenproducten transporteert en hoe je de efficiëntie van dat transport kunt verbeteren zal een belangrijke bijdrage leveren aan het begrip van multienzymbiokatalyse. Verder zal dit systeem een test zijn van de Rosetta-steen hypothese die voorspelt dat een fusie van twee eiwitten bijna altijd een verborgen interactie onthult tussen twee niet gerelateerde eiwitten.

Een belangrijk thema binnen ons onderzoek betreft de *biokatalyse*. Hier zal de aandacht de komende jaren vooral uitgaan naar nieuwe bioraffinage processen in het kader van de *biobased economy*. Zo zijn we betrokken bij het pas opgerichte lignine platform van WUR en bij het TASC innovatie programma van NWO. Een uitdaging hier is de ontwikkeling van robuuste oxidatieve enzymen die ingezet kunnen worden voor het maken van interessante verbindingen en innovatieve biomaterialen uit het recalcitrante lignine polymeer. Onze ervaring met de enzymatische omzetting van fenolen zal ons daarbij goed van pas komen.

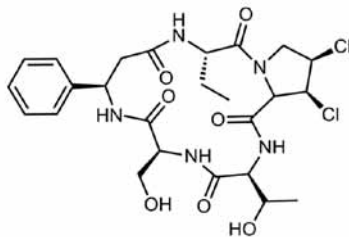


Fig. 13. Enzymatische productie van astin.

Een ander nieuw onderzoeksgebied voor enzymen betreft de *synthetische biologie*. Hier kan Wageningen met zijn plantenkennis een belangrijke rol spelen. Ik geef U een voorbeeld: astins zijn cyclische peptiden uit de wortels van de plant *Aster tataricus* (Fig. 13). Astins bezitten een hoge anti-tumor potentie, maar komen in de plant slechts in zeer lage concentraties voor en zijn moeilijk te synthetiseren. Wij gaan dit in een Europees Industrieel Biotechnologie programma (ERA-IB) proberen door een artificiële gencluster te maken die codeert voor een prolyl dehydrogenase, een halogenase en enkele niet-ribosomale peptide synthases. De chloor atomen in de pyrrolidine ring van astin worden ingebouwd door een flavine-afhankelijke monooxygenase. Dit enzym activeert eerst zuurstof en maakt er vervolgens actief bleekwater van. Dit zeer reactieve stofje wordt vervolgens door een hydrofobe tunnel naar het substraat getransporteerd alwaar de regioselectieve inbouw van chloor plaatsvindt (Zhu *et al.* 2009).

Naast de *moleculaire enzymologie* en *biokatalyse* gaat mijn belangstelling in onderzoek en onderwijs uit naar de *chemische biologie*. Door eiwitten chemisch dan wel enzymatisch te modificeren of moleculair biologisch te voorzien van onnatuurlijke aminozuren zijn er legio mogelijkheden om deze eiwitten een meerwaarde te geven. Deze kennis is ook hoogst interessant voor de bioorthogonale en selectieve labeling van biomoleculen in cellulaire systemen. Een voorbeeld betreft het ontwerpen van fluorescente probes die via suicide inhibitie covalent verankerd kunnen worden aan het actieve centrum van een enzym.

Binnen de *bionanotechnologie* is het assembleren en positioneren van meerdere enzymen op 'n oppervlak een uitdaging. Samen met Wageningse en Nijmeegse partners willen we een setje cascade enzymen specifiek positioneren in een microkanaal door ze vast te klikken aan gefunctionaliseerde DNA oligomeren (Vong *et al.*, 2009). Een andere potentieel interessante bionano toepassing is het inpakken van enzymen in polymeren. Deze polymeren moeten de enzymen beschermen en stabiliseren en dienen door een trigger te kunnen worden geopend om de actieve ingrediënten vrij te laten.

. . .

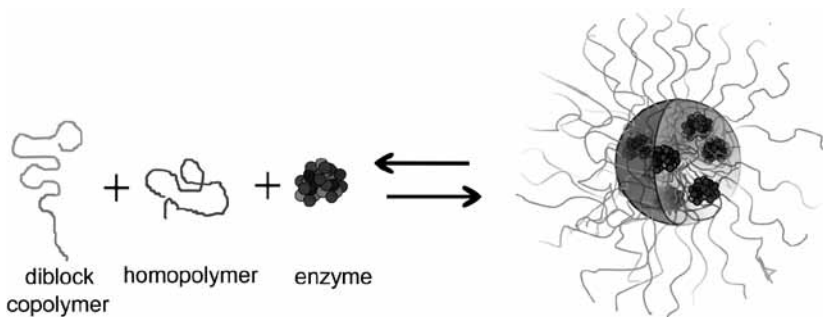


Fig. 14. Enzymen in nanoverpakking.

Samen met Wageningse collega's gaan we onderzoeken hoe enzymen zich gedragen in polyelectrolytische micellen (Fig. 14; Lindhoud *et al.*, 2009) en na hun vrijlating. Door de enzymen te voorzien van fluorescente probes hopen we informatie te verkrijgen over het dynamisch gedrag van de ingepakte enzymmoleculen.

Inbedding binnen Wageningen UR

Zeer veel onderzoekers binnen Wageningen UR maken gebruik van enzymen voor analytische, moleculair biologische of synthese doeleinden. In de *moleculaire enzymologie* draait het vooral om het begrijpen van de structurele, kinetische en regulerende aspecten van enzymen. Deze kennis is essentieel voor het op maat aanpassen en optimaal benutten van enzymen en versterkt ons algemene inzicht in de verschillende processen van de chemie en de biologie. Via mijn onderzoeksstrategie heb ik aangegeven welke plannen ik heb voor de nabije toekomst en hoe deze plannen passen binnen Wageningen UR. Uit de samenwerkingsverbanden blijkt dat onze onderzoeksgroep een aantrekkelijke research partner is. Het moleculair enzymologisch onderzoek is sterk interdisciplinair, sluit nauw aan bij de ontwikkelingen in de synthetische biologie en is van groot belang voor de chemische biologie, de bionanotechnologie en de biobased economy.

Relatie tot industrie en maatschappij

Het creëren van een duurzame samenleving is een cruciale taak voor industrie en maatschappij. Een belangrijke rol is hierbij weggelegd voor de witte biotechnologie, de industriële toepassing waarbij microorganismen en enzymen worden ingezet voor de productie van bioenergie en biomaterialen. Door de concurrentie tussen energie en voedsel is er vanuit de industrie een toenemende belangstelling voor zogeheten tweede-generatietechnologieën, waarbij naast zetmeel en suiker ook het in bulk aanwezige cellulose en lignine materiaal van de plant gebruikt worden voor het maken van producten. Voor de ontwikkeling van deze bioraffinage processen en de productie van nieuwe biomaterialen is een geïntegreerde aanpak nodig met sterke samenwerkingsverbanden tussen universiteiten, onderzoeksinstituten en industriële partners. Wat dat betreft wordt het hoog tijd voor een Nederlands biokatalyse centrum. Zoals eerder aangegeven kan de moleculaire enzymologie hier een belangrijke bijdrage leveren.

Wij zijn betrokken bij diverse initiatieven op het gebied van de biokatalyse en werken hiervoor nauw samen met Nederlandse en Europese bedrijven. Verder probeer ik samen met NWO, NVBMB, KNCV en FEBS ons vak te promoten onder professionals, leken en studenten. Het doet me dan ook veel genoegen om in het Internationaal Jaar van de Chemie lid te zijn van de NWO-programma-commissie Chemistry As Innovating Science (CHAINS). Vanaf deze plaats wil ik nu al attenderen op het overkoepelende CHAINS congres dat van 28 tot 30 november gehouden gaat worden in de Fabrique in Maarssen. Hier kan Chemisch Nederland zijn beste beentje voorzetten.

Onderwijs

Het Wageningse onderwijs in de Biochemie neemt een centrale plaats in binnen de studierichtingen Moleculaire Levenswetenschappen en Biotechnologie, maar is ook belangrijk voor een aantal andere opleidingen. In het Biochemie onderwijs wordt veel aandacht besteed aan de moleculaire eigenschappen van eiwitten en hun werking in cellulaire en geïsoleerde systemen. In de vakken die een nauwe relatie hebben met de *Moleculaire Enzymologie* letten we daarbij op een goede mix van theorie en praktijk, de verschillen tussen fictie en werkelijkheid, en het belang van enzymen voor industrie en maatschappij.

. . .

In het basispracticum *Biologische Chemie* maken de studenten via aansprekende voorbeelden kennis met de werking van eiwitten en enzymen en leren zij aan de hand van veelgebruikte biochemische technieken en analysemethoden feeling te krijgen voor lage concentraties en kleine hoeveelheden. Urinezuur bepalen in je eigen plas. Forensisch bezig zijn door te meten hoeveel rund- en varkensvlees Albert Hein in zijn gehaktballen stopt. En met immunoprecipitaties en proteomics eiwitcomplexen opsporen.

Enzymologie behandelt de strategieën die de natuur gebruikt om katalyse te bedrijven, te remmen of te blokkeren. In het praktische deel van dit vak maakt de student middeld de zuivering van enzymen kennis met de principes van biochemische scheidingsmethoden en de analyse methoden die daar bijhoren. *Enzymo* wordt momenteel alleen gegeven op BSc nivo. Het valt te overwegen om naast dit vak een MSc cursus *Enzyme Systems* op te zetten waarbij meer aandacht wordt besteed aan de structurele en dynamische eigenschappen van complexe enzymsystemen.

In het MSc vak *Applied Biocatalysis* worden de studenten vertrouwd gemaakt met de verschillende aspecten van de enzymatische asymmetrische synthese en hoe enzymen en microbiële cellen gebruikt en geschikt gemaakt kunnen worden voor industriële toepassingen. Cofactor regeneratie, eiwitstabiliteit, immobiliseren, biokatalyse in niet waterige systemen en bioreactoren zijn daarbij belangrijke onderwerpen.

Vakinhoudelijk heb ik de ambitie om een MSc vak *Chemical Biology* op te zetten. Dit vak past uitstekend bij het inherent multidisciplinaire karakter van de biochemie, die van nature met één been in de scheikunde en met één been in de biologie staat. In dit vak leren studenten de chemische en biologische aspecten van de posttranslationale modificaties die de natuur gebruikt om het aantal functies van eiwitten enorm uit te breiden (Walsh, 2006). Tevens zal worden uitgelegd hoe we deze modificaties kunnen aantonen en hoe we de lessen van de natuur kunnen gebruiken voor chemisch biologische applicaties.

Ik heb U de afgelopen 40 minuten meegenomen op een toertocht *met enzymen*. Ik hoop dat ik iets van mijn passie voor deze creatieve biomoleculen aan U heb

. . .

kunnen overdragen. Tijdens deze toertocht heeft U waarschijnlijk gemerkt dat de activering van moleculaire zuurstof een rode draad is door mijn werk. Veel enzymen gebruiken dit luchtige gas om er in allerlei levensprocessen iets moois mee te doen. Wij kunnen daar veel van leren en de verkregen inzichten gebruiken voor nuttige toepassingen.

In een aantal gevallen produceren oxidatieve enzymen reactieve deeltjes die kunnen zorgen voor oxidatieve stress. Deze stoffen fungeren echter ook als signaalmolecuul of als redox sensor en reguleren een groot aantal transcriptiefactoren (Hung *et al.*, 2010). Een goede redox controle, ofwel het vinden van de juiste redox balans, is een proces waar iedere cel tijdens zijn levenscyclus mee te maken heeft en die lastiger wordt naarmate men ouder wordt. Dat deze balans positief beïnvloed kan worden door een gezonde voeding staat buiten kijf. Maar of onze enzymen daar allemaal even gelukkig van worden blijft de vraag.

Dank

Mijnheer de Rector Magnificus, dames en heren. Ik wil deze lezing graag afsluiten met een woord van dank.

Allereerst gaat mijn dank uit naar mijn leermeesters Cees Veeger, Franz Mueller, Ton Visser, Colja Laane, Ivonne Rietjens en Sacco de Vries. Jullie hebben mij allemaal op jullie eigen wijze geholpen bij de ontwikkeling van mijn carrière. Ik heb daar veel van geleerd en veel waardering voor. Een extra vermelding is hier op zijn plaats voor Franz Mueller omdat hij mijn promotor was en enige supervisor. Franz, jouw gele koorts heeft op mij zeer aanstekelijk gewerkt. Jammer dat Rita en jij er vandaag niet bij kunnen zijn.

Bij een leerstoelgroep hoort een office manager. Ook hier mag ik me gelukkig prijzen met een kanjer. Laura, van Ausma tot Egmond, zonder jou zou ik me in het Transitorium geen raad weten.

Dan uiteraard alle promovendi, postdocs en afgestudeerden. Het was en is een genot om met jullie te mogen samenwerken.

Mijn collega's bij Biochemie. Dat zijn er veel, maar degenen met wie ik het langst heb opgetrokken wil ik hier graag noemen. Adrie en Willy, jullie pijlen missen zelden doel. Carlo, Jacques, en Sjef. Altijd bezig met pieken en dalen. Huub, Hans en Walter, ijzervreters van het eerste uur.

Mijn collega docent Maurice Franssen. Een bijzondere katalysator.

Mijn co-piloot Frans Geurts die morgen zijn afscheidsreceptie geeft. Frans, het was altijd gezellig in de auto, vooral in de file.

Mijn vele collega's op de Drieyen. De meesten verslaafd aan onderzoek, anderen puur docent en sommigen manager in hart, nieren en darmen. Dan al die andere WUR-collega's die ik door de jaren heen heb leren kennen. Het tafeltennissen met de Flavine Boys is wat dat betreft erg nuttig gebleken.

. . .

Mijn vakbroeders en zusters in binnen en buitenland. Altijd bereikbaar via e-mail of een ander medium. Ik hoop jullie nog vaak lastig te vallen.

Schaakvereniging Het Kasteel. Voor de broodnodige afleiding.

En tot slot mijn drie meiden. Zonder jullie steun en bevoegenheid had ik hier niet gestaan.

Ik dank U allen voor de aandacht.

Ik heb gezegd!

Referenties

- Baron R., C Riley, P Chenprakhon, K Thotsaporn, RT Winter, A Alfieri, F Forneris, WJH van Berkel, P Chaiyen, MW Fraaije, A Mattevi & JA McCammon (2009) Multiple pathways guide oxygen diffusion into flavoenzyme active sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 10603-10608.
- Boehr DD, R Nussinov & PE Wright (2009) The role of dynamic conformational ensembles in biomolecular recognition. *Nat Chem Biol* 5, 789-796.
- Butler D (2010) Science after the sequence. *Nature* 465, 1000-1001.
- Entsch B & WJH van Berkel (1995) Structure and mechanism of *p*-hydroxybenzoate hydroxylase. *FASEB J* 9, 476-483.
- Eremeeva EV, SV Markova, AH Westphal, AJWG Visser, WJH van Berkel & S Vysotski (2009) The intrinsic fluorescence of apo-obelin and apoaequorin and use of its quenching to characterize coelenterazine binding. *FEBS Lett* 583, 1939-1944.
- Fraaije MW & WJH van Berkel (1997) Catalytic mechanism of the oxidative demethylation of 4-(methoxymethyl)phenol by vanillyl-alcohol oxidase. *J Biol Chem* 272, 18111-18116.
- Fraaije MW, JAE Benen, J Visser, A Mattevi & WJH van Berkel (1998) A novel oxidoreductase family sharing a conserved FAD binding domain. *Trends Biochem Sci* 23, 206-207.
- Fraaije MW, RHH van den Heuvel, WJH van Berkel & A Mattevi (2000) Structural analysis of flavinylation in vanillyl-alcohol oxidase. *J Biol Chem* 275, 38654-38658.
- Heijnis WH, HL Dekker, LJ de Koning, PA Wierenga, AH Westphal, CG de Koster, H Gruppen & WJH van Berkel (2011) Identification of the peroxidase-generated intermolecular dityrosine cross-link in bovine α -lactalbumin. *J Agric Food Chem* 59, 4444-4449.
- Hefli MH, J Vervoort & WJH van Berkel (2003) Deflavination and reconstitution of flavoproteins. Tackling fold and function. *Eur J Biochem* 270, 4227-4242.
- Hung RJ, U Yazdani, J Yoon, H Wu, T Yang, N Gupta, WJH van Berkel & JR Terman (2010) MICAL links semaphorins to F-actin disassembly. *Nature* 463, 823-827.

- Ippel JH, S Koutsopoulos, SM Nabuurs, WJH van Berkel, J van der Oost & CPM van Mierlo (2010) NMR characterization of a 264-residue hyperthermostable endo- β -1,3-glucanase. *Biochem Biophys Res Commun* 391, 370-375.
- Ismaya WT, HJ Rozeboom, A Weijn, JJ Mes, F Fusetti, HJ Wichers & BW Dijkstra (2011) Crystal structure of *Agaricus bisporus* mushroom tyrosinase: identity of the tetramer subunits and interaction with tropolone. *Biochemistry* 50, 5477-5486.
- Kudryashova EV, NGH Leferink, IG Slot & WJH van Berkel (2011) Galactonolactone oxidoreductase from *Trypanosoma cruzi* employs a FAD cofactor for the synthesis of vitamin C. *Biochim Biophys Acta* 1814, 545-52.
- Leferink NGH, DPHM Heuts, MW Fraaije & WJH van Berkel (2008) The growing VAO flavoprotein family. *Arch Biochem Biophys* 474, 292-301.
- Leferink NGH, E van Duin, A Barendregt, AJR Heck & WJH van Berkel (2009a) Galactonolactone dehydrogenase requires a redox-sensitive thiol for optimal production of vitamin C. *Plant Physiol* 150, 596-605.
- Leferink NGH, MW Fraaije, HJ Joosten, PJ Schaap, A Mattevi & WJH van Berkel (2009b) Identification of a gatekeeper residue that prevents dehydrogenases from acting as oxidases. *J Biol Chem* 284, 4392-4397.
- Lindhoud S, R de Vries, R Schweins, MA Cohen Stuart & W Norde (2009) Salt-induced release of lipase from polyelectrolyte complex micelles. *Soft Matter* 5, 242-250.
- Macheroux P, B Kappes & SE Ealick (2011) Flavogenomics - A genomic and structural view on flavin-dependent proteins. *FEBS J* 278, 2625-34.
- Nucci NV, MS Pometum & AJ Wand (2011) Site-resolved measurement of water-protein interactions by solution NMR. *Nat Struct Mol Biol* 18, 245-249.
- Posthuma-Trumpie GA, WAM van den Berg, DFM van der Wiel, WMM Schaaper, J Korf & WJH van Berkel (2007) Reconstitution of apoglucose oxidase with FAD conjugates for biosensing of progesterone. *Biochim Biophys Acta P&P* 1774, 803-812.
- Schreuder HA, A Mattevi, G Obmolova, KH Kalk, WG Hol, FJ van der Bolt & WJH van Berkel (1994) Crystal structures of wild-type *p*-hydroxybenzoate hydroxylase complexed with 4-aminobenzoate, 2,4-dihydroxybenzoate, and 2-hydroxy-4-aminobenzoate and of the Tyr222Ala mutant complexed with 2-hydroxy-4-aminobenzoate. Evidence for a proton channel and a new binding

- mode of the flavin ring. *Biochemistry* 33, 10161-70.
- Siegel JB, A Zanghellini, HM Lovick, G Kiss, AR Lambert, JL St. Clair, JL Gallaher, D Hilvert, MH Gelb, BL Stoddard, KN Houk, FE Michael & D Baker (2010) Computational design of an enzyme catalyst for a stereoselective bimolecular Diels-Alder reaction. *Science* 329, 309-313.
- Tischler D, R Kermer, JAD Gröning, SR Kaschabek, WJH van Berkel & M Schlömann (2010) StyA1 StyA2B from *Rhodococcus opacus* 1CP; A multifunctional styrene monooxygenase system. *J Bacteriol* 192, 5220-5227.
- Van Berkel WJH, RHH van den Heuvel, C Versluis & A Heck (2000) Detection of intact megadalton protein assemblies of vanillyl-alcohol oxidase by mass spectrometry. *Protein Sci* 9, 435-439.
- Van den Heuvel RHH, MW Fraaije, A Mattevi, M Ferrer & WJH van Berkel (2000) Inversion of stereospecificity of vanillyl-alcohol oxidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 9455-9460.
- Vong T, J ter Maat, TA van Beek, B van Lagen, M Giesbers, J van Hest & H Zuilhof (2009) Site-specific immobilization of DNA in glass microchannels via photolithography. *Langmuir* 25, 13952-13958.
- Walsh CT (2006) Posttranslational modification of proteins: expanding Nature's inventory. *Roberts and Company Publishers*.
- Zhu X, W De Laurentis W, K Leang, J Herrmann, K Ihlefeld, KH van Pée & JH Naismith (2009) Structural insights into regioselectivity in the enzymatic chlorination of tryptophan. *J Mol Biol* 391, 74-85.



Enzymen spelen een centrale rol in de biochemie, de chemie van de levende natuur. Zij zorgen voor onze spijsvertering en bepalen vaak het verschil tussen ziek of gezond. Enzymen zijn er in vele soorten en maten maar worden vooral interessant wanneer je begrijpt hoe, waarom, waar en wanneer ze wat doen. Meer inzicht in de moleculaire eigenschappen en levensstijl van enzymen levert een belangrijke bijdrage aan het ontwikkelen van duurzame biochemische processen voor de productie van gezonde voeding en innovatieve biomaterialen.