Universiteit Utrecht

Sharing science,
shaping tomorrow

ORATIE

Het Gulden Vlies

Prof. dr. Eefjan Breukink

11 december 2024

Mevrouw de rector magnificus, beste studenten, collega's, familie en vrienden hier aanwezig en eventueel online.

In deze rede zal ik gaan uitleggen waar ik mij vooral mee zal gaan bezighouden in de komende jaren. De titel van mijn vakgebied zegt eigenlijk al alles:

Microbiële membranen en antibiotica

Centraal in mijn onderzoek en eigenlijk ook in deze titel staan membranen. Ik ben als membraanwetenschapper opgevoed binnen de vakgroep Biochemie van Membranen van Professor Ben de Kruijff, waar ik mijn afstudeerstage begon in 1988, waarna ik in dezelfde groep een promotieonderzoek ben begonnen in 1989 en in 1994 mijn doctorstitel behaalde. Toentertijd was de membraanbiochemie heel groot binnen de faculteit scheikunde waarbij 4 verschillende groepen verspreid over de 4 vleugels van de 6^{e} verdieping van het Kruijtgebouw waren georganiseerd in het CBLE, het centrum voor biomembranen en lipide enzymologie. Nu ben ik zo'n beetje de laatste telg binnen het scheikunde departement van deze membraan georiënteerde wetenschappers.

Maar hoe is mijn achtergrond in membranen te rijmen met de titel van mijn oratie?

Het gulden vlies

Ik zal dit als eerste proberen uit te leggen.

Het verhaal van het gulden vlies komt uit de Griekse mythologie waarbij overspel alom aanwezig is, evenals liefde tussen gewone mensen en goddelijke wezens. Het verhaal lijkt een beetje op dat van Assepoester, en hier volgt een verkorte versie, waarbij ik de namen heb weggelaten.

Een huwelijk tussen een Griekse koning en een nimf van de wolken en rivieren was gezegend met twee kinderen, een jongen en een meisje. Zoals wel vaker gebeurt in de Griekse mythologie, werd de koning verliefd op een ander en ruilde zijn eerste vrouw voor die ander. Net als in Assepoetser, was dit een nogal jaloerse stiefmoeder die haar stiefkinderen bedreigde omdat zij, en niet haar eigen kinderen de erfgenamen van de koning waren. Hierop stuurde de eerste vrouw, de nimf, een gevleugelde gouden ram om de kinderen te redden.

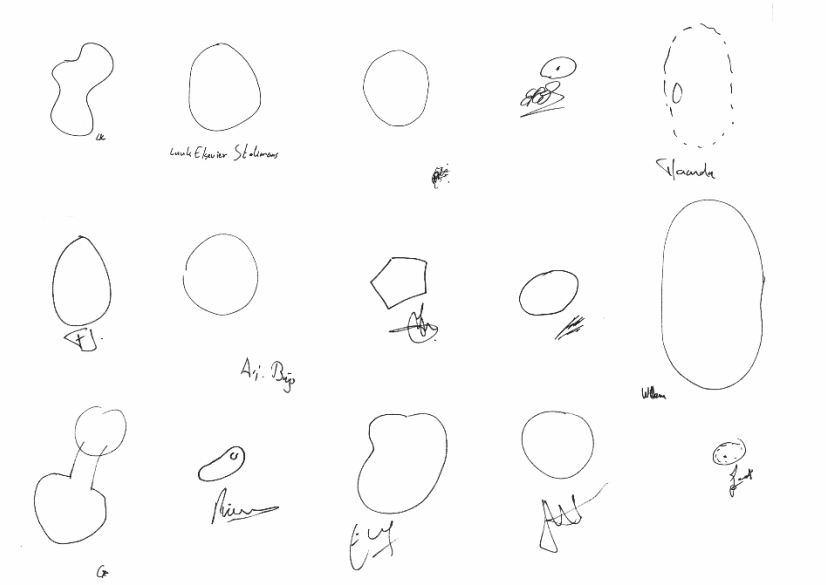
Alleen de zoon overleefde de vlucht en hoe hij met de ram omging toen hij eenmaal was gered zijn twee verhalen: of hij offerde zelf de ram en bewaarde de huid (stank voor dank dus) of de ram gaf zelf zijn huid aan de zoon voordat hij naar de sterren rees om het sterrenbeeld Ram te worden.

Figuur 1, voorbeeld van het gulden vlies.
https://one-of-the-greatest-sources-for-greek-mythology.fandom.com/wiki/Golden_Fleece

De zoon gaf de huid van de ram oftewel **het gulden vlies** weg aan de koning van het land waar hij heen was gevlucht. Het gulden vlies is onderdeel van een veel groter verhaal waar ik het verder niet over ga hebben. Wat de bezitter van het gulden vlies er precies aan heeft is een beetje onduidelijk, maar het geeft zeker een vorm van bescherming, vandaar dat ik deze titel gekozen heb.

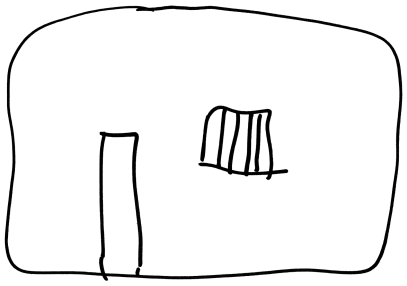
Een vlies is namelijk in de biochemie synoniem voor een membraan en de beschermende werking van een biologische membraan is essentieel geweest voor het ontstaan van leven. Maar wat is eigenlijk een membraan?

Vrijwel iedereen weet wat een membraan is, al beseffen veel mensen dit niet. Om dat duidelijk te maken heb ik een aantal verschillende mensen, veel hier ook aanwezig, gevraagd om een cel te tekenen totdat ik stop zei, en dit was het resultaat (Figuur 2).



Figuur 2. Tekeningen van een biologische cel.

Op één uitzondering na begon iedereen met het tekenen van een soort ronde vorm om de cel af te bakenen, ze tekenden dus een membraan. De uitzondering was een tekening van onze Rector Magnificus Henk Kummeling, een jurist. Hij tekende iets als dit (Figuur 3), een ander soort cel dus. Sindsdien heb ik mijn vraag beter gespecificeerd, namelijk om een *biologische* cel te tekenen. Dit was dus een typisch voorbeeld van een vraag die niet goed genoeg gespecificeerd was, met als gevolg dat een van de antwoorden nogal onverwacht was. Het laat ook weer eens zien dat een goede vraagstelling uitermate belangrijk is in welk onderzoek dan ook.



Figuur 3. Tekening van een ander soort cel.

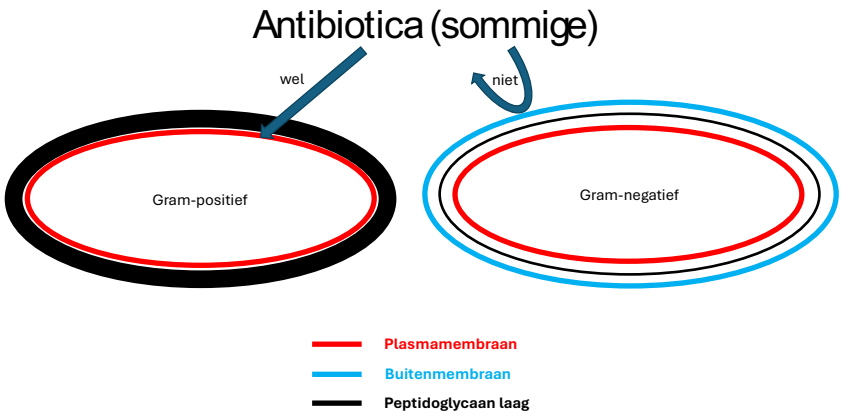
De membraan van een biologische cel die als eerste werd getekend wordt plasmamembraan genoemd. Zo'n plasmamembraan vormt een afscheiding van de binnenkant van de cel voor de buitenwereld en is verreweg de belangrijkste structuur van een cel. Sterker nog, zonder deze plasmamembranen zou het leven

nooit ontstaan zijn en zou de wereld er heel anders uitzien. Een volledig kale wereld, met kale rotsen en water waarin wellicht ietwat complexe moleculen hulpeloos rondzwerven. Membranen zorgen niet alleen voor bescherming maar ook voor onderverdeling in kleinere ruimtes ook wel compartimentalisatie genoemd, zodat complexe reacties of belangrijke processen afgeschermd kunnen plaatsvinden. Onze cellen bevatten daarom ook meerdere essentiële membraan systemen, de organellen, naast de plasmamembraan die door iedereen getekend was. Een ieder die biologie heeft gehad op de middelbare school herinnert zich wellicht nog wel de mitochondriën, het endoplasmatisch reticulum en ook de celkern, die op sommige tekeningen te zien is, allen afgeschermd door membranen.

Even terug naar de titel van mijn vakgebied:

Microbiële membranen en antibiotica

Ik ga mij richten op de microben en dan vooral de bacteriën, hoewel schimmels hier ook een grote rol bij gaan spelen.



Figuur 4. Schematische opbouw van bacteriën en de consequenties voor de activiteit van sommige antibiotica.

Bacteriën, zijn veel eenvoudiger van opbouw (Figuur 4) dan onze cellen. Ze hebben geen organellen en geen celkern maar hebben uiteraard wel een plasmamembraan en sommige zelfs nog een tweede membraan, de buitenmembraan genoemd. De bacteriën die een of twee membranen hebben worden ook wel respectievelijk Gram-positieve en Gram-negatieve bacteriën

genoemd. De naamgeving komt voort uit hoe de verschillende bacteriën reageren op een bepaalde kleuring die is uitgevonden door meneer Gram in de 19e eeuw. Om dit uit te leggen moet u ook weten dat buiten deze membranen, bacteriën ook nog een andere essentiële structuur om zich heen hebben die voor de stevigheid en vorm van de bacteriën zorgt: de celwand ofwel de peptidoglycaan laag, dat later in dit verhaal belangrijk wordt. Bij de Gram-positieve bacteriën zit een vrij dikke peptidoglycaan laag aan de buitenkant om de plasmamembraan heen en bij de Gram-negatieve bacteriën zit een dunnere laag tussen de twee membranen in. De Gram-kleurstof blijft hangen in de dikke peptidoglycaan laag van Gram-positieve bacteriën, maar wordt weggespoeld uit de dunne peptidoglycaan laag van de Gram-negatieve bacteriën.

Het grote belang van de plasmamembraan maakt ook dat al het leven kwetsbaar is voor verstoringen van dit membraan, zoals bijvoorbeeld lekkages die kunnen optreden. Dit geldt zeker ook voor bacteriën. Als het je bijvoorbeeld lukt om een gaatje in de bacteriële membraan te prikken is de bacterie zo goed als ten dode opgeschreven.

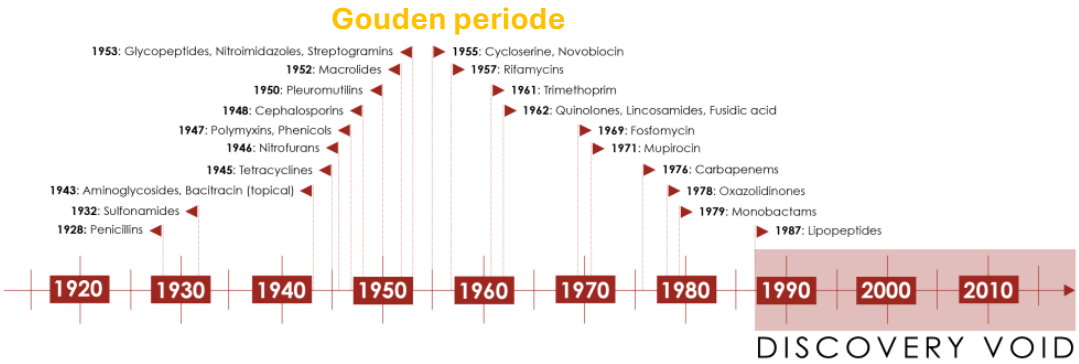
Dit brengt me automatisch bij de antibiotica,het voornaamste onderwerp van mijn vakgebied.

Microbiële membranen en antibiotica

Het woord antibioticum komt uit het latijn en betekent tegen (anti) leven (bios) en in de context van deze oratie zal het vooral gaan over antibiotica gericht tegen bacteriën. De ontdekking van het antibioticum penicilline door Alexander Flemming in 1928 heeft enorme gevolgen gehad voor de gezondheidszorg en heeft velen het leven gered. Antibiotica zijn inmiddels niet meer weg te denken uit onze gezondheidszorg. Echter, de langzaam maar zekere opkomst van multiresistente bacteriën kan leiden tot een terugval naar de jaren van voor de ontdekking van penicilline, waar geen beschikking over antibiotica was. Om een idee te geven van de grootte van het probleem, verwijs ik graag naar een vrij recente studie uit 2022 gepubliceerd in The Lancet, een vooraanstaand wetenschappelijk tijdschrift. Hierin is een onderzoek beschreven naar de grootte van het probleem van de multiresistente bacteriën in het jaar 2019. Wat bleek, er stierven in dat jaar bijna 5 miljoen mensen met een infectie van resistente

bacteriën, waarvan 1,3 miljoen doden daadwerkelijk konden worden geweten aan resistente bacteriën. We zijn inmiddels 5 jaar verder, en het probleem kan alleen maar zijn toegenomen. Het grootste probleem vormen op het ogenblik de Gram-negatieve bacteriën die door hun buitenmembraan meer beschermd zijn tegen antibiotica (Figuur 4). Dit maakt de buitenmembraan een uitermate interessant en belangrijk onderwerp, waar ik helaas door gebrek aan tijd niet over kan uitwijden.

In de komende jaren ga ik proberen bij te dragen aan oplossingen voor het resistentie probleem. Hiervoor ga ik onder andere met een recent ontwikkelde methode op zoek naar stoffen die de buitenmembraan van de Gram-negatieve bacteriën verstoren, om zo meer bestaande antibiotica geschikt te maken voor infecties met deze bacteriën. Binnen een andere veelbelovende onderzoekslijn ga ik reeds bestaande antibiotica van een turbo boost knop voorzien, zodat zelfs voor de resistente bacteriën er geen verweer meer tegen is. Waar ik het vandaag vooral over ga hebben is mijn zoektocht naar nieuwe antibiotica, wat natuurlijk ook een goede oplossing is voor het resistentieprobleem. Dat is echter lang niet zo eenvoudig als het lijkt. Na de ontdekking van penicilline en de introductie daarvan tijdens de tweede wereld oorlog, wat vele mensenlevens heeft gered, ontstond een jacht op nieuwe antibiotica. Dit leidde tot een gouden periode van ongeveer 40 jaar, wereldwijd de “golden age of antibiotics” genoemd, waarin vele nieuwe antibiotica zijn ontdekt en in gebruik genomen (Figuur 5).



Figuur 5. De jaren waarin de antibiotica zijn ontdekt en de periode zonder nieuwe vondsten. (www.reactgroup.org)

Maar, zoals dit plaatje ook wel duidelijk maakt is dat er al een aantal decennia geen enkel nieuw antibioticum op de markt is verschenen. Dit heeft meerdere oorzaken, en een van de oorzaken is dat de grote farmaceutische bedrijven zich

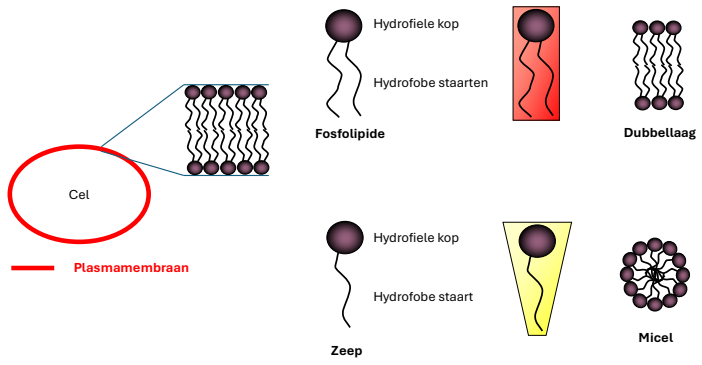
grotendeels hebben terug getrokken uit het antibioticaveld, onder andere om economische redenen.

Het is mijn droom om een antibioticum te ontdekken dat ons echt gaat helpen in het gevecht tegen resistente bacteriën. Hoe ga ik deze droom ga najagen zal ik verder uitleggen.

Alle antibiotica hebben een bepaald doelwit binnen de bacteriën waarop ze gericht zijn. De aard en de locatie van zo'n doelwit binnen de bacterie bepaalt in grootte mate de werkzaamheid van een antibioticum, en ook of er eventuele bijwerkingen te verwachten zullen zijn. In het algemeen moet een doelwit van een antibioticum aan twee eisen voldoen: het moet essentieel zijn, de bacterie mag niet zonder de door het antibioticum aangevallen onderdeel kunnen, en het moet uniek zijn voor de bacterie, het antibioticum mag niet een soortgelijk doelwit in de mens kunnen verstoren. Het doelwit dat ik beoog laat zich raden: **de microbiële membraan**, inclusief essentiële processen die in dat membraan plaatsvinden. Maar is deze microbiële membraan wel zo uniek?

Ja en nee.

Om dit duidelijk te maken zal ik even moeten uitleggen hoe membranen zijn opgebouwd (Figuur 6).



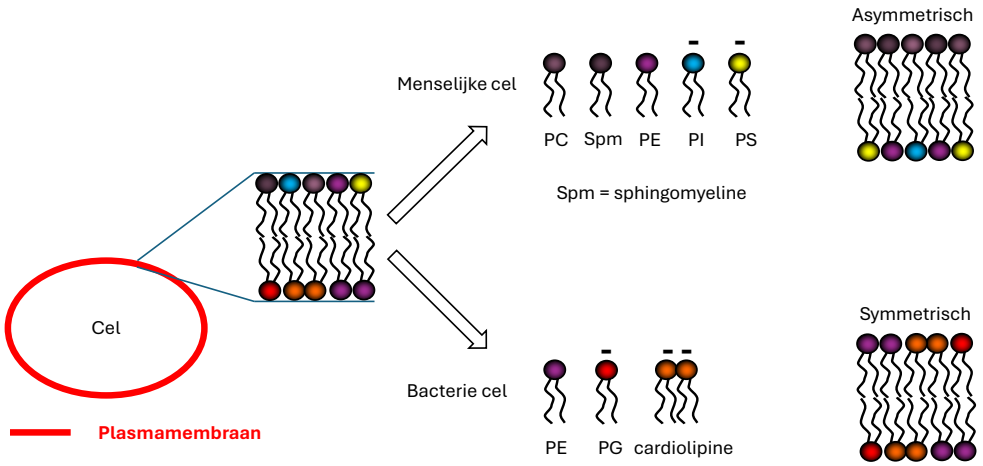
Figuur 6. Opbouw van biologische membranen.

Veruit de belangrijkste onderdelen van membranen zijn de zogenaamde fosfolipiden. Dit zijn zeepachtige moleculen met een hydrofobe staart van vetzuurketens die niet graag met water in contact komt en een hydrofiele kop die wel graag met water in contact komt. Anders dan zeep, hebben fosfolipiden twee

vetzuurstaarten waar zeep er maar 1 heeft. Door de conische vorm van de zeep moleculen vormen ze micellen, een soort van ronde balletjes, die goed geschikt zijn voor het verwijderen van vetresten. Door de twee staarten krijgen de fosfolipiden een cilindervorm en vormen ze spontaan in water een zogenaamde dubbel laag. Deze dubbel laag heeft een hydrofobe laag aan de binnenkant en een hydrofiele laag aan beide buitenkanten, oftewel een membraan. Zo'n membraan is vrij flexibel en heeft goede isolerende eigenschappen, er kunnen namelijk geen ionen of kleine moleculen doorheen, waardoor het een ideale afscherming voor een cel is.

Iedere levensvorm heeft een of meerdere van deze membranen. Echter, ieder organisme heeft weer zijn of haar eigen lipiden die speciaal zijn voor dat organisme en geschikt zijn voor de omgeving waarin deze leeft. Er zijn duizenden verschillende lipiden te vinden in de natuur, dat is heel veel meer dan de 20 verschillende aminozuren in eiwitten of de 4 basen van het DNA.

Hoe verschillend is de bacteriële plasmamembraan van de voor ons belangrijke ziekteverwekkers, nu van die van ons (Figuur 7)?



Figuur 7. Verschillen tussen de lipide samenstelling van menselijke en bacteriële cellen.

De plasmamembraan van onze cellen bevat hoofdzakelijk de fosfolipiden:

PC, sphingomyeline, PE, PI en PS.

Hierbij zijn PC, sphingomyeline en PE netto ongeladen en PI en PS beide negatief geladen, hun precieze chemische structuur is nu even niet van belang.

De bacteriële plasmamembraan van de voor ons interessante bacteriën bevatten over het algemeen voornamelijk:

PE, PG, en cardiolipine een speciaal fosfolipide met een dubbele hydrofiele kop.

PG en cardiolipine zijn beide negatief geladen waarbij cardiolipine zelfs een dubbele negatieve lading heeft.

Het verschil zit hem dus vooral in de aanwezigheid van PG en cardiolipine, maar ook in de hoeveelheid negatieve lading van de verschillende membranen. Zijn deze verschillen uit te buiten?

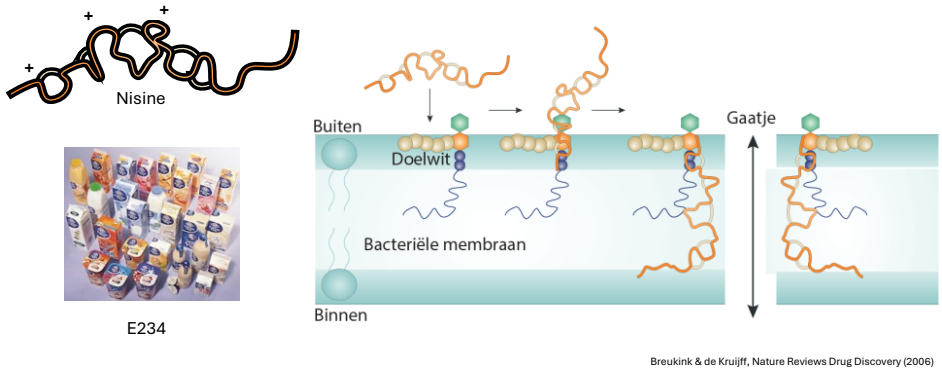
Hoewel cardiolipine niet in de plasmamembraan van onze cellen voorkomt is het niet verstandig dit als doelwit te kiezen omdat het erg belangrijk is voor onze mitochondriën waar het dus wel voorkomt. Wat PG betreft ligt dat anders. Dat onze plasmamembraan geen PG bevat, en het vrijwel niet in onze cellen voorkomt, maakt dat dit fosfolipide een doelwit kan zijn voor een antibioticum. Het is uniek voor de bacteriën. Het laatst geïntroduceerde antibioticum, daptomycine, maakt daar gebruik van door zich specifiek te binden aan PG waardoor de membraan van de bacteriën verstoord wordt en ze zo dood gaan. Helaas is aangetoond dat sommige bacteriën resistent kunnen worden tegen daptomycine door het PG te veranderen. PG is dus niet zo essentieel om het een goed doelwit te maken.

De aanwezigheid van PG en CL maakt dat er een groot verschil is in totale lading tussen onze plasmamembraan en die van de bacteriën. De plasmamembraan van onze cellen bevat zo'n 10% negatief geladen lipiden en die van de bacteriën kan variëren tussen de 25 en 90%. Hier maken de in de natuur voorkomende antimicrobiële peptiden, kort AMPs genoemd, gebruik van. Hoewel op het eerste gezicht dit verschil niet altijd zo groot is, wordt dit verschil een stuk groter als de locatie van deze lipiden wordt meegenomen (Figuur 7). De negatief geladen lipiden in ons plasmamembraan zijn, bij gezonde cellen, uitsluitend aan de binnenkant te vinden, de membraan is dus asymmetrisch. Dit heeft als gevolg dat ons membraan vanaf de buitenkant gezien neutraal is. Terwijl in de bacteriële membraan de negatief geladen lipiden verdeeld zijn over zowel de binnenkant als de buitenkant. Dit verschil wordt uitgebuit door de AMPs die zelf positief geladen zijn en ook het vermogen hebben zich in membranen te kunnen

nestelen. Hierdoor verstoren AMPs de beschermende werking van de plasmamembraan van bacteriën en sommigen kunnen deze zelfs lekprikken. Een belangrijk verdedigingssysteem van ons lichaam, het native immuunsysteem, maakt gebruik van dergelijke peptiden om zo, lokaal, infecties te bestrijden. Al sinds ik 25 jaar geleden in het antimicrobiële peptide wereldje toetrad worden AMPs voorgedragen als veelbelovende alternatieven voor antibiotica. Er is sindsdien echter nog geen enkel peptide tot de kliniek doorgedrongen, ze beginnen zo op een eeuwige belofte te lijken en persoonlijk denk ik dat dit zo zal blijven. De voornaamste reden hiervoor is omdat ze simpelweg niet specifiek genoeg zijn, ofwel het verschil in negatieve lading van de plasmamembranen van de mens en de bacteriën is niet genoeg. De AMPs werken goed als ze lokaal, bij de plaats van infectie, door ons immuunsysteem worden aangemaakt zodat ze een voldoende hoge concentratie kunnen bereiken om de bacteriën te doden. Om deze hoge lokale concentratie te bereiken als geneesmiddel via een infuus of andere toedieningswijze is een dusdanig grote hoeveelheid van het AMP nodig, dat het toxisch wordt.

De specificiteit van het AMP voor de bacteriële membraan moet dus behoorlijk omhoog om zo een kans te hebben deze als doelwit te kunnen gebruiken zonder dat dit tot toxiciteit leidt.

Dat de natuur allang heeft bedacht hoe dit voor elkaar te krijgen, daar kwam ik achter tijdens mijn post-doc jaren eind vorige eeuw in het lab van mijn promotor en mentor Professor Ben de Kruijff. In samenwerking met Professor Oscar Kuipers, toen werkzaam bij het NIZO, het Nederlands Instituut voor Zuivel Onderzoek, onderzochten we het werkingsmechanisme van het conserveermiddel nisine, ook bekend als E-nummer E234. Nisine wordt nog steeds als natuurlijk conserveermiddel gebruikt in kaas en andere melkproducten en is in feite ook een AMP, zij het dan met speciale verknopingen waardoor het in een speciale vorm wordt gehouden. Het bleek dat nisine een factor 1000 beter gaatjes kon prikken in de plasmamembraan van bacteriën dan een gewoon antimicrobieel peptide zonder de speciale verknopingen, terwijl nisine volledig onwerkzaam is tegen onze cellen (Figuur 8).

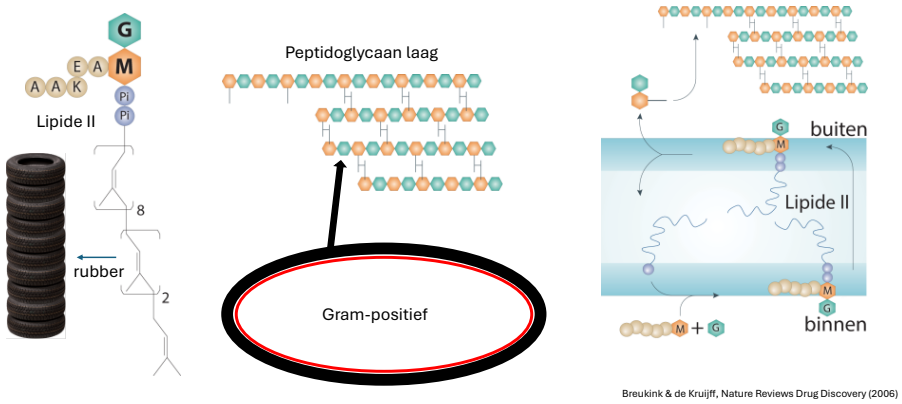


Figuur 8. Het werkingsmechanisme van nisine.

Nisine is zo efficiënt omdat het gebruik maakt van een specifiek doelwit dat alleen in de plasmamembraan van bacteriën voorkomt. Samen met dit doelwit boort het gaatjes in de bacteriële membraan wat direct tot de dood van de bacterie leidt. In feite is het dus een zeer effectief antibioticum. Deze ontdekking kwam mede tot stand dankzij een samenwerking met de groep van Professor Hans-Georg Sahl van de universiteit van Bonn. Het speciale doelwit van nisine is erg belangrijk geworden binnen mijn onderzoek en heeft in feite aan de basis gestaan van mijn hele wetenschappelijke carrière.

Wat is nu precies dat doelwit?

Het doelwit van nisine heet Lipide II en is samengesteld uit een kopgroep van twee suikers, GlcNAc en MurNAc, hier als G en M weergegeven en een peptide keten van 5 aminozuren die aan de MurNAc suiker vast zit. Deze kopgroep zit via twee fosfaat groepen, pyrofosfaat genoemd, vast aan een speciale lipide staart die uit 11 isopreen eenheden bestaat, een soort rubberen staart dus. Het bijzondere aan dit lipide is dat het een essentiële rol speelt in de synthese van de celwand of peptidoglycaan laag van de bacteriën (Figuur 9).



Figuur 9. Lipide II, het meest ideale doelwit voor antibiotica.

Zoals eerder gezegd zorgt de peptidoglycaan laag voor de stevigheid en vorm van de bacteriën Belangrijker nog is dat deze laag de bacteriën beschermt tegen de zeer hoge osmotische druk die binnen de bacterie heerst. Neem je de peptidoglycaan laag weg, dan zullen de bacteriën spontaan ontploffen. Peptidoglycaan is opgebouwd uit lange strengen die zijn verkregen door twee suikers aan elkaar te knopen, GlcNAc en MurNAc, die strengen zijn dan weer aan elkaar geknoopt via peptide ketens die aan de MurNAc suiker vast zitten. Wellicht was het u al opgevallen, Lipide II draagt de basisbouwsteen van de peptidoglycaan laag met zich mee. Het verzorgt het transport van de basiscomponent van de peptidoglycaan laag, de twee suikers en het peptide, over de plasma membraan van de bacterie. Lipide II wordt stapsgewijs opgebouwd aan de binnenkant van de plasmamembraan, in de bacteriële cel, waarna het door de plasmamembraan naar buiten flopt om daar dan te worden gebruikt door de peptidoglycaan synthesemachinerie die de kopgroep afkoppelt en aan elkaar knoopt. Omdat er maar een beperkte hoeveelheid van de lipidestaart in de bacterie aanwezig is, moet de lipidestaart worden gerecycled naar binnen om vervolgens weer voor een volgende synthese te kunnen worden gebruikt. Lipide II speelt dus een essentiële rol binnen de peptidoglycaan synthese en kan worden beschouwd als de Achilleshiel van een bacterie. Ikzelf beschouw Lipide II als het meest ideale doelwit voor antibiotica: het is niet alleen essentieel en uniek (wij hebben namelijk geen peptidoglycaan laag), het is ook goed bereikbaar want het zit aan de buitenkant van de plasmamembraan en bovenal: het is ook nog eens geen eiwit.

Waarom is dit belangrijk?

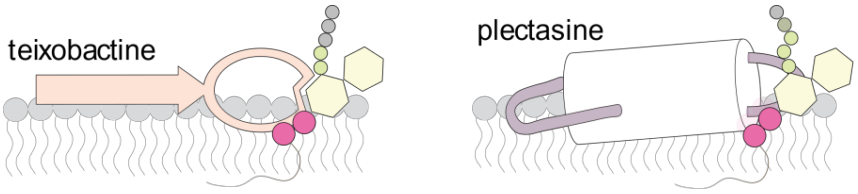
Eiwitten zijn opgebouwd uit een sliert van aan elkaar geknoopte aminozuren waarvan onze (maar ook bacteriële) cellen 20 verschillende aminozuren gebruiken voor de opbouw van deze eiwitten. De informatie over de juiste volgorde van de aminozuren in de slierten van eiwitten is opgeslagen in het DNA. Via veranderingen in het DNA, mutaties genoemd, veranderen de eiwitten, wat gunstige of ongunstige gevolgen kan hebben. Bij bacteriën gebeurt dit relatief vaak, waardoor ze zich kunnen aanpassen aan veranderingen om zich heen of zich kunnen verdedigen als ze worden aangevallen door bijvoorbeeld antibiotica. Als bacteriën worden blootgesteld aan antibiotica die een bepaald eiwit als doelwit hebben ontstaat er een zogenaamde selectiedruk. Sommige bacteriën zullen veranderingen in hun DNA verwerven die de plek waarop het antibioticum op het doelwit aangrijpt verandert, zonder dat de eigenlijke functie van het eiwit beïnvloed wordt. Hierdoor verliest het antibioticum zijn werking en zijn deze bacteriën resistent geworden, ze kunnen weer ongeremd groeien. Lipide II is geen eiwit en kan niet zomaar via veranderingen in DNA veranderd worden. Bovendien zouden veranderingen in Lipide II grote consequenties hebben voor de hele syntheseroute van de peptidoglycaan laag. Er zijn namelijk meer dan 10 eiwitten betrokken bij de synthese van de peptidoglycaan laag, een verandering in Lipide II zou dus tegelijkertijd moeten plaatsvinden met een verandering in alle eiwitten. Dit is, zelfs voor een bacterie, onmogelijk.

Lipide II is dus een ideaal target voor antibiotica.

Het is mijn droom een antibioticum te ontdekken dat ons echt gaat helpen in het gevecht tegen resistente bacteriën. En ik jaag deze droom na door naar nieuwe antibiotica te zoeken die op Lipide II aangrijpen, hier kom ik later nog op terug.

Dat Lipide II een ideaal target is, dat weet de natuur ook. Er zijn namelijk vrij veel, in de natuur voorkomende antibiotica, die Lipide II als doelwit hebben. Nisine die samen met Lipide II gaatjes prikt in de membraan van bacteriën kennen we al. Maar, je hoeft niet per se gaatjes te prikken in de bacteriële membraan als antibioticum, hoewel dat wel de meest directe wijze is om een bacterie te doden. Aan Lipide II binden is al genoeg om de peptidoglycaan synthese te remmen en zo de bacterie uiteindelijk te doden. Vancomycine,

teixobactine en plectasine zijn voorbeelden van zulke antibiotica die Lipide II binden, waarvan alleen vancomycine wordt toegepast als antibioticum binnen de kliniek (Figuur 10). De laatste twee, teixobactine en plectasine zijn vrij recent ontdekt en dankzij een zeer succesvolle samenwerking met de groep van Dr Markus Weingarth van de NMR-sectie hier in Utrecht weten we precies hoe deze aan Lipide II binden en wat daarvan de gevolgen zijn. Twee promovendi, Miranda en Maik hebben in totaal 8 jaar gewerkt om het werkingsmechanisme van plectasine op te helderen, en het werk is dit jaar gepubliceerd.



Figuur 10. Antibiotica die aan lipide II binden.
Uit: Shukla, Nature 2022 en Jekhmane, Derks et al., Nature Microbiology, 2024

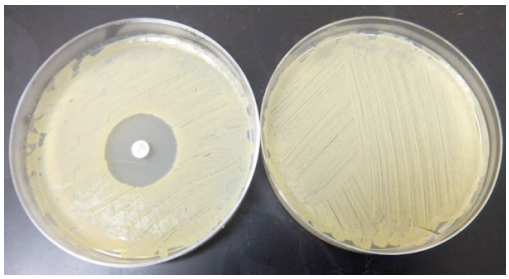
Plectasine, is in feite een antimicrobieel peptide dat door de schimmel *Pseudoplectania nigrella*, ofwel de zwarte bekerzwam, gemaakt wordt en is ontdekt door onderzoekers van het Deense bedrijf Novozymes, dit is een onderdeel van Novo Nordisk, het bedrijf achter Ozempic. Het is geprobeerd om plectasine als antibioticum te introduceren in de kliniek, maar dit is om een voor mij onbekende reden stukgelopen. Onlangs kwam ik er achter dat er nog 5 kilo van dit peptide in een vriezer ligt klaar voor klinische trials, waar helaas hoogstwaarschijnlijk niets mee gaat gebeuren.

Het voorbeeld van plectasine geeft aan dat schimmels een goede bron kunnen zijn voor antibiotica. Sinds de ontdekking van penicilline, wat een schimmelproduct is, zijn verreweg de meeste antibiotica die nu worden gebruikt gevonden in bacteriën van de streptomyceten familie. Ik ben van mening dat de schimmels ons nog veel meer te bieden hebben dan alleen penicilline en plectasine. Vandaar dat ik in mijn zoektocht naar nieuwe antibiotica extracten van schimmels gebruik. Ik prijs mij hierbij gelukkig dat ik een hele mooie samenwerking hiervoor heb met Dr. Jan Dijksterhuis van het Westerdijk instituut voor schimmelbiodiversiteit. Dit instituut bezit de grootste collectie van

verschillende schimmelstammen van de hele wereld, een goudmijn voor onderzoekers zoals ik die geïnteresseerd zijn in bioactieve stoffen.

Maar hoe zoek je naar antibiotica (Figuur 11)?

.



Figuur 11. Test op antibiotica activiteit.

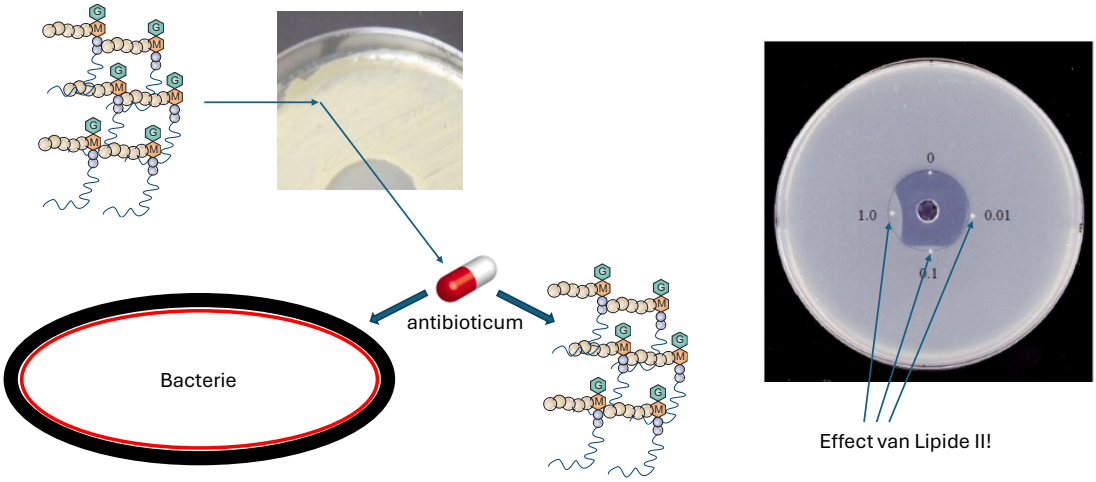
Er bestaat een heel simpele methode om te bepalen of een schimmelextract een antibioticum bevat. Dit doe je door een kleine hoeveelheid van het schimmelextract aan te brengen op een plaat met een voedingsbodem waar van te voren een hoeveelheid bacteriën in zijn gestopt. Als er een antibioticum in het extract aanwezig is, zal er op en rond de plek waar het extract is aangebracht geen bacteriegroei meer kunnen plaatsvinden, want alle bacteriën worden rond die plek gedood. Dit wordt zichtbaar doordat daar waar de bacterie wel kan groeien het groeimedium in de voedingsplaat minder doorzichtig wordt, terwijl de plek waar ze gedood zijn helder blijft, de zogenaamde halo. Is er geen enkele antibiotische activiteit dan wordt de plaat volledig overgroeid door de bacteriën.

Deze methode is in de 40 jaar durende gouden periode van de antibiotica ontdekkingen veel gebruikt, en daarin schuilt ook het gevaar. Als je op deze wijze nieuwe antibiotica probeert te zoeken zal je ongetwijfeld veel reeds bekende antibiotica herontdekken. Veel moeite om niets dus. Je moet dit dus slimmer aanpakken. Veel beter is om de zoekmethode zo aan te passen, dat alleen de interessante antibiotische activiteit boven komt drijven. Het mooiste is als je gebruik kan maken van een doelwit tijdens de zoektocht, en laat ik nu net het meest ideale doelwit in handen hebben, Lipide II!

Hoe kom ik daar eigenlijk aan? Toen we tot de ontdekking kwamen dat nisine zo goed werkt omdat het Lipide II gebruikt, besefte ik mij dat het heel interessant zou zijn om relatief grote hoeveelheden van het Lipide II in handen te krijgen. Niet alleen was dit van belang voor het nisine onderzoek, maar het zou ook goed

gebruikt kunnen worden in een nieuwe onderzoekslijn gericht op de peptidoglycaan synthese. Dit is ons uiteindelijk gelukt. De grote truc zat hem in de staart van Lipide II die in de bacteriële membraan maar beperkt beschikbaar is. Vandaar dat, zoals ik al vertelde, de staart tijdens de peptidoglycaan synthese moet worden gerecycled. Het bleek dat als je een externe hoeveelheid van de staart toevoegt aan een synthesesysteem, dit de opbrengst vele malen groter maakte. In feite is er vrijwel geen beperking meer op hoeveel Lipide II we kunnen maken. Dit komt omdat de bron van de staart heel makkelijk te verkrijgen is. Planten hebben namelijk ook dit soort vetachtige stoffen op hun bladeren (de polyisoprenen). Wellicht weet u dat rubber, een polyisopreen, oorspronkelijk ook uit een plant komt. Het blijkt dat laurierblaadjes polyisoprenen van 11 isopreen eenheden bevatten, precies de juiste lengte voor de Lipide II synthese, en laurierblaadjes zijn makkelijk te verkrijgen. We teren al jaren op een paar kilo laurierpoeder. Mocht u overigens een Flueelboom in de tuin hebben, de bladeren daarvan zijn ook een heel goede bron, echter in Nederland is daar wat minder makkelijk aan te komen.

Hoe nu dit Lipide II in te zetten bij de zoektocht naar nieuwe antibiotica (Figuur 12)?

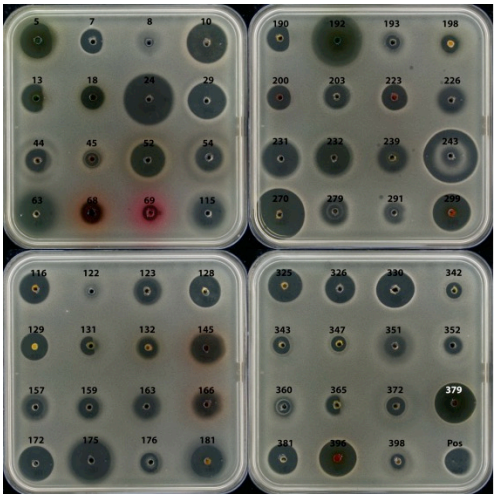


Figuur 12. Zoektocht naar antibiotica die Lipide II als doelwit hebben.

Dit is vrij gemakkelijk. Van schimmelextracten die antibiotisch actief zijn wordt nogmaals eenzelfde hoeveelheid op een voedingsbodem met bacteriën gespot.

Echter, daar waar de rand van de halo wordt verwacht, wordt ook een hoeveelheid gezuiverd Lipide II gespot. Wat gebeurt daar?

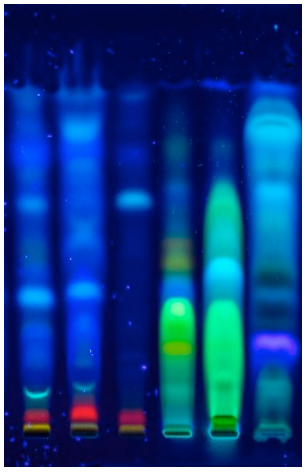
Op die plek zal het aanwezige antibioticum, als het inderdaad via Lipide II werkt, juist aan het extern toegevoegde Lipide II binden en niet het Lipide II in de bacteriële membraan. Als gevolg hiervan zullen de bacteriën in de buurt waar Lipide II extern is aangebracht weer kunnen groeien. Op deze wijze hebben wij in samenwerking met Dr. Jan Dijksterhuis van het Westerdijk Instituut tot nog toe van ongeveer 500 verschillende schimmels onderzocht of ze een antibioticum produceerden dat is gericht op Lipide II.



Figuur 13. Schimmel extracten met antibiotische activiteit waarvan sommigen door Lipide II worden beïnvloed.

Hier ziet u een deel van de resultaten, waar als u goed kijkt 12 extracten te vinden zijn die een deuk hebben in de halo, en dus een voor ons interessant antibioticum produceren (Figuur 13). Echter, de weg naar de uiteindelijke identificatie van het nieuwe antibioticum is nog lang.

De eerste horde die genomen moet worden is het antibioticum uit het schimmelextract zuiveren. En dat kan heel lastig zijn. Hier zit u een voorbeeld van hoeveel verschillende stoffen in de schimmelextracten kunnen voorkomen (Figuur 14).

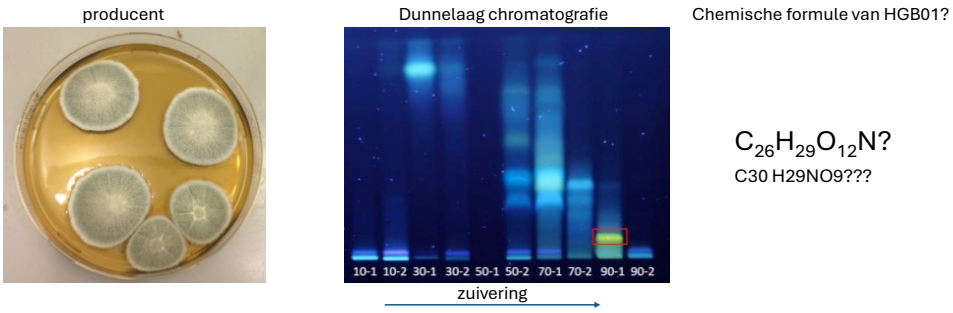


Figuur 14. Extracten van verschillende schimmels geanalyseerd met dunnelaag chromatografie.

Wat u kunt zien is een analyse van de samenstelling van 6 verschillende schimmelextracten via dunne laag chromatografie, een techniek die u wellicht ooit op school ook heeft gebruikt, om bijvoorbeeld kleurstoffen uit een stift te scheiden. De dunne laag is beschenen met ultraviolet licht zodat fluorescente stoffen die in het schimmelextract zitten zichtbaar worden. Sommige schimmel extracten lijken op elkaar en andere extracten zitten bommetje vol met verschillende stoffen, wat de zuivering heel lastig maakt. En het hoeft ook niet eens zo te zijn dat het antibioticum waar we naar op zoek zijn fluorescent is, wat het allemaal nog lastiger maakt. Ondanks deze moeilijkheden boeken we toch langzaam maar zeker vooruitgang.

Een voorbeeld hiervan is het antibioticum HGB01, waar we verreweg het verst mee zijn vooral dankzij inspanningen van een getalenteerde masterstudent Roy van Beekveld en waar ik nog kort even wat van kan laten zien (Figuur 15). HGB01, geproduceerd in een van de 12 extracten, is relatief makkelijk te zuiveren omdat het de enige geel-fluorescente stof is in het schimmelextract. Vandaar ook de naam, HGB staat voor het gele bandje. Het is redelijk actief tegen bacteriën en niet al te giftig, hoewel daar een beetje aan gesleuteld moet gaan worden. De uitdaging van de afgelopen paar jaar is de opheldering van de chemische structuur van HGB. Zonder deze structuur kunnen we niets, en ondanks de goede infrastructuur voor structuur bepaling van eiwitten hier aanwezig op de Universiteit Utrecht, is het nog niet gelukt om de structuur van deze relatief kleine stof te bepalen. In september dit jaar was er eindelijk een doorbraak vlak voordat ik met sabbatical ging, althans dat dacht ik. Het was namelijk gelukt om

kristalletjes te krijgen van HGB, wat een eerste voorwaarde is voor de opheldering van de structuur met behulp van röntgendiffractie. Helaas kreeg ik vorige week te horen dat er alleen waterkristallen gemeten waren en niets anders. Terug naar de tekentafel dus.



Figuur 15. HGB01, een veelbelovend nieuw antibioticum.

Tegenslagen als dit horen nu eenmaal bij wetenschappelijk onderzoek. Lukt iets niet rechtsom, dan probeer je het linksom, en natuurlijk heb je rechtdoor als eerste al geprobeerd. Vaak moet je geduld hebben, en het loont om na een tijd nog eens terug te komen op een onderzoekslijn en gebruik te maken van de voortgang in de technologie. Het nisine onderzoek dat 30 jaar geleden is gestart is daar ook een voorbeeld van. Dankzij de voortgang in de technologie is het onlangs gelukt de structuur van de porie die nisine samen met Lipide II maakt te achterhalen, wederom is dit een samenwerking met Dr. Markus Weingarth. Ook kunnen we, dankzij een samenwerking met Professor Wouter Roos van de Rijksuniversiteit Groningen op atomaire schaal, dankzij technologische verbeteringen, live volgen, hoe nisine samen met Lipide II gaatjes boort in membranen. Het loont dus om even geduld te hebben. Eerder dit jaar refereerde Professor Stefan Rüdiger ook al aan het belang van geduld in het onderzoek tijdens zijn oratie.

Ik hoop alleen niet dat het nog 30 jaar duurt voor ik een nieuw antibioticum heb ontdekt…

Ik ben bijna aan het eind gekomen van mijn oratie, maar kan niet afsluiten zonder een aantal mensen te bedanken.

Graag wil ik het College van Bestuur van de Universiteit Utrecht en de besturen van de Faculteit Betawetenschappen en het departement Scheikunde danken voor

het in mij gestelde vertrouwen. Ik beschouw het als een voorrecht dat ik als hoogleraar hier mag werken, of liever gezegd mijn betaalde hobby uit mag voeren, wetenschap is nu eenmaal heel erg leuk om te doen.

Wetenschap is teamwork, en wellicht is het u al opgevallen dat ik veel samenwerkingsverbanden heb met andere wetenschappers, waarvoor ik zeer dankbaar ben. Ik kan niet iedereen opnoemen, maar wil toch een paar met name noemen. Nathaniel Martin en Markus Weingarth wil ik bedanken voor de geweldige en succesvolle samenwerking die ik met ze heb en heb gehad op het onderzoek aan antibiotica. Ook wil ik Jan Dijksterhuis van het Westerdijk Instituut bedanken voor de goede samenwerking. Jan, ik heb nu weer de tijd om aan ons mooie artikel te werken, dus hopelijk kunnen we dat binnenkort afronden en in een goed blad publiceren. Verder wil ik alle studenten, promovendi, post-docs en collega's waar ik mee heb samengewerkt bedanken.

Mijn promotor en mentor Ben de Kruijff wil ik nog speciaal noemen hier. Zonder zijn steun en geloof in mijn kunnen zou ik hier nu niet staan.

Sporten is een belangrijke uitlaatklep voor mij, en het is daarom niet vreemd dat ik met ongeveer de helft van het hier aanwezige publiek sport of heb gesport. Veruit in de meerderheid zijn mijn huidige en ex teamgenoten van de Doornse Hockeyclub, Hockeyclub Kromme Rijn of de Masters. Ik beschouw het altijd als een voorrecht om met jullie in een team te zitten, en hoop dat nog lang vol te houden. Wat ook leuk is, is dat jullie nu al meer dan een half uur naar mij luisteren zonder dat jullie mij hebben kunnen onderbreken. De maandag avond circuit club van atletiek vereniging Hellas, of moet ik basketbal club zeggen, mag ook niet onvermeld blijven. Mijn fysieke conditie dank ik mede aan deze groep waarvan de kern al meer dan 25 jaar samen sport, dit zouden we eens moeten vieren…

Ik prijs mij gelukkig dat mijn beide ouders dit moment met mij mogen vieren en dank hun voor alle steun die ik altijd heb gehad, en hoe mooi is het als je vader in het cortège mee loopt!

Als laatste wil ik mijn gezin bedanken. Ik ben trots op mijn beide dochters Charlotte en Suzanne en wat ze tot nu toe hebben bereikt. Dank voor jullie liefde! En dan de aller belangrijkste persoon in mijn leven, Annemieke, dank voor jou

grote steun en geduld met mij. Ik kan eindelijk in het openbaar een reactie geven op de laatste zin in jou proefschrift. Ik hou ook van jou lieffie!

Ik heb gezegd.