



Pieter Tepper werkt sinds tien jaar bij de basiseenheid Chemische Farmaceutische Biologie. Daarvoor werkte hij ook al bij de faculteit Farmacie, van 1982 tot 2007. Hij houdt zich nu vooral bezig met organische synthese van referentiestoffen en het begeleiden van onderzoekers en studenten op het gebied van organische synthese en analyse. Hij voert de scepter over twee synthesezalen en een analytisch lab. Een keer per jaar geeft hij gedurende zes weken het keuzevak ‘Medicinale Natuurstoffen’ aan masterstudenten.

Het juiste enzym met het juiste substraat kan voor wonderen zorgen in de asymmetrische synthese van ingewikkelde organische verbindingen. **Onderzoekers van de basiseenheid Chemische Farmaceutische Biologie slagen er wat dat betreft steeds beter in om**

**goede matches te vinden.** Baken in deze ‘First Dates avant la lettre’ is analist Pieter Tepper, die zijn gevarieerde takenpakket samenvat als ‘het zorgen voor een zo optimaal mogelijke werksituatie voor de onderzoekers en studenten’.

# Enzymen zijn meesters in organische synthese

In het populaire tv-programma 'First Dates' draait het om het vinden van de spreekwoordelijke chemie tussen twee mensen. Op basis van profielen van de deelnemers proberen de programmamakers vooraf een zo goed mogelijke match te maken, die dan tijdens een etentje tot de gewenste reactie moet leiden. De praktijk wijst echter vaak uit dat deze exercitie zeker geen garantie is voor het doen overslaan van de vonk.

Misschien zouden de maker van 'First Dates' eens naar Groningen moeten afreizen om daar bij Chemische Farmaceutische Biologie (CFB) de kunst af te kijken hoe je dat structureler kunt aanpakken. Want in wezen zijn de onderzoekers van deze basiseenheid, die deel uit maakt van het Groningen Research Institute of Pharmacy (GRIP), ook op zoek naar matches. Alleen niet tussen mensen, maar tussen enzymen en organische moleculen. En nog een groot verschil: niet vanuit een database met summiere informatie uit vluchtig ingevulde vragenlijsten, maar op basis van gedetailleerd inzicht in de 3D-structuur van het enzym en een mix van organisch-chemische en biochemische kennis.

## Recht op het doel af

Zolang als er leven op aarde is staan enzymen hun mannetje in de natuurlijke habitat van biologische systemen, waar ze in tal van biochemische processen zorgen voor de benodigde omzettingen van relatief eenvoudige organische moleculen. Van veel recentere datum is het inzicht dat er in de structuur van menig enzym ook een enorme potentie zit om meer complexe, gesynthetiseerde organische verbindingen selectief om te zetten, bepaalde koppelingen precies op de juiste plek in het molecuul tot stand te brengen. In menig onderzoek zijn wat dat betreft spectaculaire resultaten behaald ten opzichte van de door

noeste arbeid tot stand gebrachte organische-syntheseroutes. Een voorbeeld is de productie van L-TBOA, een potente glutamaat-transporterremmer. Hiervoor zijn minmaal tien chemische stappen nodig. Dat doen ze in Groningen in drie stappen met een gemuteerd enzym, methylaspartaat ammonium lyase (MAL). De eerste stap is een chemische omzetting, terwijl de laatste twee stappen enzymatisch worden uitgevoerd.

Dergelijke shortcuts kunnen bijdragen aan een meer efficiënte (en dus ook goedkopere) productie van geneesmiddelen. Maar er zit wat betreft de enzymen nog meer in het vat. In de eerste plaats is dat de enantiomeerselectieve synthese. Vaak is het alleen een bepaalde conformatie (de R- of de S-vorm) van een molecuul die zorgt voor de werkzaamheid. Wil je daar door middel van organische synthese aan komen, dan zijn hiervoor in veel gevallen tijdrovende en dure zuiveringsstappen nodig. Met een geschikt enzym kun je echter zonder die extra stappen al enantiomere zuiverheden van 98% of meer halen. Een ander voordeel van de inzet van enzymen is dat er nieuwe verbindingen kunnen worden gemaakt, die je op de 'klassieke' organische wijze niet of heel moeilijk kan maken. Deze moleculen kunnen op hun beurt weer worden getest als potentiële medicijnen.

## Enzym engineering

De productie van bestaande en nieuwe geneesmiddelen kan nog een handje worden geholpen door de enzymen te modificeren. Dat perfectioneren van de match tussen enzym en substraat door het aanbrengen van mutaties in de 'active site' van het enzym heeft de basiseenheid Chemische Farmaceutische Biologie geen windeieren gelegd. Mede door het verkrijgen van Veni-, Vidi- en Vici-beurzen zijn er rond de vaste staf van vier hoogleraren en vier analisten inmiddels een kleine twintig onderzoekers (PhD-studenten en

post-doc's) werkzaam. Verder doen er jaarlijks gemiddeld tien studenten hun masteronderzoek bij deze basiseenheid.

Het onderzoek binnen CFB is verdeeld over vier onderzoekslijnen, te weten 'moleculaire biologie', 'medicinale chemie & chemische biologie', 'gentherapie' en 'farmaceutische biotechnologie'. Het zwaartepunt van de enzym engineering bij 'farmaceutische biotechnologie' ligt op het gebied van de chemo-enzymatische katalyse. Enzymen waar veel onderzoek mee wordt gedaan zijn onder andere 4-OT (4-oxalocrotonaat tautomerase) en MAL. Met gemuteerde 4-OT enzymen kunnen in een paar stappen GABA-varianten in zeer hoge stereoselectiviteit worden gemaakt. GABA (gamma-aminoboterzuur) is een belangrijke neurotransmitter. Derivaten hiervan worden gebruikt als geneesmiddel tegen epilepsie en andere neurologische aandoeningen. De enzymatische stappen vinden in gebufferd water plaats. Het voordeel hiervan is dat je geen organische oplosmiddelen hoeft te gebruiken dat heel gebruikelijk is in de organische chemie. 4-OT is met zijn eindstandige proline geschikt voor het uitvoeren van tal van selectieve condensatie- en additiereacties, zoals aldolcondensatie en Michael-additie.

## Stug doorwerken

Aan de experimenten met de gemodificeerde enzymen zit veel →



Als je gaat vriesdrogen moet je eerst je monster invriezen door hem boven vloeibare stikstof te draaien. Pieter Tepper heeft hiervoor een slimme oplossing uitgewerkt door van een oude Büchi Rotavap uit de jaren 70 alles af te halen en alleen het motortje over te houden, dat ook na ruim veertig jaar nog prima werkt. Door aan de motor een kolfje te hangen, kan je dat mooi boven de vloeibare stikstof houden. Dat werkt perfect.

praktisch werk vast. Organisch-chemisch analist Pieter Tepper legt uit wat er allemaal bij komt kijken. “Een veelgestelde onderzoeksvraag is of we een bepaald geneesmiddel met een van onze enzymen kunnen maken. Dat kan je op basis van structuurinformatie deels beredeneren –zeg maar richting geven aan het onderzoek met een ‘educated guess’–, maar je zal het toch praktisch moeten aantonen. In een typisch experiment werken we met honderden verschillende vormen van een enzym, die op bepaalde plekken zijn gemuteerd. Door die allemaal voor dezelfde test op te laten gaan (zeg maar aan dezelfde kandidaat uit First Dates te koppelen), kan je precies zien met welke mutaties van de ‘active site’ je het beste scoort voor je reactie, waarbij je niet alleen de gewenste stof in je analyse wilt zien, maar ook nog eens in een zo zuiver mogelijke enantiomere vorm. Daarbij duiken we steeds dieper het enzym in; zo kijken we nu ook naar de effecten van meerdere mutaties in hetzelfde enzym.” Afgezien van het feit dat al die reacties moeten worden uitgevoerd en de eindproducten moeten worden geanalyseerd, is het ook zaak om aan te tonen dat je ze daadwerkelijk maakt met je enzym. “In de organische synthese heb je stoffen die alleen maar een reductie of een oxidatie bewerkstelligen; die hebben een vrij nauw omschreven reactiviteit. Enzymen daarentegen kunnen veel meer; daar is het geen uitgemaakte zaak dat de stap van A naar B te maken heeft met die bepaalde katalytische activiteit van het enzym. Door de synthese van referentiestoffen kunnen we aantonen of het enzym de juiste verbinding heeft gemaakt met de juiste conformatie. Dat laatste heeft vooral te maken met het feit dat

veel geneesmiddelen chirale (een of meerdere asymmetrische koolstofatomen) eigenschappen hebben. Om de conformatie en de juistheid van de verbindingen vast te stellen maken we gebruik van NMR-, HPLC-, GC/MS- en MS-technieken.”

### Ondersteunen

Het synthetiseren van de zuivere enantiomeren van die referentieverbindingen vergt in de regel behoorlijk wat expertise op het gebied van organische synthese. Pieter Tepper staat met zijn meer dan 35 jaar ervaring op dit gebied dan ook nog regelmatig zelf voor de zuurkast, vooral als het echt moeilijk wordt. “Onderzoekers en studenten voeren in principe zelf hun syntheses uit. Dat gaat prima bij eenvoudige reacties, maar wordt het complexer, dan hebben ze vaak praktische vragen en daarin ondersteun ik ze.” Pieter hanteert als beheerder van het analyselab met HPLC, GC en GC/MS dezelfde insteek bij het analysewerk. “Onderzoekers moeten ook de analytische vaardigheden leren. Dan krijgen ze ook een beetje respect voor het apparaat. Niet van ‘ik injecteer en dan komt er wel wat uit de GC rollen’. Septum wisselen, stukje van de kolom afsnijden en de kolom er weer inbrengen. Als ze weten wat er allemaal komt kijken bij het onderhoud van dergelijke apparatuur, worden ze zorgvuldiger met het voorbereiden van hun monsters. En ze leren beter hun resultaten te interpreteren.”

### Vriesdrogen

Het werken met enzymen is voor menig klassiek geschoolde organisch chemicus een eye-opener, zeker ook voor Pieter Tepper. “Naast de soms spectaculaire shortcuts in de syntheseroutes, is

het zeker gezien vanuit je organische achtergrond ook opmerkelijk dat veel van de reacties kunnen worden uitgevoerd in gebufferd water, zelfs de reducties. Dat heeft ook praktische voordelen. Het is namelijk heel efficiënt om aan de hand van vriesdrogen je gesynthetiseerde stoffen direct vanuit de waterige fase te isoleren. Na een extractie van water met een organisch oplosmiddel (niet mengbaar met water) wordt veelal na indampen uit het organisch oplosmiddel een olieachtig product verkregen. Indien het product oplosbaar is in water, is vriesdrogen een heel goed alternatief. Bij vriesdrogen met water krijg je vaak direct poedervorming en heb je een vast product.” Waar lange tijd gebruik kon worden gemaakt van de vriesdroger van een andere afdeling, is ten gevolge van de sterke groei in het aantal onderzoekers en dus ook gebruikers van de vriesdroger twee jaar geleden besloten om er zelf een aan te schaffen. Hierbij is gekozen voor de Lyovapor L-200 van Büchi Labortechnik. “We hebben dit apparaat met een capaciteit van 6 kg (ijs) eerst een tijdje op proef gehad en dat beviel prima. We hebben er zelf voor gekozen om er een droogpomp achter te plaatsen met een capaciteit van 10 m<sup>3</sup> per uur. Die is in onderhoud een stuk prettiger dan een rotatiepomp die olie bevat. Verder is de koelunit op ons verzoek voorzien van een glazen afdekplaat, zodat ook de mate van ijsvorming in de koelunit kan worden waargenomen. We hebben het apparaat, dat inmiddels ruim een jaar probleemloos zijn werk doet, namelijk dag en nacht aan staan. In principe wordt hij aan het einde van iedere week ontdooid en schoongemaakt. Daarmee zijn we een teveel aan ijsvorming in de regel wel voor. Maar mocht er eens



meer ijs worden gevormd dan normaal, dan kunnen we dat met de glazen inblikplaat in ieder geval zien aankomen.”

### Optimale werksituatie

Het voorkomen van problemen en een zo optimaal mogelijke werksituatie creëren is de core-business van Pieter Tepper. “Binnen de onderzoeksgroep ben ik een aanspreekpunt voor alle praktische zaken over synthese, analyse en veiligheid. Er is veel overleg met studenten en vaak komen ze ook met eigen initiatieven, iets wat ik erg toejuich, zolang de veiligheid niet in het gedrang is. Het is niet zo dat ik voor elk probleem een oplossing heb. Daarover mogen ze ook zelf eerst nadenken samen met hun labmates.” “Mijn collega’s en ik zijn laagdrempelig en daarom weten ze ons ook makkelijk te vinden”, vervolgt hij. “Belangrijk is dat de studenten kunnen beschikken over voldoende voorzieningen. Daar proberen we zoveel mogelijk in tegemoet te komen en dat kunnen we gelukkig ook. Zijn er praktische vragen dan proberen we daar snel een oplossing voor te vinden. Zo hebben we voor elk lab een lab captain die als aanspreekpunt dient om problemen die er zijn snel te tackelen. Ik kan alleen goed functioneren en mijn overige taken uitvoeren als zij ook goed functioneren. Andersom werkt niet. Problemen die jij moet oplossen, moet je ook niet bij de PhD-studenten neerleggen. Omdat we met veel studenten werken die uit verschillende streken buiten ons land komen is het niet altijd even gemakkelijk om op één lijn te komen. Vaak ligt de oorzaak in de cultuurverschillen. Met name met de wijze van uitvoering, veiligheid en labregels. En toch weten ze zich snel aan te passen en de skills die ze bij ons nodig hebben snel onder de knie te krijgen.”

Een ding waar Pieter vaak tegenaan loopt is het onzorgvuldig omgaan met samples, het niet of slecht leesbaar labelen van vials of kolven. “Deze worden dan in de koelkast geplaatst en bij opschonen is het voorgekomen dat een kolf in de vaatwasser belandde. Weg product. Erg triest als er veel werkuren in hebben gezeten. Om dat te voorkomen hebben we het volgende bedacht. De regel is nu dat men de vials en/of kolven (gecodeerd!) in de koelkast mag bewaren mits men eerst een bakje neemt en deze codeert met hun initialen en datum, en deze gegevens



PhD-student Faizan Bhat maakt regelmatig gebruik van de Lyovapor L-200 vriesdroger van Büchi Labortechnik voor het vriesdrogen van kleine peptiden. De vriesdroger is nu ruim een jaar bijna continu, zonder storingen in gebruik.

met het nummer van de plank vermeldt op een formulier dat op de koelkast is geplakt. Indien je meer bakjes nodig hebt is dat geen probleem en je kunt het plaatsen waar je wilt. De bakjes zijn van polypropyleen hebben een formaat van 10 x 20 en 20 x 20 cm en 9 cm hoog, zijn recht en zo verspil je ook geen ruimte. Heel praktisch.”

### INFORMATIE

**BÜCHI Labortechnik**

[www.buchi.nl](http://www.buchi.nl)

**Chemische Farmaceutische  
Biologie**

[www.rug.nl/research/grip/cpb/](http://www.rug.nl/research/grip/cpb/)