

University of Groningen

Just add sugar...

Pijning, Tjaard

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2014

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Pijning, T. (2014). *Just add sugar... Structural Studies on Glucansucrase and Fructansucrase Enzymes from Lactobacilli*. Groningen: s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Just add sugar...

**Structural Studies on Glucansucrase
and Fructansucrase Enzymes
from *Lactobacilli***

Tjaard Pijning

The cover shows the atomic 3D structure of the glucansucrase GTF180-ΔN from *Lactobacillus reuteri* 180, complexed with its substrate sucrose in the active site. On the back is a series of pictures taken from a crystal of the enzyme incubated with sucrose; over time, a glassy layer develops around the crystal, likely representing the α-glucan polymer synthesized by the enzyme.

De omslag toont een 3D model van het enzym glucansucrase GTF180-ΔN uit de melkzuurbacterie *Lactobacillus reuteri* 180, met het substraat sucrose (geel) in de actieve holte. Op de achterkant zien we een serie opnames van een kristal van dit enzym, gedrenkt in een sucrose oplossing. In de tijd ontwikkelt zich een glasachtige laag om het kristal, waarschijnlijk bestaande uit het α-glucaan polymeer dat door de enzymmoleculen wordt gesynthetiseerd.



rijksuniversiteit
groningen

Just add sugar...

Structural Studies on Glucansucrase and Fructansucrase Enzymes from *Lactobacilli*

Proefschrift

ter verkrijging van de graad van doctor aan de
Rijksuniversiteit Groningen
op gezag van de
rector magnificus, prof. dr. E. Sterken
en volgens besluit van het College voor Promoties.

De openbare verdediging zal plaatsvinden op

vrijdag 10 januari 2014 om 14.30 uur

door

Tjaard Pijning

geboren op 24 juni 1965
te Scheemda

Promotores:

Prof. dr. B.W. Dijkstra

Prof. dr. L. Dijkhuizen

Beoordelingscommissie:

Prof. dr. D.B. Janssen

Prof. dr. J.P. Kamerling

Prof. dr. M.J.E.C. van der Maarel

ISBN (print version): 978-90-367-6620-3

ISBN (electronic version): 978-90-367-6619-7

Hoe meer we weten, hoe meer we ons zouden moeten verwonderen.

M. Lucado

Voorwoord

Bewust zet ik dit dankwoord *vooraan* in mijn proefschrift: ik ben ervan overtuigd dat het zonder de mensen die ik hieronder noem niet was gelukt om dit werk tot stand te brengen. Samen zorgden zij voor de contacten, voorwaarden en omstandigheden waarin ik mijn vaardigheden kon ontwikkelen. Naast een gevoel van trots is er dus een (groter) gevoel van dankbaarheid. Steeds waren er de juiste mensen op de juiste plaats en tijd...

Van jongs af aan was de nieuwsgierigheid naar hoe dingen werken, en vooral de interesse in techniek en wetenschap al bij mij aanwezig. Op de lagere school werd ik dan ook wel eens als 'professor' bestempeld. Gelukkig vond ik een lotgenoot in jeugdvriend Ger; samen bouwden we ingenieuze apparaatjes, verwonderden we ons over de nieuwste ontdekkingen in de 'KIJK' en deden soms zelf simpele experimenten.

Toch bedacht ik pas in de laatste 2 jaar van de middelbare school wat ik qua verdere opleiding en werk zou willen doen. Mede door het enthousiasme van de scheikundeleraren en de leuke practica koos ik voor de analistenschool. Een keuze waar ik nooit spijt van heb gehad, al was het dan een niveau lager dan de universiteit die ik met een VWO-diploma ook had kunnen doen. En dan uiteindelijk toch op de universiteit terechtkomen, en daar 26 jaar later promoveren... dat is toch wel bijzonder. Maar vooral bijzonder is de groep waar ik - na 2 mooie jaren bij de Farmacokinetiek groep van Geny Groothuis en Dick Meijer - in januari 1990 terechtkwam, en tot op de dag van vandaag nog steeds deel van uit maak. Ik denk vaak dat er voor mij geen betere plek had kunnen zijn. Ik weet zeker dat bij mijn sollicitatie één van de al aanwezige analisten een goed woordje voor mij heeft gedaan omdat we eerder samen op de analistenschool zaten (bedankt Bijtske!). Ik had al gauw door dat het kristalliseren van eiwitten en het onderzoek daaraan perfect aansloten bij mijn interesse in biochemie (de scheikunde van het leven) en, ook niet onbelangrijk, mijn gevoel voor beeld-gericht werken. Nog steeds is het fantastisch om turend door een microscoop een prachtig kristal te zien van een interessant eiwit. En om later een 3D model van iets dat in werkelijkheid maar een paar miljoenste millimeter groot is, op je computerscherm rond te draaien, er op in te zoomen. Dat enthousiasme werd in de eerste jaren bij de Eiwitkristallografie groep mede aangewakkerd door professor Wim Hol bij wie ik in het slaapziekte-project mocht meedraaien. De microgrammen eiwit uit dat onderzoek waren zo kostbaar dat hij me eerst liet 'oefenen' met het in kilogrammen verkrijgbare albumine... Onderdeel van het leerproces was ook dat ik meegestuurd werd naar een soort niemandsland vlak bij New York om samen met twee (veel meer ervaren) onderzoekers metingen te doen op een

synchrotron. Nou ja, metingen... voor mij was het vooral me verwonderen en meekijken. Maar wel een prachtige ervaring. Later zouden nog veel meer van dat soort reisjes volgen binnen Europa waar ik veel van mocht leren. Na het vertrek van Wim Hol nam Bauke Dijkstra het stokje over en kreeg ik alle vrijheid om me verder te ontwikkelen van analist tot onderzoeksmedewerker.

Het in dit boekje beschreven onderzoek komt voort uit de zeer prettige samenwerking met de onderzoeksgroep Microbiële Fysiologie van Lubbert Dijkhuizen. Het begon denk ik in 2004 toen Bauke samen met Andreja, een toenmalige promovenda, mijn kantoor binnenstapte. Als zoiets gebeurde wist je eigenlijk al wel wat de vraag zou zijn: of ik zou willen helpen bij het kristalliseren van een 'moeilijk' eiwit... Ik stemde toe, en gelukkig boekten we al gauw succes. Niet in het minst doordat de eiwitten voor ons werden gezuiverd en we ze 'alleen maar' hoefden te kristalliseren. Vele eiwitpreparaten volgden met wisselend succes; ik ben blij dat het werk aan de glucan- en fructansucrases, die me blijven fascineren, mocht uitmonden in dit boekje! De projecten waarin ik met Slavko, Marta, Munir, Justyna, Sander, Hans, Jelle, Bai, Xiangfeng en Joana mocht/mag samenwerken zijn een mooie brug naar de toepassing van ons onderzoek, iets wat ik heel belangrijk vind. De regelmatige ad hoc bezoeken, meetings en conferenties zijn altijd inspirerend. Lubbert, jouw enthousiasme in onze samenwerking waardeer ik zeer; ik wil je dan ook bijzonder bedanken voor het feit dat je mijn (tweede) promotor wil zijn!

Een universitaire onderzoeksgroep is altijd in beweging door het komen en gaan van onderzoekers, promovendi, studenten en gasten. Eigenlijk heel mooi, want het dwingt je te leren omgaan met verschillende mensen die elk hun eigen karakters en (eigen)aardigheden hebben. Aan velen van hen heb ik goede herinneringen, en de lijst met ex-collega's is na zoveel jaren bijna eindeloos... Een paar mensen wil ik hier speciaal noemen. Allereerst de mensen waar ik mee samen mocht werken: Christophe, Fred, Rob, Domenico, Klaus, Risto, Roberto, Fabrizia, Gertie, Avinash en Andreja. It has been a pleasure and very instructive for me being allowed to support you by growing crystals, and (later) to help determining protein structures. Thanks a lot! Ook aan alle ex-analisten (Ben, Albert, Bijtske, Galya, Leidy, Mieke, Anita, Els) heb ik prettige herinneringen. Ik mis nog wel eens de jaren dat we met 6 analisten het lab draaiende hielden! Naast de vele tijdelijke collega's waren er gelukkig ook blijvers (en terugkomers). Zeker wil ik hier Kor vermelden: met hem had je altijd het gevoel dat de kennis en de mening van analisten heel belangrijk waren voor de groep. Zijn grondige manier van overleg en aanpak waren onmisbaar voor het lab. Bedankt! Gelukkig kan van zijn opvolger Johan hetzelfde worden gezegd. Ook Hilda wil ik hier nog noemen; als drukke secretaresse heb je toch altijd tijd voor een praatje over het werk of hele andere dingen (zoals het fietsweer). De overige collega's van de Eiwitkristallografie groep wil ik

ook bedanken voor de goede samenwerking, adviezen, werkdiscussies en andersoortige praatjes. Tegenwoordig zijn dat Niels, Ali, Eswar, Harshwardan, Paul, Johan, Hendrike, Andy, Anke, Jaap, Dejan, Gjalt, Marco, Ilona, Jinfeng, Carol en Larissa; maar ook iedereen van 'eerder' wil ik bedanken. Dat geldt ook voor de 'buren' van de electronenmicroscopie groep van Egbert Boekema.

Sometimes, colleagues 'passing by' unexpectedly become friends for life. Nagihan, I will always be grateful that I could contribute to finishing your PhD (and moving on to a new life). Beni anladigin ve ozel dostlugun için çok teşekkür ederim!

Henriëtte, jij bent al een kwart eeuw lang m'n kamergenoot en verdient dan ook absoluut een apart paragraafje. Als je al zo lang samen optrekt maak je met elkaar heel wat lief en leed mee, zowel wat het werk betreft als dingen daarbuiten; de kwart-voor-negen-koffie is daarbij onmisbaar! Ik ben erg blij dat we nog steeds van elkaar kunnen leren, en hoop dat we nog lang kamergenoten kunnen blijven (een jaartje of achttien?).

Mijn hartelijke dank gaat uit naar de commissie die dit proefschrift beoordeelde, bestaande uit de professoren Hans Kamerling, Marc van der Maarel en Dick Janssen.

Bauke, in al die jaren dat je de groepsleider was heb je steeds blij gegeven van vertrouwen in mijn werk. Onder jouw leiding werd ik gestimuleerd om mezelf te ontwikkelen, en mocht een aantal artikelen onder jouw supervisie publiceren. Ik waardeer het bijzonder dat ik altijd kon binnenlopen voor een korte vraag, uitleg of discussie over versie X van een manuscript. En versie X+1 was dan meestal heel snel nagekeken. Ik heb erg veel geleerd van jouw inzicht in het schrijven van goede discussies. Toen je me zo'n 4½ jaar geleden de kans bood om te promoveren hoefde ik niet lang na te denken. Ik heb dan ook erg veel plezier gehad in het samenstellen van dit proefschrift. Bedankt voor alle nodige begeleiding en steun daarbij!








Mijn vrienden wil ik bedanken voor de interesse in mijn werk, dat soms lastig is uit te leggen aan niet-wetenschappers ('Heb je een uurtje?'). Ik hoop dat hoofdstuk 7 voor jullie een beetje te bevatten is...

Aan het eind van dit voorwoord wil ik mijn ouders bedanken voor de vrijheid en de liefde die ik van hen kreeg. Pap en mam, ook al vertelde ik nooit zo veel over waar ik mee bezig was, toch weet ik dat jullie me stimuleerden en steunden!

Mijn gezin wil ik bedanken voor de steun die ik altijd heb ervaren, ook als ik weer eens 'op stap' was naar een conferentie of synchrotron. Zij doen me beseffen dat er belangrijker dingen in het leven zijn dan wetenschappelijk succes!

Tjaard

Contents

	Page
 1 General introduction	13
 2 Biochemical and crystallographic characterization of a glucansucrase from <i>Lactobacillus reuteri</i> 180	51
 3 Truncated and full-length glucansucrase GTF180 from <i>Lactobacillus reuteri</i> adopt an elongated structure in solution	61
 4 Crystal structure of the $\alpha(1\rightarrow6)/\alpha(1\rightarrow4)$ specific glucansucrase GTFA from <i>Lactobacillus reuteri</i> 121	85
 5 Crystal structure of inulosucrase from <i>Lactobacillus</i> - insights into substrate- and product specificity of GH68 fructansucrases	97
 6 Summary & Outlook	121
 7 Samenvatting	131
References	137
Curriculum vitae & Publications	149

