



STRUCTUUR EEN FUNCTIE GEVEN

TITIA K. SIXMA

Oplage	1000
Omslagfoto	Levien Willemse, Rotterdam
Ontwerp	Ontwerpwerk, Den Haag
Drukwerk	Demmenie Grafimedia, Leiderdorp

ISBN 90-77906-14-2

© Titia K. Sixma, oratiereeks Erasmus MC
20 januari 2006

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd zonder voorafgaande toestemming van de auteur.

Voorzover het maken van kopieën uit deze uitgave is toegestaan op grond van art. 16h t/m 16m Auteurswet 1912 j°. Besluit van 27 november 2002, Stb. 575, dient men de daarvoor wettelijk verschuldigde vergoeding te voldoen aan de Stichting Reprerecht te Hoofddorp (Postbus 3060, 2130 KB).

STRUCTUUR EEN FUNCTIE GEVEN

REDE

In verkorte vorm uitgesproken ter
gelegenheid van het aanvaarden van het
ambt van bijzonder hoogleraar met als
leeropdracht 'structuur en functie van eiwitten'
aan het Erasmus MC, faculteit van de
Erasmus Universiteit Rotterdam
op 20 januari 2006

door

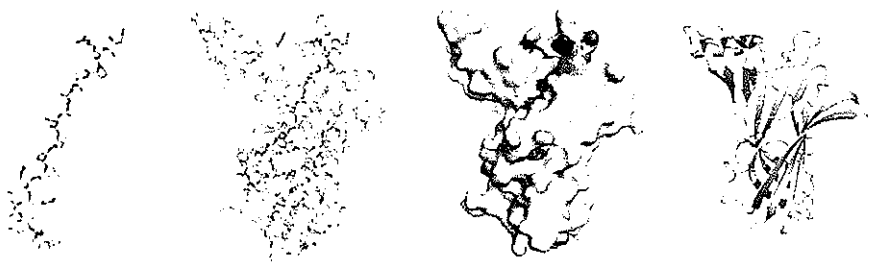
TITIA K. SIXMA

*Mijnheer de Rector Magnificus,
Mevrouw de voorzitter van het College van Bestuur,
Mijnheer de Decaan van het Erasmus MC,
Leden van de Raad van Bestuur van het Erasmus MC en
van het Nederlands Kanker Instituut,
Zeer gewaardeerde toehoorders.*

Inleiding

Voor biomedische onderzoekers zijn dit spannende tijden. Nieuwe technieken geven een scala aan nieuwe mogelijkheden. Zo is enkele jaren geleden de volledige volgorde van het DNA in het menselijke genoom bekend geworden. Deze informatie is voor alle biomedische onderzoekers van belang. De DNA volgorde vertelt ons welke aminozuren de eiwitten in de cel bevatten. Echter zij vertelt niet de structuur van de eiwitten: hoe de aminozuren zich opvouwen tot het eiwit en hoe dat eiwit werkt. Met behulp van structuuronderzoek kunnen wij dit wel zichtbaar maken en hiermee het functionele onderzoek een belangrijke impuls geven. Het plaatje brengt licht in de duisternis en zoals vanavond de lichtjes van Rotterdam de structuur van de stad zullen weergeven zo kunnen wij uit deze kaart van het eiwit belangrijke functionele informatie halen.

Mijn leeropdracht is de structuur en functie van eiwitten. De ruimtelijke structuur van eiwitten, ketens van aminozuren die zich opvouwen tot een driedimensionaal pakketje. Onze fascinatie met eiwitstructuren is makkelijk uit te leggen. Een plaatje zegt meer dan duizend woorden: de ruimtelijke structuur vertelt veel over een eiwit. Wij zijn in staat die ruimtelijke plaatjes te maken en dat laat ons alle atomen in het eiwit zien (Fig 1). Maar we willen meer, we willen die structuur een functie geven: gebruiken om meer te weten over eiwitten, hoe individuele eiwitten hun functie in de cel en in het organisme vervullen, hoe ze de machines van de cel zijn, de regelneven en de organisatie van de cel in handen hebben. In de komende 45 minuten wil ik proberen



Figuur 1 Representaties van eiwitstructuren

uit te leggen hoe wij dit plaatje maken, wat het ons zegt, wat we ervan leren en hoe we die kennis plaatsen binnen het kankeronderzoek in Amsterdam en in Rotterdam.

We bepalen zo'n eiwitstructuur door met röntgenstralen naar het eiwit te kijken. Wij bekijken de structuur van eiwitten op het niveau van de individuele atomen. We gebruiken de röntgenstralen omdat zij een golflengte hebben die kleiner is dan de afstand tussen twee atomen en daardoor kunnen we de individuele atomen onderscheiden. Met zichtbaar licht zou dat nooit gaan en dat is jammer, want zichtbaar licht heeft een aantal eigenschappen die maken dat we daar goed mee kunnen kijken: zo kunnen we bijvoorbeeld lenzen voor het licht zetten en daar een object in detail mee bestuderen: een tweede lens focust het licht en maakt het object zichtbaar, vele malen vergroot. Voor röntgenstralen bestaan geen lenzen en daarom kunnen we van de verstrooide golven slechts de intensiteit meten en niet de fase. Dit betekent dat we een deel van de informatie missen en niet in één keer een plaatje van het eiwit kunnen maken. Gelukkig zijn er een aantal verschillende kunstgrepen mogelijk waardoor het uiteindelijk meestal wel lukt. Die kunstgrepen zijn soms technisch lastig en ze kosten altijd tijd en materialen. Een nieuwe structuur blijft iets waar we heel blij mee zijn.

Een ander en misschien nog wel groter probleem van röntgenstralen is dat ze schade toe brengen aan het object waar we naar kijken. Dit betekent dat we niet lang genoeg kunnen kijken naar één enkel eiwit om het echt te zien. Pas als we naar vele eiwitten tegelijk kijken krijgen we voldoende signaal om het hele eiwit zichtbaar te maken. In de praktijk doen we dat door een eiwit te laten kristalliseren. Daar rangschikken vele miljoenen eiwitten zich netjes in 3-dimensies en als we nu zo'n kristal in de röntgenbundel plaatsen versterkt dit het afgebogen röntgensignaal dusdanig dat we

het eiwit kunnen bekijken, gemiddeld over al die miljoenen moleculen. In dat geval zien we dan ook wel meteen alle atomen in het eiwit, ongeacht hoe groot het eiwit wel niet is en dat is natuurlijk wel weer heel aardig: het is dus alles of niets. Diepe dalen, maar ook hoge pieken.

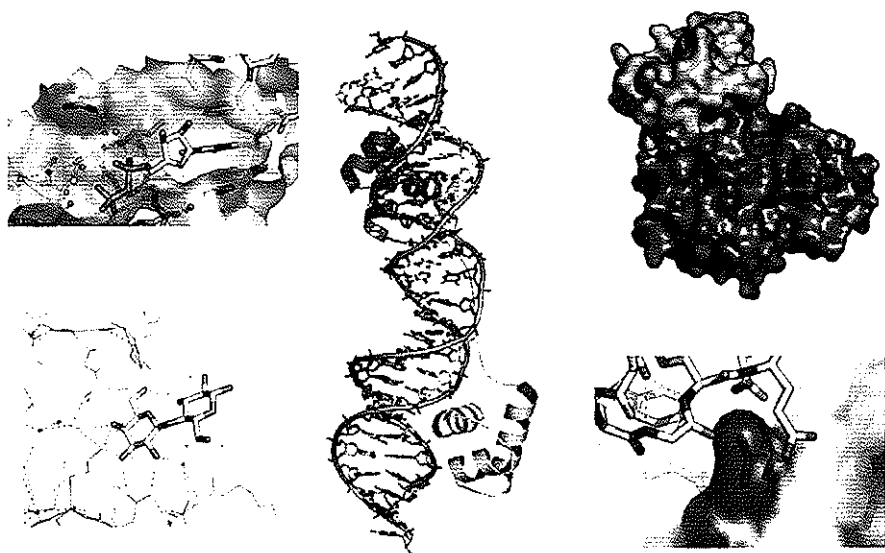
Om te kunnen kristalliseren laten we een oplossing van het eiwit een beetje indrogen en soms zal er dan netjes een kristal groeien, net zoals u bijvoorbeeld suikerkristallen krijgt uit een oververzadigde suikeroplossing. In de praktijk kunnen we dat beïnvloeden door de omstandigheden van de oplossing aan te passen en meestal moeten we wel honderden keren proberen om een kristal te laten groeien. We hebben dan ook veel van het eiwit nodig: voor elk nieuw eiwit moeten we condities vinden waar het tot een kristal wil groeien. De laatste paar jaar kunnen we gelukkig de kristallisaties opzetten en volgen met robots: dat maakt het werk efficiënter en beter reproduceerbaar, maar nog belangrijker is dat we met minder eiwit experimenten kunnen doen. Nu we langzamerhand aan steeds grotere en ingewikkelder complexen gaan werken wordt dat steeds belangrijker: voordat Puck Knipscheer in de groep één kristallisatie weg kan zetten hebben zij en Pim van Dijk meestal al 5 verschillende eiwitten gezuiverd en er een serie biochemische reacties mee uitgevoerd¹.

We willen dan ook het onderste uit onze kristallen halen als we ze een keer krijgen. Hiervoor gebruiken we de meeste intense röntgenbundels die er zijn. Deze worden geproduceerd door een bepaald soort deeltjesversnellers, de synchrotrons, en dat betekent dat we regelmatig afreizen, bijvoorbeeld naar de ESRF in Grenoble, om daar op de beste synchrotronbundels 24 of 48 uur metingen te verrichten. Echte expedities, vol spanning en sterke verhalen, slopend, maar vaak bevredigend als we met vele gigabytes aan nuttige data thuiskomen. Dit is een dure technologie, waar wij dankzij internationale samenwerkingen gelukkig voldoende toegang toe hebben. Maar continue investeringen zijn essentieel: de levensduur van een goede bundel is helaas beperkt door de schade die de straling zelf aanricht. Een relatief rooskleurige toekomst voor de komende 3 jaar betekent niet automatisch dat we op langere termijn ook voldoende toegang hebben: een duidelijke bijdrage van Nederlandse zijde is blijvend noodzakelijk.

Als de kristallisatie en structuurbepaling lukt, is dat prachtig, maar helaas wil niet elk eiwit kristalliseren. Als een eiwit te flexibel is, of niet homogeen, dan lukt de kristallisatie niet. Een groot deel van ons onderzoek is daarom gericht op het maken van de eiwitten, maar ook op het leren kennen van de eiwitten waar we aan werken: we gebruiken een serie biochemische en biofysische methoden om meer te weten van onze eiwitten: hoe groot ze zijn, hoe stabiel, hoe actief, met wie ze complexen maken en onder welke omstandigheden, wanneer ze actief zijn en hoe actief, waar dat van afhangt en hoe dat gaat. We kijken naar grootte door naar de verstrooiing van licht te kijken.

Als je dat vanuit verschillende hoeken doet meet je de statische lichtverstrooiing². Deze is een maat voor de waterverplaatsing van het eiwit, die evenredig is met de exacte massa. Niet zo interessant voor een los eiwit, want daar weten we uit de aminozuurvolgorde al hoe groot het moet zijn, maar wel interessant als het gaat samenklonteren tot bijvoorbeeld dimeren of tetrameren, of nog belangrijker, als we kijken naar eiwitten in complexen. In het laatste geval kunnen we dan ook uitrekenen hoeveel exemplaren van elk eiwit samen het complex vormen. Door deze metingen te koppelen aan een zuiveringssysteem waar we op grootte scheiden kunnen we een goed overzicht krijgen van de verschillende toestanden waar een eiwit complex in kan voorkomen. Vervolgens kunnen we ook kijken in die complexen hoe de twee eiwitten aan elkaar binden. Dit kan bijvoorbeeld door plasmon resonance, waar we een eiwit koppelen aan een chip met een goudlaagje³. Ook hier spelen bijzondere vormen van lichtweerkaatsing een rol, die een maat zijn voor een binding aan het oppervlak. Zo kunnen we naar binding zelf kijken, maar ook inzicht krijgen in de snelheid, de kinetiek van dit proces: hoe snel bindt iets en hoe snel laat het weer los. Dit geeft informatie over de dynamica van het systeem. Met een complementaire techniek, de isotherme calorimetrie, kijken we naar de hoeveelheid warmte die vrij komt bij de binding van twee moleculen. Dat is een prachtige methode omdat hij direct naar de interactie kijkt⁴⁻⁶. Deze warmte is direct gerelateerd aan de enthalpie van de binding, een belangrijke thermodynamische parameter. Als je vervolgens steeds meer van een van de partners toevoegt kun je een bindingscurve berekenen en daarmee ook andere thermodynamische parameters, zoals de entropie van de binding bepalen. Dat zijn niet alleen stoere termen, maar ze vertellen ook wat het belangrijkste aspect aan binding is: het directe contact dat we als enthalpie meten, of aanpassingen in de structuur die we als entropie zien. Met die kennis weet je beter wat er zal gebeuren als je bijvoorbeeld iets verandert aan een van beide componenten. En ook of het nuttig is om ze samen te kristalliseren. We willen ook weten of de eiwitten actief zijn: kunnen ze een bepaalde chemische reactie katalyseren, kunnen ze hun cellulaire bindingspartner activeren, kunnen ze DNA of andere eiwitten herkennen en binden. Dergelijke functionele experimenten zijn van belang om het eiwit te leren kennen en om beter te kunnen kristalliseren.

Ze leveren echter ook een basis voor ons begrip van de functie. Wat is die functie die eiwitten hebben? Eiwitten zijn de regelneven van de cel: ze geven signalen door, ze versnellen reacties, ze zorgen voor de energievoorziening, ze waarschuwen en ze zorgen voor de voortplanting, de celdeling. Er is niets bureaucratischer dan een cel: begrijpen hoe de feedbackmechanismen werken, waar de controle zit en wie wat doet en waarom is belangrijk. Maar hoe doen ze dat? In sommige gevallen door een chemische reactie te versnellen, te katalyseren, door iets te maken of af te breken. Maar veel van die signalen worden doorgegeven door binding, door interactie van eiwit met eiwit, van eiwit met DNA of met andere stoffen (Fig. 2). De experimenten die ik net beschreven heb leggen daarom een basis voor het begrip van de functie. Wij onderzoeken een deel van dit



Figuur 2 Interactie is de basis van eiwitfunctie

bureaucratische proces, de afspraken en regels die gelden en proberen de onderliggende structuren herkennen. Dit is van belang, want het zijn deze mechanismes die mis gaan bij kanker: in de kankercel kloppen die feedbackmechanismes niet meer, kloppen de structuren niet meer en gaat de cel groeien waar hij dat niet moet doen: de bureaucratie ontspoord en is niet langer functioneel.

In mijn groep richt onze aandacht zich op een paar van deze processen, die ieder voor zich bij kanker van belang zijn. Wij kijken in het bijzonder naar het gebied van DNA schadeherstel en naar de signaaloverdracht die wordt bewerkstelligd door binding van het kleine ubiquitine eiwit. In beide gebieden krijgen we steeds meer te maken met de regulatie van chromatine, het in- en uitpakken van DNA tot een compacte structuur, het chromosoom.

Die cellulaire bureaucratie wordt voor een belangrijk deel gereguleerd door kleine chemische veranderingen in eiwitten. Een bekend voorbeeld hiervan is de fosforylering, waar een fosfaatgroep aan het eiwit zorgt dat het al of niet een bepaalde activiteit gaat uitvoeren. Met fosfaat kan het eiwit bijvoorbeeld binden aan een partner, een chemische reactie uitvoeren of zich naar de kern verplaatsen waar het een nieuwe

functie heeft. De kinases die het fosfaat aan een eiwit hangen en de fosforylases die het er weer afhalen horen zo tot de best bekende regelneven in de cel. Er zijn meer van dit soort regulatieprocessen bekend, zoals de binding van een acetylgroep, een methylgroep of een suiker. Het is nu al duidelijk dat ieder van deze modificaties, deze chemische veranderingen, een aantal cellulaire processen reguleert, maar eerlijk gezegd verwacht ik dat we slechts het topje van de ijsberg zien en dat in de komende jaren zal blijken dat elk van deze modificaties een nog veel groter aandeel hebben in de cellulaire regulatie dan nu duidelijk is.

Een groep van modificaties waar het belang al wel duidelijk is, zijn hele bijzondere, de ubiquitine en de SUMO modificatie. In dit geval gaat het niet om een kleine chemische groep zoals een fosfaat of een methylgroep, maar hier wordt een heel eiwit aan een specifiek aminozuur, lysine, in een ander eiwit gehangen. Het eiwit kan ook zichzelf nog binden op een aantal verschillende plekken, en daardoor lange, al dan niet vertakte, ketens vormen. Zo'n ubiquitine signaal kan verschillende dingen betekenen. Ubiquitine ketens die onderling verbonden zijn door Lysine48 of Lysine29 zorgen ervoor dat het target wordt afgebroken. Aangezien bijvoorbeeld de celdeling geregeld wordt door de tijdelijke aanwezigheid van eiwitten is de precieze en tijdsgebonden afbraak van de betrokken eiwitten essentieel voor een correct verloop van dit proces. De eiwitten die zorgen voor de ophanging van het ubiquitine, de ubiquitine conjugerende eiwitten, zijn hier dus van groot belang, en ze worden zelf dan ook weer geactiveerd door kinases, die fosfaatgroepen aan hen ophangen: een duidelijk staaltje van de eerder genoemde cellulaire bureaucratie. Een enkele ubiquitine aan een eiwit, de mono-ubiquitine, dient daarentegen vaak als signaal dat door andere eiwitten herkend wordt. Zij hebben een domeintje, een stuk eiwit, dat specifiek in staat is een mono-ubiquitine te herkennen, terwijl een ander deel het target eiwit herkent. Pas met ubiquitine is de binding van het target sterk genoeg om een nieuw proces op gang te helpen en ubiquitine functioneert daar dus als een vlaggetje om te zeggen 'hier ben ik' voor het targeteiwit om zo nieuwe processen in de cel te starten.

Het SUMO eiwit, dat sterk op ubiquitine lijkt heeft een andere functie. Samen met Frauke Melchior en Andrea Pichler heeft Puck Knipscheer laten zien dat SUMO de enzymatische functie van een aantal eiwitten kan beïnvloeden¹ (Knipscheer et al, unpublished data). Puck heeft hier mooi structuurwerk aan gedaan, maar in dit geval zegt het plaatje alleen dat het target door binding van SUMO niks verandert: eigenlijk dus dodelijk saai voor de structuurbioloog, we zien wel graag verschillen, maar omdat we in de functie geïnteresseerd zijn toch wel nuttig om te weten. Het gebrek aan structuur maakte namelijk duidelijk dat we verder moesten zoeken en dankzij een combinatie van biochemische experimenten, de lichtverstrooiing en recente plasmon resonantie data is Puck er uiteindelijk in geslaagd om helder te maken hoe die SUMO het eiwit dan wel remt, namelijk door in de weg te zitten bij de binding aan een ander

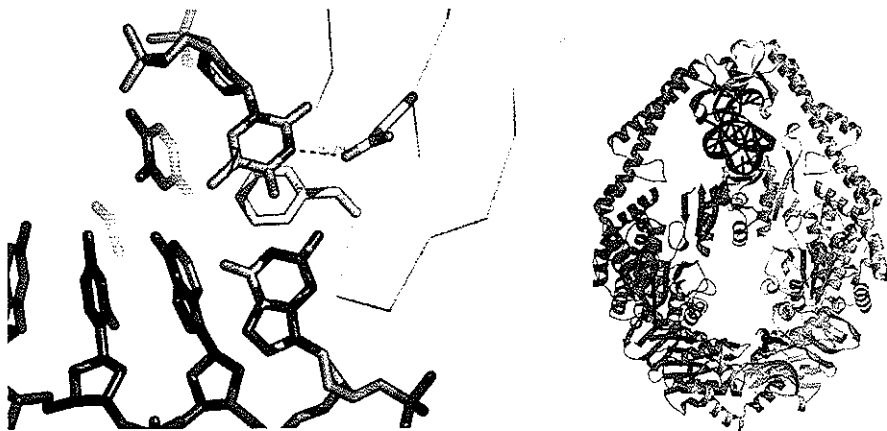
eiwit. Wij denken dat dit een trend is: SUMO werkt vaak doordat het zijn targeteiwit hindert in de functie en zelden als vlaggetje voor een partner.

Om zo'n klein ubiquitine-eiwit op te hangen, te conjugeren, zijn 3 eiwitten nodig, de E1, de E2 en de E3. De E1 activeert, de E2 verzorgt de binding en de E3 helpt om het target te herkennen. Er is maar 1 E1 voor ubiquitine, maar er zijn wel 20 E2s in onze cellen en het aantal E3s is nog onbekend, maar zou wel eens in de honderden kunnen lopen. Veel van deze E3s bestaan zelf uit complexen van meerdere eiwitten. De chemische reactie waarmee de ubiquitine aan zijn targeteiwit wordt geconjugerd verloopt steeds hetzelfde en hoewel SUMO zijn eigen set enzymen kent is de chemische reactie identiek. Wij zijn geïnteresseerd in de specificiteit die bepaalt welk eiwit wordt gemodificeerd en hoe snel, waar en met welk type ketens. Wij proberen te begrijpen hoe dit geregeld wordt door de structuren van de eiwitten te bepalen, individueel, maar vooral als complex. Daarnaast kijken we ook naar de snelheid van de reacties om te begrijpen wat hiervoor belangrijk is.

Dit leidt niet altijd direct tot structuren. Zo is Valerie Notenboom al enige tijd bezig met het Rad6/Rad18 complex, een E2/E3 complex dat betrokken is bij herstel van DNA schade. Het E2 alleen konden we wel kristalliseren, maar hoewel we al veel geleerd hebben over de actieve delen van het complex door de eiwitten in stukken te knippen is de kristallisatie van het geheel nog niet gelukt⁷ (Notenboom et al unpublished). Toch is dit al wel nuttig, omdat we hiermee een serie functionele mutaties konden voorspellen die nu hier in Rotterdam, in het Erasmus MC, door Willy Baarends in samenwerking met Anton Grootegoed en Jan Hoeijmakers getest zullen worden in een cellulair systeem.

We spraken al over de DNA volgorde en het belang daarvan voor de productie van eiwitten. Als er schade aan het DNA ontstaat, kan dit grote gevolgen hebben. Een essentieel eiwit wordt niet gemaakt of een ander eiwit wordt niet afgebroken. Met name tijdens de celdeling is het van belang zulke fouten eerst te verhelpen om te voorkomen dat ze worden vastgelegd in het DNA van de dochtercel. DNA schade wordt daarom zeer precies gerepareerd in processen die strak georkestreerd zijn met de celdeling. Als er fouten zijn in deze processen is er een verhoogd risico op kanker. Dit geldt vooral voor de mismatch reparatie, een proces waar we al een aantal jaren aan werken. Als er bij de celdeling een foute base wordt ingebouwd in het DNA van de dochtercel zorgt dit systeem voor herstel van de schade. De eerste stap is daarbij de herkenning van de fout door een eiwit dat MutS heet. Dit eiwit moet in staat zijn het verschil te zien tussen de correcte paring van twee DNA strengen en de foute.

Onze eiwitstructuur van het MutS eiwit, bepaald door Meindert Lamers en Tassos Perrakis, met hulp van Herrie Winterwerp en Jacqueline Enzlin⁸ maakte duidelijk hoe de herkenning van het DNA plaatsvindt, en welke stukken van het eiwit dit uitvoeren.



Figuur 3 DNA herkenning door het MutS eiwit

Hier ziet u het complex van dit eiwit met DNA (Fig 3). De structuur is dusdanig ingewikkeld dat het moeilijk is om te begrijpen hoe het in elkaar zit, maar Ganesh Natrajan's ingeving dat het lijkt op een paar biddende handen maakt het eenvoudig uit te leggen: de vingertoppen en de duimen houden het DNA vast, terwijl de polsen elkaar raken. In die polsen bevinden zich twee ATPase domeinen, dat wil zeggen, stukken eiwit die een ATP kunnen omzetten tot ADP, een proces waar energie bij vrijkomt. Deze energie levert een signaal dat nodig is voor het reparatieproces.

Hoewel wij naar het eiwit uit de bacterie *Escherichia coli* kijken is het eiwit dusdanig goed geconserveerd in de evolutie dat we in staat waren het met het menselijk eiwit te vergelijken. Zo konden we de mutaties die gevonden zijn in families met een verhoogde kans op erfelijke darmkanker plaatsen in onze eiwitstructuur. Hiermee kunnen we beter inzicht krijgen in de functie: het valt bijvoorbeeld op dat de mutaties zich over het hele eiwit verspreiden, en dat dus alle delen van het eiwit voor de functie van belang zijn. Anderszijds komt het regelmatig voor dat onze moleculair patholoog komt informeren waar een nieuwe mutatie, die hij vindt in een familie met darmkanker, zich in het eiwit bevindt. Dit kan helpen om een familie een indicatie te geven over de aard van de mutatie die zij bij zich dragen, al is een functioneel experiment noodzakelijk om hier definitief uitsluitel te geven.

In de afgelopen jaren heeft ons onderzoek zich geconcentreerd op de herkenning van het DNA en het effect op de reparatie. In een samenwerking met de groep van Niels

de Wind in Leiden zijn we bezig geweest de timing en volgorde van de communicatie tussen DNA herkenning en ATP signaal te begrijpen^{3,9}. Joyce Lebbink, Ganesh Natrajan, en Alex Fisch voerden een combinatie van biochemische experimenten, structuurbepalingen van mutanten en de al genoemde plasmon resonantie proeven uit, waarin ze lieten zien hoe de uitlezing van de fout in het DNA wordt gekoppeld aan een structuurverandering van het eiwit nadat het ATP gebonden heeft. Mutaties in het aminozuur die het DNA uitleest blijken een defect te hebben in deze ATP-afhankelijke structuurverandering. Hier gaat het om een overdracht van een signaal over een grote afstand, binnen het MutS eiwit. Deze dynamische structuurverandering is nodig om de volgende stap in het herstelproces op te starten en natuurlijk willen we hier nu meer van begrijpen. Zoals hier in Rotterdam op verschillende nivo's prachtig werk wordt verricht aan het zichtbaar maken van het DNA schadeherstel in de cel, zo zoomen wij verder in en proberen soortgelijke processen te zien in groter detail.

DNA is het patroon van ons leven, daarin ligt vast welke eiwitten we maken. In de cel is DNA echter ingepakt in nucleosomen die samenpakken tot chromatine. In de nucleosomen zit het DNA opgerold rond een serie zogenaamde histoneiwitten. De bereikbaarheid van een stuk DNA voor vertaling tot een eiwit is strak geregeld door een samenspel van externe signalen en interne regulatie. Al deze signalen en hoe er op gereageerd wordt is dan ook nog afhankelijk van het celtype, de historie en de omgeving. In verschillende van onze projecten komen we uit bij deze 'chromatine regulatie' en dit geldt voor veel andere onderzoekers. Hoe wordt dit ompakken van het chromatine nou geregeld? Er zijn grote motorcomplexen bij betrokken, de remodellers, ATPases die nodig zijn om het DNA in- en uit te pakken, het onderwerp van het onderzoek van Peter Verrijzer hier in het Erasmus MC. Kort geleden is Alex Faesen aan een nieuw project begonnen om deze remodellers op atomair nivo te bekijken. Erg uitdagend omdat het om grote complexen gaat, die dynamisch gereguleerd worden, maar ook omdat het een Europese samenwerking betreft waarbij de mogelijkheid geboden wordt om ook met elektronenmicroscopie naar grotere en niet kristalliseerbare complexen te kijken. De combinatie van onze atomaire structuren met de minder gedetailleerde gegevens uit de elektronenmicroscopie is erg aantrekkelijk, omdat je dan ook naar complexen kunt kijken die te instabiel zijn om te kristalliseren.

Juist bij de chromatine remodelling zijn grote complexen van eiwitten betrokken die zorgen voor het aan- en uitzetten van een serie verschillende signalen op de histoneiwitten die het DNA inpakken. Alle signalen die ik eerder noemde zijn hier van belang, zoals de fosforylering, de acetylering en de methylering, maar ook de ubiquitineren en sumoylering lijken een belangrijke rol te spelen. Het onderzoek van de timing en functie van al deze signalen is de grote uitdaging in de moleculaire biologie voor de komende jaren omdat het inpakken van het DNA tot chromatine aan de basis staat van veel belangrijke processen: de vermenigvuldiging van het DNA bij de

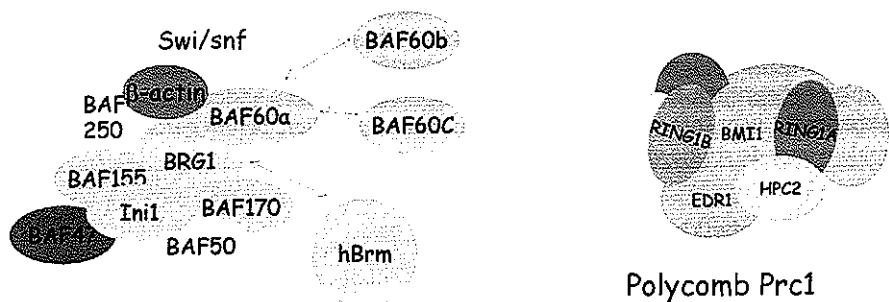
celdeling, het DNA schadeherstel maar vooral het besluit om een eiwit te gaan maken dat begint met de transcriptie, het aflezen van het DNA, een proces dat de respons op allerlei signalen van buitenaf reguleert.

Transcriptie van het DNA is een ongelooflijk complex proces dat op veel niveau's gereguleerd wordt. Eén daarvan is de repressie door de polycombcomplexen, een proces dat bestudeerd wordt door de groepen van Peter Verrijzer hier in Rotterdam en Maarten van Lohuizen in het NKI. De polycombcomplexen zorgen voor de repressie van de transcriptie van bepaalde eiwitten, dat wil zeggen dat zij voorkomen dat andere eiwitten geproduceerd worden. Dat is van belang bij de embryonale ontwikkeling maar ook voor bijvoorbeeld de ontwikkeling van kanker. Muizen die het Bmi eiwit missen, één van de componenten van het polycomb complex, krijgen snel kanker en zelfs de dosis is belangrijk: als ze minder van dit eiwit hebben zijn ze gevoeliger voor het krijgen van kanker. Daarnaast is gebleken dat Bmi essentieel is om een cel een stamcelkarakter te geven. Vanwege de grote hoop dat met stamcellen ziektes kunnen worden genezen kunt u begrijpen dat dit eiwit momenteel zeer in de belangstelling staat.

Vorig jaar werd bekend dat een ander eiwit uit het polycombcomplex, het Ring1b functioneert doordat het een ubiquitine hangt aan een van de histon eiwitten, het Histon2A en zo waarschijnlijk als E3 voor ubiquitine betrokken is bij de chromatine regulatie. Gretel Buchwald heeft de kristalstructuur bepaald van een deel van Ring1b met Bmi en laten zien dat dit deel voldoende is voor de ubiquitine conjugatie aan het Histon2A eiwit (Buchwald et al, in voorbereiding). Ook kon zij laten zien dat het Bmi het Ring1b stimuleert in zijn activiteit en dat de complexvorming essentieel is voor deze reactie. Uit de structuur konden we zien dat het Ring1b eiwit als het ware een arm om het Bmi eiwit slaat en door mutaties kon Gretel laten zien dat deze arm zorgt voor de complexvorming. In de toekomst willen we graag weten hoe het hele complex van polycomb-eiwitten eruit ziet en hoe deze complexvorming geregeld wordt.

Het lijkt er op dat in verschillende cellen verschillende subcomplexen aanwezig zijn, die op verschillende manieren gereguleerd worden (Fig. 4). Wij proberen te begrijpen hoe die complexen zijn opgebouwd en wat de samenstelling beïnvloedt.

Het belang van grote en dynamische eiwitcomplexen wordt langzamerhand steeds duidelijker. Eiwit-eiwit complexen blijken op allerlei niveau's in de cel een rol te spelen en vormen daar complexe machines van multi-enzymcomplexen. De samenstelling en het assemblageproces van deze machinerie worden precies geregeld in plaats en tijd en we staan nog maar aan de basis van veel van het begrip van dergelijke processen. Hier ligt een van de grote uitdagingen voor de structuurbiologie van de komende jaren. U begrijpt dat wij slechts enkele voorbeelden van deze complexen kunnen bestuderen, geleid door intrinsieke belangstelling, samenwerking met collega's en het



Figuur 4 Grote complexen zijn essentieel in de regulatie van chromatine

belang van de eiwitten. Ons soort werk levert een bijdrage aan het begrip van deze complexvorming, aan de rol en oriëntatie van elk van de componenten en het inzicht in de stabiliteit en de verhoudingen tussen de eiwitten in grotere complexen. Door de processen in isolatie te bestuderen en dan in grotere complexen leggen we een basis voor het begrip van diezelfde processen in de cel.

Daarbij is het belangrijk dat dezelfde processen dan ook op hoger niveau bestudeerd worden. Dit is een van de aspecten die het uitvoeren van relatief basaal onderzoek binnen het Nederlands Kanker Instituut zo mooi maken, het is ook een van de redenen waarom het prettig is een brug te slaan naar het onderzoek hier in Rotterdam, waar veel studies op een ander niveau plaatsvinden. Ik hoop dat het mogelijk wordt dat wij de kristalstructuur van een complex bepalen en de dynamiek van de complexvorming buiten de cel bekijken, maar dat het vervolgens mogelijk is om in een levende cel te kijken wat er met het complex gebeurt, mogelijk met mutaties die zijn gebaseerd op de kennis van de atomaire structuur. Samenwerkingen die gebruik maken van de spectaculaire imaging technieken van bijv. Houtsmuller en Vermeulen, het vermogen grote intrinsieke complexen te karakteriseren van Grosveld, de structuur inzichten die met AFM verkregen worden door Wyman en Kanaar, de inzicht in het DNA schadeherstel van Hoeijmakers en collega's, de muizenmodellen van Fodde en Oosterhuis. Hier is de uitdaging voor ons om vanuit de atomaire kennis die onze structuren opleveren terug te denken naar de complexe processen in een cel of organisme, anderzijds voor de celbiologen en moleculair biologen om vanuit een complex fenotype terug te komen naar een experiment op eiwitniveau. Dit is waar ik op hoop: om te gaan van atoom tot organisme, van mutatie tot ziekte, van structuur naar functie.

In de strijd tegen kanker proberen we te begrijpen wat er mis gaat in de cel. Zoals u begrijpt zijn veel van onze structuur/functie experimenten ver van klinische toepassing verwijderd. Toch is het ook belangrijk om de basis van het ontstaan van kanker te begrijpen. Het begrip van basale mechanismen kan anderen helpen het juiste experiment voor interventie te doen, of in andere gevallen, betere gereedschappen te maken voor de studie van kanker.

Medicijnen ontwikkelen

Maar structuren hebben ook een andere functie: ze geven aan hoe de atomaire interactie van de eiwitten is met kleine chemische moleculen die mogelijk als medicijn kunnen dienen. Ze leggen uit welke interacties voor de binding van belang zijn en waar de kleine moleculen veranderd kunnen worden om tot een betere binding of een meer medicijnachtig gedrag te komen. De moleculaire medicijnen, ontwikkeld tegen subtypes van eiwitten bieden belangrijke perspectieven, maar het is niet eenvoudig: de functie van de eiwitten moet van belang zijn voor de kankerontwikkeling en bij uitschakeling moet de tumor liefst verdwijnen. In het Nederlands Kanker Instituut werken mijn collega's aan het identificeren van eiwitten die noodzakelijk zijn voor het ontstaan of uitgroeien van kanker. Andere collega's kunnen in muizenmodellen testen of de functie van deze eiwitten essentieel is voor het kankerproces. Met biochemische proeven kunnen wij en anderen binding van kleine moleculen aan het eiwit testen en met structuurbepaling kunnen we bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe medicijnen. Weer andere collega's werken aan de formulering van de medicijnen, de tests op afbraak en de diverse klinische testen op patiënten. Momenteel onderzoeken we of het mogelijk is deze kennis binnen het NKI te gaan bundelen en zo gezamenlijk te proberen de ontwikkeling van specifieke antikanker middelen explicieter te stimuleren. Dit zou dan gebeuren in samenwerking met Organon of met andere industriële partners. Een nieuwe ontwikkeling voor ons, waarbij wij hopen met onze korte lijnen en vernieuwend onderzoek direct te kunnen bijdragen aan het vinden van nieuwe geneesmiddelen tegen kanker.

Als groep krijgen we hier al enige ervaring mee. In samenwerking met Guus Smit en zijn groep op de VU werken we al geruime tijd aan een eiwit dat lijkt op de nicotine receptor in spieren en de hersenen. De eerste structuur, bepaald door Katjusa Brejc¹⁰ en de structuren van complexen door Patrick Celie en Chris Ulens worden alom gebruikt¹⁶. Dit modeleiwit levert nog steeds de enige gedetailleerde structuren van een belangrijke klasse van hersenreceptoren, waar veel medicijnontwikkeling aan gebeurt. De volledige receptor vormt een ionenkanaal in het zenuwstelsel, waardoor een elektrisch stroompje opgewekt kan worden in antwoord op binding van een neurotransmitter. Medicijnen tegen deze klasse van eiwitten hebben dan ook allerlei toepassingen: als spierverslapper bij operaties, als hulpmiddel bij de bestrijding van angst of pijn, als positieve beïnvloeding van gemoedstoestand, hulp bij sommige vormen van epilepsie

en ziekte van Alzheimer. Ons model eiwit komt uit een slak¹¹ en het heeft alleen het deel dat bindt aan de neurotransmitters; het mist het transmembraandeel, het echte ionenkanaal. Dat maakt dat we er makkelijker mee kunnen werken, maar het lijkt zoveel op de hersenreceptoren dat het algemeen aanvaard is als model. Omdat dit ook



Figuur 5 Nicotine gebonden aan AChBP, model voor de nicotine receptor

de eiwitten zijn die zorgen voor nicotineverslaving, waren we erg blij toen we konden zien hoe nicotine aan dit eiwit bindt.

We kijken dan naar de precieze contacten van het nicotine molecuul aan het eiwit (Fig 5). Het nicotine maakt een paar korte contacten, waterstofbruggen, en wordt helemaal ingepakt in de eiwitomgeving. Met deze gedetailleerde kennis is het mogelijk om voorspellingen te doen voor nieuwe interacties.

In samenwerking met de groep van Rob Leurs en Iwan de Esch zijn we nu ook bezig met directe voorspelling van binding van kleine stoffen met behulp van een computerprogramma. De eerste structuurbepaling van een complex met een 'lead-compound', in dit geval gevonden in zo'n in-silico-screen, heeft vorige maand plaatsgevonden. Een andere groep van eiwitten waar we verwachten dat de kristalstructuren behulpzaam zullen zijn voor medicijndontwerp zijn de ubiquitine proteases, de 'de-ubiquitinating enzymes' of DUBs¹². Zoals ik u eerder heb uitgelegd is de regulatie van allerlei processen in de cel afhankelijk van de conjugatie met ubiquitine. Dergelijke regulatie is ook afhankelijk van het weer weghalen van het ubiquitine en de DUBS zijn hiervoor nodig: ze halen ubiquitine weer van andere eiwitten af en regelen zo allerlei functies in de cel, alleen is het nog lang niet duidelijk welke DUB wanneer gebruikt wordt, maar het is wel duidelijk dat hier allerhande essentiële paden in de cel geregeld worden, zodat ze als klasse van eiwitten een interessante groep zijn om medicijnen tegen te ontwerpen. In de groepen van met name Rene Bernards in het NKI, maar ook bijvoorbeeld in de groep van Peter Verrijzer hier in Rotterdam, wordt naar de functie van deze processen gekeken. Ondertussen probeert Mark Vargas in mijn groep de eiwitstructuren van DUBs te bepalen en de protease-activiteit te karakteriseren. Daarmee zullen elders in het instituut Dave Egan en Huib Ovaa experimenten op zetten om snel en efficiënt binding van nieuwe stoffen te testen zodat we met zijn allen dit pad goed kunnen analyseren. We verwachten zo in de komende jaren meer duidelijkheid te krijgen over de structuur en functie van deze eiwitten, maar ook een basis te leggen voor nieuwe medicijnen die deze klasse van eiwitten aanpakken.

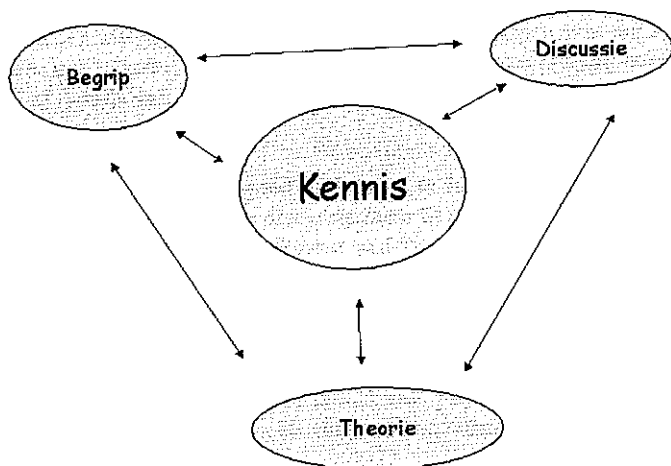
Organisatorisch

Hiermee heb ik u een overzicht gegeven van het onderzoek wat wij doen en willen doen. Maar om dit onderzoek te kunnen uitvoeren hebben we geld nodig. De start van mijn groep werd mogelijk gemaakt door een belangrijke financiële bijdrage van de Josephine Nefkensstichting en ik ben hen, en Piet Borst diep dankbaar voor het in mij gestelde vertrouwen. Ook nu nog zijn wij blij met de middelen die we krijgen voor het onderzoek, van overheidswege, uit stichtingen zoals de Nederlands Kankerbestrijding en uit samenwerkingen met industrie. Een duidelijke bron van inkomsten waar we alleen toegang toe hebben zolang we kwaliteit leveren en zo hoort het ook. Echter, heldere structuren zijn noodzakelijk bij het verstrekken van fondsen waar ze nuttig zijn: achterkamertjespolitiek moet zoveel mogelijk vermeden worden. Ik ben blij dat het in Nederland tot dusver niet nodig leek om via recepties geld binnen te halen. Om dat in stand te houden is een financieringsbeleid waar onderzoekers op kunnen bouwen en een eigen langetermijnvisie in kwijt kunnen van groot belang. In het huidige beleid van gerichte programma's wordt dit steeds moeilijker. De opgelegde structuur is meestal slechts kort tevoren bekend en verwordt derhalve toch eigenlijk steeds tot een korte termijn visie. Door het oerwoud van gerichte programma's wordt het

vrijwel onmogelijk voor de individuele onderzoeker om een eigen onderzoekslijn op te bouwen. Een heldere open competitie dient de basis te zijn van onze wetenschappelijke financiering.

Een duidelijk voorbeeld van het gebrek aan lange termijn visie is het uitblijvende vervolg voor de Veni, Vidi, Vici constructie. Dit is een mooie constructie waar een serie persoonsgebonden beurzen met toenemende kwaliteitseisen de jonge onderzoekers op weg helpt. Er heerst veel onrust onder hen tengevolge van de onduidelijkheid over het vervolg van dit programma. Ik hoop van harte dat NWO, KNAW en ministeries hier een vervolg aan weten te geven, om een heldere carrièrestructuur te bieden aan een nieuwe generatie. Dergelijke open competities en duidelijke carrièrepaden waarin alleen de wetenschappelijke kwaliteit gemeten wordt en niet het tijdelijk passen binnen het keurslijf van een ad-hoc beleidsgedachte zijn essentieel voor onze toekomstige slagkracht. Wetenschap is in veel gevallen niet iets wat in 2 of 4 jaar voor elkaar komt, daar zitten lange lijnen van ervaring en kennis onder. Een heldere structuur voor de toekenning van middelen is essentieel om de functionaliteit te behouden.

Een ander probleem met onze toekomstige onderzoekers is breder geworteld in de samenleving. Ik zelf ben al opgegroeid aan het begin van de generaties waar kennis niet meer belangrijk gevonden werd. Begrip daar ging het om, maar die kennis zoeken ze wel op. Ik ben het daar niet mee eens (Fig 6). Parate kennis geeft structuur aan



Figuur 6 Kennis is essentieel voor de kenniseconomie

gedachten en gesprekken. We kunnen alles opzoeken op het internet maar in een gesprek is dat te traag en 's nachts in bed, 's ochtends onder de douche en 's avonds op de fiets zoekt het lastig op en is het vervolgens lastig om een theorie uit te werken. Het gesprek stopt en de ontwikkeling van de gedachten blijft steken. In ons sabbatical vorig jaar maakten we een jaar lagere school in Amerika mee en het was indrukwekkend om te zien hoeveel meer kennis er in een jaar kan worden aangeboden en verwerkt en hoeveel meer vaardigheden gedoceerd kunnen worden in datzelfde jaar dan in Nederland. In het NKI hebben veel van de studenten te weinig kennis paraat om de colleges te kunnen volgen. Docenten op de tweedefase opleidingen hoeven slechts te weten hoe ze les geven, maar niets over het vak waarin. Op deze wijze gaat onze 'kenniseconomie' straks steunen op een gatenkaas van begrip waar we alleen niet meer weten wat we moeten begrijpen. Hoewel het tij begint te keren en pure kennis een herwaardering lijkt te ondergaan, denk ik dat dit krachtig moet worden doorgezet op alle niveaus: begrijpen wat je leert is belangrijk, we hoeven niet terug naar domme rijtjes, maar echte kennis mag en moet wel degelijk getoetst worden. Dit is van belang voor onze samenleving als geheel, maar ook noodzakelijk voor de aanwas van nieuwe onderzoekers en het voortbestaan van de 'kenniseconomie'.

Dankwoord

Onderzoek doen in het Nederlands Kanker Instituut is heel bijzonder: korte lijnen, platte structuur en een concentratie op de inhoud. Structuur alleen waar die functioneel is, communicatie als basisidee. Veel interactie, vooral op inhoud gericht. Snel reageren en aandacht voor elkaars werk als standaard en minimum, kritisch maar wel samen. Geen slangenkuil, maar wel een omgeving waar je een stapje meer doet, vanwege de basale aanname dat kwaliteit belangrijk is, een verplichting haast, aan onszelf, aan de patiënten met kanker en aan de kwartjes in de collectebus die het onderzoek financieren. Samenwerken met Rotterdam is ook bijzonder: datzelfde enthousiasme is zichtbaar in het werk, het niveau is wereldklasse en de aanpak plezierig pragmatisch en to-the-point: niet te veel geleuter, lekker aan het werk.

Ik ben het Erasmus MC en het Nederlands Kanker Instituut dankbaar voor de instelling van deze leerstoel en met name Jan Hoeijmakers en Ton Berns voor al het werk dat daarbij kwam kijken.

Dit soort onderzoek gebeurt altijd in een team: ik prijs me gelukkig met een plezierige groep die het onderzoek voor zijn eigen lol doet. Die maakte dat ik vorig jaar met een gerust hart op sabbatical kon, maar ook, dat het heerlijk was om in juli weer terug te komen. Ik kan goed delegeren, maar dat lukt alleen als er mensen zijn aan wie je kunt delegeren, of het nu gaat om synchrotronbezoek of andere proeven, om organisatorische taken of onderwijs. De hele groep werkt daaraan mee, maar de basis daarvan vormen Pim en Herrie, commentaar leverend als de oude mannetjes van de muppetshow, maar verder betrouwbaar en plezierig, hun enthousiasme voor het onderzoek zelf, is een belangrijke basis voor het succes van ons werk en de sfeer in de groep. Maar de bereidheid van de hele groep om elkaar te helpen, met mij een artikel te reviewen voor een tijdschrift, een gezamenlijke discussie aan te gaan over de inhoud, achtergrond of details van het onderzoek zijn essentieel, voor de voortgang maar ook voor het plezier in onderzoek.

Die discussie is belangrijk om goed te denken. Ik heb natuurlijk het voorrecht om een deel van de wetenschappelijke discussie thuis te kunnen voeren, maar mijn groep heeft daar weinig aan. Met de terugkomst van Tassos Perrakis naar het NKI hebben we die discussie versterkt. Zoals ik bij zijn inhuizing al aankondigde en sindsdien regelmatig heb mogen herhalen: never a quiet moment. Maar zolang die discussie over argumenten gaat houdt het ons op de tenen, scherpt het procedures aan. Onze onderzoekslijnen zijn complementair en dat is nuttig, voor ons, maar ook voor het instituut. We vullen elkaar aan en het is met veel plezier dat we samen, maar ieder apart, nieuwe richtingen uitslaan in EU verband of daarbuiten.

Lang geleden, tijdens onze studie hebben een vriendin en ik ons regelmatig publiekelijk afgevraagd wat nou de lol van scheikunde was. We kregen daar de gekste

antwoorden op, maar onze eigen conclusie was dat het leuk is, maar alleen als je er echt voor kunt gaan. Dat geldt nu nog steeds en gelukkig ook voor mijn groep en instituut. Maar ook als je veel tijd in zo'n enthousiasme steekt zijn vrienden en familie belangrijk om je een volledig mens te maken en te houden: kinderen om leuke dingen mee te doen, vrienden en vriendinnen om tegenaan te praten, familie voor de gezelligheid en ouders voor al het bovenstaande, maar vooral voor hun onvoorwaardelijke interesse.

Al is het niet in rechte lijn, in mijn familie ben ik de 4e generatie hoogleraar en daar ben ik reuze trots op. Mijn overgrootvader was hoogleraar paleontologie, mijn grootvader hoogleraar geologie en mijn vader was hoogleraar in de hematologie. Maar de vrouw van die eerste hoogleraar, mijn overgrootmoeder, was de eerste vrouw die in Utrecht promoveerde. Zij trouwde en ging voor man en kinderen zorgen. Haar schoondochter, mijn oma was enthousiast veldbiologe. Zij trouwde de tweede generatie hoogleraar en vertrok naar 'Nederlands Indië' waar zij nog een enkel artikel publiceerde voordat zij kinderen kreeg. Haar dochter, mijn moeder kreeg mij en stopte met haar studie Nederlands, om pas nu, na haar pensioen, aan eigen onderzoek toe te komen. Daarom wil ik iedereen bedanken die het mogelijk gemaakt heeft dat ik hier nu wel sta. In het algemene, al diegenen die gevochten hebben om de positie van vrouwen in de maatschappij te veranderen. Maar vooral in het persoonlijke, zij die het mogelijk hebben gemaakt en zij die de morele steun gaven, de overtuiging dat kinderen en serieus werk wel samen kunnen gaan. De Nederlandse cultuur maakt het ons nu eenmaal niet makkelijk: ik heb het zelf ervaren, ik zie het bij mijn postdocs en collega's. Maar dat was natuurlijk echt onmogelijk zonder de steun thuis: van mijn moeder, mijn vader en Elly, maar vooral van Piet die altijd alles met mij gedeeld heeft en van die kinderen zelf, Elske en Oane die mij zo oneindig veel plezier geven.

Ik heb gezegd.

Referenties

- ¹ Pichler A, Knipscheer P, Oberhofer E, van Dijk WJ, Korner R, Olsen JV, Jentsch S, Melchior F, Sixma TK. SUMO modification of the ubiquitin-conjugating enzyme E2-25K. *Nat Struct Mol Biol* 2005;12 (3):264-9.
- ² Pichler A, Knipscheer P, Saitoh H, Sixma TK, Melchior F. The RanBP2 SUMO E3 ligase is neither HECT- nor RING-type. *Nat Struct Mol Biol* 2004;11 (10):984-91.
- ³ Lebbink JH, Georgijevic D, Natrajan G, Fish A, Winterwerp HH, Sixma TK, de Wind N. Dual role of MutS glutamate 38 in DNA mismatch discrimination and in the authorization of repair. *Embo J* 2006;25(2):409-19.
- ⁴ Celie PH, van Rossum-Fikkert SE, van Dijk WJ, Brejc K, Smit AB, Sixma TK. Nicotine and carbamylcholine binding to nicotinic acetylcholine receptors as studied in AChBP crystal structures. *Neuron* 2004;41 (6):907-14.
- ⁵ Celie PH, Klaassen RV, van Rossum-Fikkert SE, van Elk R, van Nierop P, Smit AB, Sixma TK. Crystal structure of acetylcholine-binding protein from *Bulinus truncatus* reveals the conserved structural scaffold and sites of variation in nicotinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem* 2005;280 (28):26457-66.
- ⁶ Celie PH, Kasheverov IE, Mordvintsev DY, Hogg RC, van Nierop P, van Elk R, van Rossum-Fikkert SE, Zhmak MN, Bertrand D, Tsetlin V, Sixma TK, Smit AB. Crystal structure of nicotinic acetylcholine receptor homolog AChBP in complex with an alpha-conotoxin PnIA variant. *Nat Struct Mol Biol* 2005;12 (7):582-8.
- ⁷ Back JW, Notenboom V, de Koning LJ, Muijsers AO, Sixma TK, de Koster CG, de Jong L. Identification of cross-linked peptides for protein interaction studies using mass spectrometry and 18O labeling. *Anal Chem* 2002;74 (17):4417-22.
- ⁸ Lamers MH, Perrakis A, Enzlin JH, Winterwerp HH, de Wind N, Sixma TK. The crystal structure of DNA mismatch repair protein MutS binding to a G x T mismatch. *Nature* 2000;407 (6805):711-7.
- ⁹ Natrajan G, Lamers MH, Enzlin JH, Winterwerp HH, Perrakis A, Sixma TK. Structures of *Escherichia coli* DNA mismatch repair enzyme MutS in complex with different mismatches: a common recognition mode for diverse substrates. *Nucleic Acids Res* 2003;31 (16):4814-21.
- ¹⁰ Brejc K, van Dijk WJ, Klaassen RV, Schuurmans M, van Der Oost J, Smit AB, Sixma TK. Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature* 2001;411 (6835):269-76.
- ¹¹ Smit AB, Syed NI, Schaap D, van Minnen J, Klumperman J, Kits KS, Lodder H, van der Schors RC, van Elk R, Sorgedrager B, Brejc K, Sixma TK, Geraerts WP. A glia-derived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission. *Nature* 2001;411 (6835):261-8.
- ¹² Nijman SM, Luna-Vargas MP, Velds A, Brummelkamp TR, Dirac AM, Sixma TK, Bernards R. A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell* 2005;123 (5):773-86.

*Deze publicatie betreft een oratie aan
de Erasmus Universiteit Rotterdam*

ISBN 90-77906-14-2

