

University of Groningen

Kinetic analysis and protein engineering of halohydrin dehalogenase

Tang, Lixia

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:

2004

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

Citation for published version (APA):

Tang, L. (2004). *Kinetic analysis and protein engineering of halohydrin dehalogenase*. 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).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

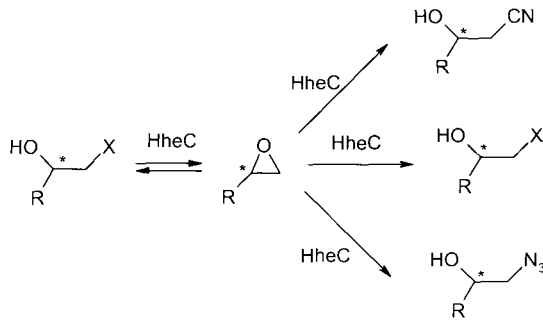
Take-down policy

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.

Samenvatting

Dit proefschrift beschrijft de resultaten van een kinetisch en mechanistisch onderzoek aan het haloalcohol dehalogenase van de bacterie *Agrobacterium radiobacter* AD1. Dit enzym, kortweg HheC genaamd, is betrokken bij de afbraak van epichloorhydrine en 1,3-dichloro-2-propanol. HheC katalyseert afsplitsing van chloor of broom van haloalcoholen door middel van een intramoleculaire nucleofiele substitutie reactie, waarbij een epoxide wordt gevormd en een halide ion vrijkomt (Fig. 1). Het enzym is ook in staat de omgekeerde reactie te katalyseren: de ring-opening van een epoxide door een nucleofiele verbinding. Geschikte nucleofielen zijn diverse anionen, zoals chloride, bromide, cyanide en azide. HheC kan zowel vorming als de ring-opening van een epoxide enantioselectief katalyseren, waardoor het enzym geschikt is voor de synthese van waardevolle verbindingen, zoals optisch zuivere halohydrines, epoxides en diolen.



Figuur 1. Schema van reacties die door HheC gekatalyseerd worden. X: halide, uitgezonderd fluoride.

Voor een beter begrip van het katalytisch mechanisme van HheC en om het enzym effectief te kunnen gebruiken voor biokatalytische doeleinden, is kennis over het kinetische gedrag van HheC nodig. Het onderzoek dat is beschreven in dit proefschrift had daarom als doel om het kinetisch mechanisme van HheC op te helderen en meer inzicht te krijgen in het katalytisch mechanisme. Tevens is getracht om het enzym zodanig te modificeren dat het verbeterde eigenschappen bezit, waarbij gebruik gemaakt is van de recentelijk opgehelderde kristalstructuur van HheC.

Teneinde voldoende enzym voor deze studies beschikbaar te krijgen, is het *hheC* gen uit *A. radiobacter* AD1 gekloneerd in de pGEF+ expressievector en getransformeerd in *E. coli* BL21(DE3)

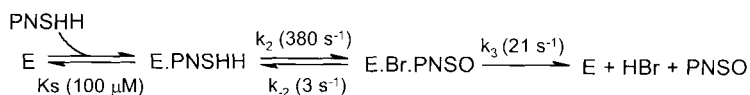
(Hoofdstuk 1). Dit expressiesysteem resulteerde in zeer goede productie van actief HhcC. Biochemische karakterisering van het gezuiverde eiwit toonde aan dat het enzym in oplossing aanwezig is als een homotetrameer met een molecuulmassa van 112 kDa. Iedere subunit bestaat uit 254 aminozuren. Er werd ook gevonden dat HhcC gevoelig is voor oxidatieve inactivatie (Hoofdstuk 3). Deze inactivatie gaat gepaard met de vorming van intramoleculaire disulfidebruggen en dissociatie tot monomeren. Door Cys30 te vervangen door een alanine of Cys153 door een serine bleek het mogelijk om dit inactivatie-proces sterk af te remmen. Het inactiveren van HhcC kan ook worden tegengegaan door het toevoegen van glycerol en β -mercaptoethanol. Deze resultaten duiden erop dat de oxidatie van cysteines een belangrijke rol speelt bij de inactivering van HhcC.

Op basis van de aminozuursequentie maakt HhcC deel uit van de 'short-chain dehydrogenase/reductase' (SDR) enzymfamilie (Hoofdstuk 1). Hoewel de aminozuursequentie van HhcC slechts 20-25% identiek is aan die van enkele SDR enzymen, komen het katalytisch mechanisme en de kristalstructuur opvallend overeen. Evenals SDR enzymen katalyseert HhcC de dehalogenering van *vicinale* haloalcoholen middels een 'general base' mechanisme. Tyr145 fungeert als base waarbij het wordt geassisteerd door Ser132 en Arg149. Naast dit drietal aminozuren is er op basis van de kristalstructuur en op grond van de eigenschappen van gemuteerde enzymen nog een vierde katalytisch actief aminozuur aan te wijzen: Asp80 (Hoofdstuk 8). Dit aminozuur speelt een cruciale rol bij het verwijderen van het proton dat vrijkomt tijdens omzetting van een haloalcohol in een epoxide.

Fluorescentie studies aan HhcC hebben onthuld dat binding van halide resulteert in een significante verhoging van de intrinsieke tryptofaan-fluorescentie van het eiwit (Hoofdstuk 4). Per subunit bevat HhcC vier tryptofaan aminozuren, die het enzym zijn fluorescerende eigenschappen geven. Bestudering van verschillende HhcC mutanten waarvan telkens een tryptofaan vervangen is, toonde aan dat het normale vrije enzym een onverwacht lage fluorescentie heeft. Dit wordt veroorzaakt doordat de fluorescentie van Trp139 grotendeels is onderdrukt en doordat dit zelfde aminozuur tevens de energie van naburige aangeslagen tryptofanen kan opnemen, en zodoende ook hun fluorescentie kan onderdrukken ('quenchen'). Analyse van de kristalstructuur suggereerde dat Trp249 waarschijnlijk het belangrijkste aminozuur is waarvan de fluorescentie wordt onderdrukt, aangezien dit aminozuur van der Waals interactie heeft met Trp139. Het opheffen van de tryptofaan-fluorescentie quenching kon, behalve door binding van een halide ion, ook bereikt worden door de pH te verlagen. Op grond van de pH afhankelijkheid werd gesuggereerd dat één of meerdere histidines betrokken zijn bij de quenching van fluorescentie. Ongeacht wat het

mechanisme van de quenching van tryptofaan-fluorescentie precies is, biedt het feit dat de fluorescentie van het eiwit sterk afhangt van de mate waarin halide gebonden is, een uitstekende handvat voor het bestuderen van de kinetische eigenschappen van HheC.

Mede door gebruik te maken van het hierboven beschreven fluorescentie-gedrag, is het kinetisch mechanisme van HheC ontrafeld met betrekking tot de omzetting van de twee enantiomeren van *p*-nitro-2-bromo-1-phenylethanol (PNSHH) naar *p*-nitrostyreen epoxide en bromide (Hoofdstuk 5). De omzetting van beide enantiomeren volgt een zogenaamd geordend Uni Bi mechanisme waarbij het bromide als eerste product het enzym verlaat gevolgd door het epoxide. Resultaten van pre-steady state kinetische studies gaven aan dat de omzetting van (*R*)-PNSHH beschreven kan worden als een drie-staps proces: na substraat-binding volgt er een snelle dehalogenering waarna de producten langzaam vrijkomen van het enzym (Fig. 2). Het bleek dat niet het epoxide maar het bromide relatief langzaam het enzym verlaat en dat deze stap de snelheid van substraatomzetting bepaalt. Ook voor de omzetting van de (*S*)-enantiomeer is gevonden dat een drie-staps kinetisch mechanisme de metingen het best kan verklaren. In dit geval is echter, vergeleken met de andere enantiomeer, de binding van het substraat minder hecht en is de snelheid van dehalogenering de traagste stap tijdens katalyse. Deze verschillen in kinetisch gedrag verklaren de uitzonderlijk hoge enantioselectiviteit van HheC voor PNSHH.



Figuur 2. Drie-staps mechanisme van dehalogenering van (*R*)-PNSHH door HheC.

Op basis van de kristalstructuur van HheC zijn er verschillende gemuteerde enzymen gemaakt met als primair doel het katalytisch mechanisme van HheC beter te begrijpen. Zo werden er mutanten bestudeerd waarbij telkens één van de aminozuren Asn176, Tyr187 of Trp249 werd vervangen (Hoofdstuk 6). Uit de structuur van HheC bleek dat deze aminozuren onderdeel uitmaken van de halide-bindingsplaats. Het verbreken van de waterstofbrug tussen Asn176 en Tyr187 of tussen Tyr187 en Trp249 leidde tot een betere katalytische efficiëntie van HheC voor conversie van (*R*)-PNSHH. Een verklaring voor deze verbetering van enzymactiviteit volgde uit een kinetische analyse. De mutaties bleken ervoor te zorgen dat het gevormde halide sneller het enzym kan verlaten. Uit een gedetailleerde analyse van het kinetische proces van halide-binding bleek verder dat de snelheid van vrijkomen van het halide afhankelijk is van een conformatie-verandering in het eiwit. De snelheid van deze isomerisatie bepaalt voor zowel het wild-type enzym als voor de

bovengenoemde mutanten de snelheid van het loslaten van het halide en daarmee de snelheid van katalyse. De gemuteerde enzymen zijn blijikbaar in staat tot efficiëntere katalyse door een versnelde conformatie-verandering, die mogelijk is door het ontbreken van de stabiliserende waterstofbruggen.

De eigenschappen van HheC maken het enzym uiterst geschikt als biokatalysator voor de synthese van fijn-chemicaliën. Het enzym is namelijk in staat om zowel enantioselectieve ring-sluiting reacties met haloalcoholen als ook enantioselectieve ring-opening reacties met epoxides te katalyseren. Verder accepteert het een breed scala aan aromatische en alifatische substraten en kan het verschillende nucleofiele verbindingen gebruiken voor de ring-opening reactie. Zo blijkt HheC met azide een epoxide-ring te kunnen openen, waardoor het enzym bruikbaar is voor de synthese van enantiomeer zuivere azidoalcoholen. Dit zijn aantrekkelijke precursors voor de productie van waardevolle aminoalcoholen. Wanneer HheC wordt toegepast, is het van belang dat het enzym voldoende stabiel is. Het wild-type enzym is echter zeer gevoelig voor cysteine-oxidatie die leidt tot inactivatie. In dit proefschrift is beschreven hoe het enzym door het vervangen van een enkel aminozuur stabiel kan worden. Behalve het verbeteren van de enzym-stabiliteit heeft dit promotieonderzoek ook geleid tot inzicht in het kinetisch en katalytisch mechanisme van HheC. Het combineren van structuurgegevens met de opgedane kennis over het kinetisch mechanisme van HheC, heeft geleid tot de constructie van verschillende HheC mutanten die een verbeterde katalytische efficiëntie hebben en/of een verhoogde enantioselectiviteit. Door meer mutaties te maken op grond van het verkregen inzicht in de structuur en de werking van het enzym alsook met behulp van random-mutagenese technieken, zullen in de toekomst ongetwijfeld meer HheC varianten gemaakt worden die de toepassingsmogelijkheden van haloalcohol dehalogenasen bij biokatalytische processen verder vergroten.