

University of Groningen

## X-ray crystallographic studies on the enzymatic mechanism of p-Hydroxybenzoate Hydroxylase

Schreuder, Herman Antony

**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:*

1988

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

*Citation for published version (APA):*

Schreuder, H. A. (1988). *X-ray crystallographic studies on the enzymatic mechanism of p-Hydroxybenzoate Hydroxylase*. 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>.

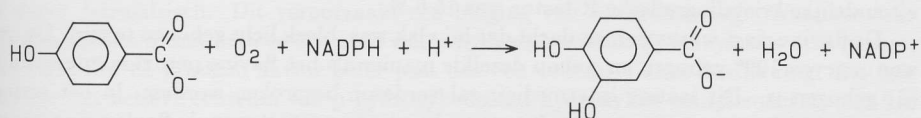
### Take-down policy

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.*

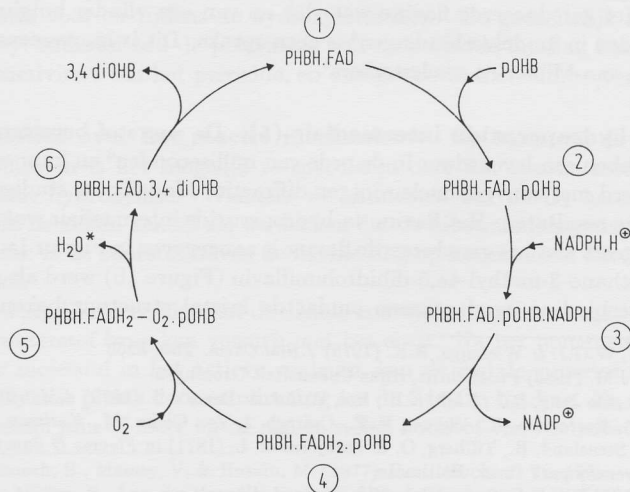
## Samenvatting

Onderwerp van dit proefschrift is onderzoek met behulp van eiwitkristallografie en modelbouw naar het katalytisch mechanisme van het enzym p-hydroxybenzoate hydroxylase uit *Pseudomonas fluorescens*. p-Hydroxybenzoate hydroxylase is een bacterieel enzym wat de inbouw van moleculaire zuurstof in een aromatisch substraat (p-hydroxybenzoaat) katalyseert:



Eén zuurstof atoom wordt ingebouwd in het substraat en het andere zuurstof atoom wordt gereduceerd tot water. Het enzym gebruikt niet covalent gebonden Flavine Adenine Dinucleotide (FAD) als een Katalysator en NADPH zorgt voor het benodigde reducerend vermogen. Gesubstitueerde aromatische verbindingen zoals p-hydroxybenzoaat worden in grote hoeveelheden in de natuur geproduceerd door de biodegradatie van lignine, één van de hoofdbestanddelen van hout. Organismen zoals *Pseudomonas* bacteriën hebben daarom een groot aantal enzymen ontwikkeld om deze verbindingen te kunnen verteren.

Omdat twee substraten (p-hydroxybenzoaat en zuurstof) en twee cofactoren (FAD en NADPH) betrokken zijn bij de reactie van p-hydroxybenzoaat hydroxylase, is het reactiemechanisme ingewikkelder dan dat van vele andere enzymen. Hieronder volgt een schema met de verschillende complexen die optreden tijdens de reactie:



PHBH: p-hydroxybenzoaat hydroxylase; pOHB: p-Hydroxybenzoaat; 3,4-diOHB: 3,4-dihydroxybenzoaat

Na binding van het substrate (1,2) wordt het enzymgebonden FAD gereduceerd door NADPH (3,4). Het gereduceerde FAD reageert zeer snel met zuurstof tot een covalent complex (5) gevolgd door de vorming van het reactie product en het vrijkomen van water (6). De kristal structuren van de complexen 2, 4 en 6 zullen worden beschreven. De structuur van 5 is onderzocht met behulp van modelbouw studies.

**Het enzyme-substraat complex (2)** p-Hydroxybenzoaat hydroxylase wordt routinematig gekristalliseerd als het enzym-substraat complex<sup>1,2</sup>. De structuur is opgehelderd bij 2.5 Å resolutie<sup>3</sup>. Het was mogelijk om de resolutie te verhogen tot 1.9 Å door gebruik te maken van intense synchrotron straling. Kristallografische verfijning tegen deze hoge resolutie gegevens leverden een verbeterd model. Een aantal lussen, die aanvankelijk verkeerd geplaatst waren, zijn nu op de juiste manier in de electronen dichtheid gepast. De uiteindelijke kristallografische R-factor was 15.6 %.

De flavine ring, waarvan men dacht dat hij vlak was, bleek licht gebogen te zijn. De ring was ongeveer 109° gebogen en wel op dezelfde manier als het flavine peroxide intermediair (5) gebogen is. Dit laatste intermediair zal verderop besproken worden. In het actieve centrum werden twee water moleculen gevonden die in contact met de flavine ring waren. Zes van acht peptide plaatjes in de buurt van de flavine ring wijzen met hun gedeeltelijk positieve stikstof naar de flavine ring en zullen dus een positief electrostatisch effect op de ring uitoefenen.

**Het enzym met gereduceerd FAD (4)** Gele kristallen van het enzym-substraat complex met geoxideerd FAD werden anaeroob gedrenkt in een oplossing met 300-400 mM NADPH. Een kleurverandering in de kristallen van geel naar kleurloos geeft aan dat het enzyme-gebonden FAD is gereduceerd. Dit werd bevestigd met behulp spectroscopie aan éénkristallen<sup>2</sup>. Een verschil Fourier tussen gegevens van geoxideerde en gereduceerde kristallen van het enzyme-substraat complex vertoonde zeer weinig kenmerken. Na kristallografische verfijning bleken de verschillen tussen geoxideerd en gereduceerd enzym minimaal te zijn. Het gereduceerde flavine was vlak en van een vlinder buiging van de ring zoals was gevonden in modelverbindingen<sup>4</sup> is geen sprake. Dit is in overeenstemming met NMR resultaten van Müller en medewerkers<sup>5</sup>.

**Het flavin 4a-hydroperoxide intermediair (5)** De zuurstof bevattende flavine intermediairen hebben een levensduur in de orde van milliseconden<sup>6</sup> en kunnen daarom niet worden bestudeerd met conventionele röntgen diffractie. Modelbouw studies gaven echter enige interessante resultaten. Het flavine 4a-hydroperoxide intermediair wat ontstaat wanneer zuurstof reageert met het gereduceerde flavine is aangegeven in Figuur 1a. De structuur van 4a,5-epoxyethano-3-methyl-4a,5-dihidrolumiflavin (Figure 1b) werd als een model gebruikt. Deze verbinding werd gekozen omdat de kristal structuur bekend was<sup>7</sup> en de

<sup>1</sup>Drenth, J., Hol, W.G.J. & Wierenga, R.K. (1975) *J. Biol. Chem.* **250**, 5268

<sup>2</sup>Van der Laan, J.M. (1986) Proefschrift, Rijks Universiteit Groningen

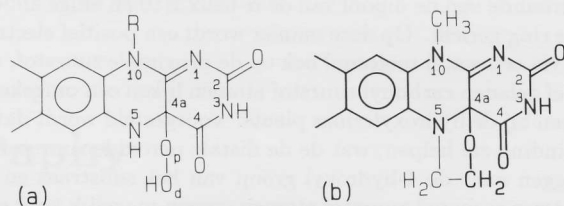
<sup>3</sup>Wierenga, R.K., De Jong, R.J., Kalk, K.H., Hol, W.G.J. & Drenth, J. (1979) *J. Mol. Biol.* **131**, 55

<sup>4</sup>Kierkegaard, P., Norrestam, R., Werner, P.-E., Csöregi, I., Von Glehn, M., Karlsson, R., Leyonmark, M., Rönnquist, O., Stensland, B., Tillberg, O. & Torbjörnson, L. (1971) in *Flavins & flavoproteins* (Kamin, M., ed.) pp 1, University park Press, Baltimore.

<sup>5</sup>Vervoort, J. (1986) Proefschrift, Landbouw Universiteit Wageningen.

<sup>6</sup>Hiroimi, K. (1979) *Kinetics of Fast Enzyme Reactions*, pp. 287, Halsted Press, New York

<sup>7</sup>Bolognesi, M., Ghisla, L. & Incoccia, L. (1978) *Acta Crystallogr. B* **34**, 821



Figuur 1: (a) flavine 4a-hydroperoxide intermediair (b) model verbinding voor (a). Op: proximale peroxide zuurstof; Od: distale peroxide zuurstof.

optische en <sup>13</sup>C NMR spectra sterk lijken op de spectra van het flavine 4a-hydroperoxide gebonden aan p-hydroxybenzooat hydroxylase, respectievelijk bacterieel luciferase<sup>8,9</sup>.

Vanwege het zuurstof wat reageerde met de C4a koolstof heeft de C4a vier substituenten en wordt tetraëdrisch. Dit veroorzaakt een buiging van de flavine ring. Wanneer deze gebogen flavine in het actieve centrum van p-hydroxybenzooat hydroxylase wordt gepast, dan blijkt dat de gebogen flavine beter past dan een volledig vlakke flavine ring. Dit laat zien dat het actieve centrum van p-hydroxybenzooat hydroxylase complementair met het flavine 4a-hydroperoxide intermediair.

**Het enzyme-product complex (6)** Het substraat wat is gebonden in kristallen van het enzym-substraat complex, werd omgezet in het product, 3,4-dihydroxybenzooat door de katalytische reactie te laten verlopen in de kristallen. Verder werd een hoge concentratie van het product toegevoegd aan de drenkvloeistof.

De electronen dichtheid die werd verkregen met behulp van deze kristallen liet duidelijk zien welke van de twee mogelijke meta posities werd gehydroxyleerd en legde beperkingen op aan het aantal mogelijke flavine-zuurstof intermediairen.

De carbonyl zuurstof van Pro293 maakt een tamelijk korte waterstofbrug met de 3-hydroxyl groep van het product. Dit is de hydroxyl groep die geïntroduceerd werd door het enzym. De carbonyl group heeft bijna zeker ook een wisselwerking met de over te brengen zuurstof voor en tijdens de hydroxylatie stap. De gedeeltelijk negatieve lading van de carbonyl zuurstof zou de polarizatie van de peroxide binding kunnen bevorderen en zo de de reactiviteit van het peroxide, en dus de reactiesnelheid, te verhogen.

**Enige speculaties over het reactie mechanisme** Op basis van de bovengenoemde structurele resultaten is het mogelijk te speculeren over het reactie mechanisme van p-hydroxybenzooat hydroxylase. Wanneer we aannemen dat de O<sub>2</sub> het actieve centrum binnenkomt via hetzelfde kanaal als we denken dat de nicotinamide gedeelte van NADPH binnenkomt, dan is de zuurstof boven de flavine ring op het moment dat het reageert met de C4a koolstof.

Modelbouw studies laten zien dat de distale zuurstof, die nu een negatieve lading bezit, een gunstige waterstof brug kan vormen met het eiwit. Na het opnemen van een proton van een water molecuul in het actieve centrum, kan de distale zuurstof zich verplaatsen naar de hydroxylatie plaats door een draaiing om de C4a-Op binding. Na de rotatie wordt de distale zuurstof min of meer op de aan te vallen koolstof van het substraat gedrukt.

<sup>8</sup>Ghisla, S., Entsch, B., Massey, V. & Husain, M. (1977) *Eur. J. Biochem.* **76**, 139.

<sup>9</sup>Vervoort, J., Müller, F., Lee, J., Van den berg, W.A.M. & Moonen, C.T.W. (1986) *Biochemistry* **25**, 8062

Het positieve uiteinde van de dipool van de  $\alpha$ -helix H10 en enige amide stikstof atomen zijn naar de flavine ring gericht. Op deze manier wordt een positief electrostatisch effect op de flavine ring, en via een water molecuul ook op de proximale zuurstof, uitgeoefend. Twee gedeeltelijk negatief geladen carbonyl zuurstof atomen lijken een omgekeerd electrostatisch effect te veroorzaken bij de hydroxylerings plaats. Voorgesteld wordt dat dit de polarizatie van de peroxide binding zal helpen, wat de de distale peroxide zuurstof zal activeren.

Waterstof bruggen naar de 4-hydroxyl group van het substraat en misschien ladings compensatie door twee carbonyl zuurstof atomen zorgen mogelijk voor stabilisatie van een positief geladen zuurstof-substraat intermediair. Uit de organische chemie is bekend<sup>10</sup> dat stabilisatie van een dergelijk intermediair leidt tot activatie van de aromatische ring met betrekking tot elektrofile aanval.

Hoewel het gepresenteerde mechanisme zeer speculatief is, is het mogelijk dat de genoemde factoren voldoende zijn om de reactie binnenin het enzym te laten verlopen, iets wat niet mogelijk is buiten het enzym.

---

<sup>10</sup>Solomons, T.W.G. (1976) *Organic Chemistry* pp. 472, Wiley & Sons, New York