

University of Groningen

## Protein engineering of haloalkane dehalogenase

Pries, Frens

**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:*

1995

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

*Citation for published version (APA):*

Pries, F. (1995). Protein engineering of haloalkane 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).

**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

Milieuverontreiniging door chloorverbindingen is de laatste decennia veel in het nieuws geweest. Een voorbeeld is 1,2-dichloorethaan, afgekort DCE. DCE wordt door de chemische industrie op grote schaal gemaakt, met name als tussenproduct bij de synthese van vinylchloride, waar PVC van gemaakt wordt. Verder wordt DCE gebruikt als oplosmiddel in de chemische en farmaceutische industrie. Uiteindelijk komt een deel in het milieu terecht waar het bodem- en grondwaterverontreiniging veroorzaakt.

Ondanks het giftige karakter van DCE zijn er bacteriën te vinden die het afbreken en het omzetten naar ongevaarlijke stoffen. Sommige zijn zelfs in staat om erop te groeien, zonder andere groeistoffen. Uit vroeger onderzoek bleek dat deze bacteriën een eiwit produceren dat DCE en soortgelijke gechloreerde koolwaterstoffen met water kan laten reageren tot een betrekkelijk ongevaarlijke alcohol en chloride ionen. Het eiwit is naar zijn biochemische activiteit haloalkaan dehalogenase genoemd: alkanen zijn een bepaald soort koolwaterstoffen, halo betekent dat die stoffen gechloreerd of gebromeerd zijn, en dehalogenase betekent dat het eiwit een enzym is dat dechloroert, dat wil zeggen dat het chloor (of broom-) atomen (halo) van koolwaterstoffen afhaalt en ze omzet in chloride (of bromide) ionen.

### Het reactiemechanisme van haloalkaan dehalogenase

Eén manier om chloorverbindingen onschadelijk te maken is het chloor eraf te laten splitsen door water, ofwel hydrolyse. Zonder enzym wordt DCE nauwelijks door water gesplitst. Het enzym versnelt deze reactie door het DCE sterk te binden en door de omzetting in twee stappen te laten verlopen. Eerst wordt het chloor als het ware van DCE af getrokken, waarbij de rest van het DCE molecuul aan het enzym vast gebonden wordt (Fig. 1, stap 1). Vervolgens splitst een watermolecuul dit tussenproduct, dat ook wel intermediair heet, waarbij de alcohol vrij komt (Fig. 1, stap 2).

FIG 1. Reactiemechanisme van haloalkaan dehalogenase. In stap 1 reageert aspartaat 124 met DCE. Hierbij wordt een DCE-enzym tussenproduct gevormd, terwijl het chloor wordt afgesplitst en tussen de tryptofanen (Trp) terecht komt. In stap 2 wordt het tussenproduct door water gesplitst, en komt een alcohol en een proton ( $H^+$ , zuur deeltje) vrij. Het water wordt hiertoe aangezet door histidine 289. De pijltjes geven de bewegingen aan van elektronen, de geladen deeltjes, die zorgen voor de verbindingen tussen de DCE, het water, en het enzym. Asp124 en His289 zijn aminozuren die voor de versnelling van de reactie zorgen.

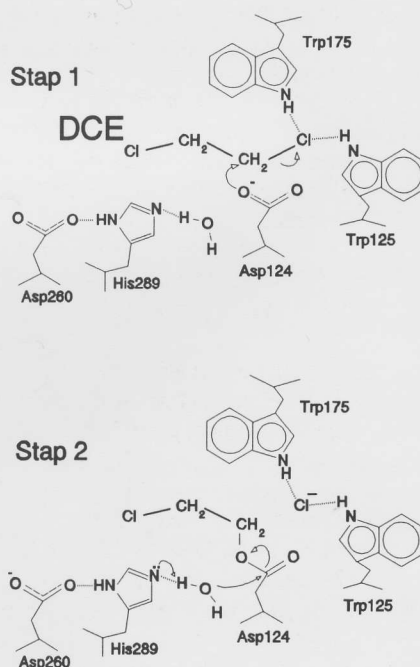


FIG 2. Energie profiel van de reactie van DCE met water zonder haloalkaan dehalogenase. Het enzym zorgt ervoor dat de energie die nodig is voor het afsplitsen van het chloor is verminderd. De reactie in twee stappen laten verlopen. De stappen zijn beschreven in Fig. 1 en in de tekst.

Hierna kan de DCE door de haloalkaan dehalogenase worden gesplitst.

De watermoleculen zijn nodig voor het afsplitsen van het chloor. Het is voor het afsplitsen van het chloor zeer veel energie nodig. Dit wordt verlaagd door de aanwezigheid van Prof. Dr. J. H. van der Schoot, dat bestaat uit een aantal aminozuren die de binding van koolstof binding met DCE. Asparagine zorgt voor de verwijdering van het chloor. De splitsing van het chloor in het enzym.

### Het doel van de reactie

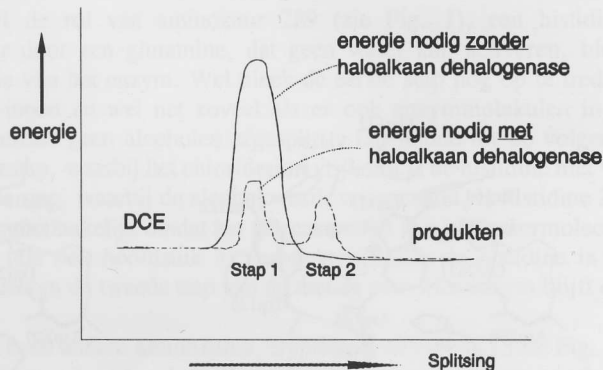
Het doel van de reactie is om de DCE te splitsen. Het is een goede reactie. Wat gebeurt er? De activiteit van het enzym is lastig af te spreken dan de activiteit van het enzym.

Om de activiteit van het enzym te zorgen dat de DNA bestaat uit aminozuren.

deel in het  
 t door de  
 e synthese  
 bruikt als  
 en deel in

t afbreken  
 n erop te  
 teriën een  
 water kan  
 et eiwit is  
 zijn een  
 ebromeerd  
 wil zeggen  
 omzet in

FIG 2. Schematische energie profielen van de reactie van DCE met en zonder haloalkaan dehalogenase. Het enzym zorgt ervoor dat de vele energie die nodig is voor het afsplitsen van chloor verminderd wordt door de reactie in twee stappen te laten verlopen. De twee stappen zijn verklaard in Fig. 1 en in de tekst.



Hierna kan het enzym weer met een ander DCE molecuul aan de slag. Haloalkaan dehalogenase kan op deze manier per seconde ca. 5 maal een chloor-koolstof binding splitsen.

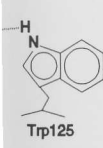
De werking van het enzym berust op verlaging van de hoeveelheid energie die nodig is voor het afsplitsen van chloor. Zonder chloor is DCE zeer stabiel, omdat voor de splitsing zeer veel energie nodig is (zie de hoge piek bij Fig. 2). De hoeveelheid benodigde energie wordt verlaagd door binding van DCE aan het enzym. Dankzij het onderzoek van de groep van Prof. Dr. B.W. Dijkstra van de vakgroep Biofysische Chemie weten we hoe het enzym, dat bestaat uit een keten van 310 deeltjes, aminozuren genaamd, is opgevouwen. Vier aminozuren spelen een belangrijke rol bij de binding van DCE en de splitsing van chloor-koolstof bindingen: de tryptofanen (Trp125 en Trp175 in Fig. 1) trekken aan het chloor van DCE. Aspartaat 124 (Asp124 in Fig. 1) zorgt voor de eerste stap: binding van DCE en verwijdering van het chloor. Histidine 289 (His289 in Fig. 1) zorgt voor de tweede stap, de splitsing van het tussenproduct. De precieze manier waarop deze aminozuren bij elkaar staan in het enzym is te zien in Fig. 3.

**Het doel van het onderzoek**

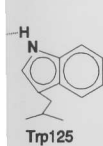
Het doel van het promotieonderzoek was om de rol van deze vier aminozuren in de reactie goed te bestuderen. Zijn deze aminozuren essentieel voor één of voor beide stappen? Wat gebeurt er als deze aminozuren veranderd worden? Dit willen we weten opdat we de activiteit van haloalkaan dehalogenase kunnen veranderen: misschien kunnen zo andere heel lastig afbreekbare verbindingen ook door haloalkaan dehalogenase gesplitst worden. We spreken dan van 'protein engineering'.

Om de aminozuren te veranderen heb je het erfelijk materiaal, DNA, nodig dat ervoor zorgt dat de bacterie, die kan groeien op DCE, haloalkaan dehalogenase kan maken. Dit DNA bestaat uit allemaal letters. Door gericht de letters te veranderen, verander je ook de aminozuren in haloalkaan dehalogenase.

p175



p175



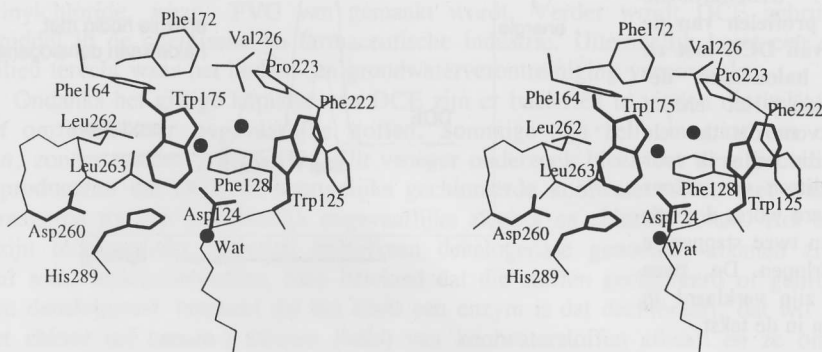


FIG 3. Stereoplaatje van de 'active site' van haloalkaan dehalogenase. Stereo-kijken kan door de figuur zo'n 20 à 30 cm van de ogen af te houden en te concentreren op iets wat zich achter de figuur bevindt. De twee figuren vallen dan samen, en er treedt na enige tijd dieptewerking op.

In een holte in het enzym bindt DCE (hier niet afgebeeld, wel in Fig. 1). Asparaat 124 reageert daarna met een koolstofatoom van dit molecuul. Er splitst dan een chloride-ion af dat gebonden wordt door de tryptofanen 125 en 175. Het tussenproduct wordt dan gesplitst door het water molecuul (Wat), dat hiertoe gestimuleerd wordt door histidine 289. Zo komt dan een alcohol vrij en een  $H^+$  deeltje.

**Hoofdstuk 2** beschrijft het isoleren van het DNA van haloalkaan dehalogenase. Verder staat in dit hoofdstuk beschreven hoeveel haloalkaan dehalogenase door andere bacteriën wordt gemaakt, nadat het geïsoleerde DNA (haloalkaan dehalogenase gen, *dhlA*) in deze bacteriën is gebracht. Het erfelijk materiaal dat direct vóór dit stukje DNA ligt bleek belangrijk te zijn voor de hoge produktie in andere bacteriën. Dit stukje DNA noemen we de promotor van het haloalkaan dehalogenase gen. Verder bleek dat er waarschijnlijk nog een ander, onbekend eiwit gemaakt wordt.

**Hoofdstuk 3** gaat over de rol van asparaat 124 (zie Fig. 1) in de omzetting van gehalogeneerde substraatmoleculen door het enzym naar produkt. Dit aminozuur is negatief geladen. Vervanging van dit aminozuur door een neutraal aminozuur blijkt te leiden tot inactivering van het haloalkaan dehalogenase.

Ook is de reactie uitgevoerd in aanwezigheid van water met zuurstofatomen die een atomaire massa van 18 in plaats van 16 hebben. Omdat de reactie van haloalkaan dehalogenase een hydrolyse is, kan verwacht worden dat dit zware zuurstofatoom ook in het produkt, dat wil zeggen de alcohol, terecht komt. Dit is aangetoond met behulp van massaspectrometrie, waarmee de massa van zeer kleine hoeveelheden stoffen vastgesteld kan worden. Tevens bleken de zware zuurstofatomen inderdaad in asparaat 124 terecht te komen. Dit betekent dat de zuurstof van het water via het enzym wordt doorgegeven aan de alcohol.

De alcoholmo  
vele andere e

**Hoofd**

Vervanging v  
opnieuw te le  
Er ontstonden  
reactie aanwe  
conclusie: vo  
groot belang,  
essentieel. Hi  
dat de alcohol  
watermolecuu  
tussen stap 1

**Hoofd**

Uit onderzoek  
gevonden dat  
Verandering v  
van afgesplits  
van het oorsp

In dit l

zwaar water  
zuurstofatoom  
tryptofanen b  
chlor af te sp  
reactie van he  
voor de snel

In hoo

asparagine. D  
meer met DC  
DCE kan op  
ontbreekt. Tij  
activiteit aan  
oorspronkelijk  
aanvalt. In dit  
worden omge

Dit is

aminozuur 12  
dat direct na  
na een paar  
omzetting van  
gewoonlijk ni  
dat bij histidi

In hoo

die op een he  
van het dehal  
afbreken. De  
chlorhexaan  
waar DCE ge

De alcoholmoleculen krijgen dus niet het zuurstofatoom rechtstreeks van het water, wat bij vele andere enzymen wel gebeurt.

**Hoofdstuk 4** beschrijft de rol van aminozuur 289 (zie Fig. 1), een histidine. Vervanging van dit aminozuur door een glutamine, dat geen water kan activeren, bleek opnieuw te leiden tot inactivatie van het enzym. Wel bleek de eerste stap nog op te treden. Er ontstonden alleen chloride-ionen en wel net zoveel als er ook enzymmoleculen in de reactie aanwezig waren. Er werden geen alcoholen afgesplitst. Dit leidde tot de volgende conclusie: voor de eerste reactiestap, waarbij het chloride-ion vrijkomt is de histidine niet van groot belang, en voor de tweede stap, waarbij de alcohol wordt vrijgemaakt, is histidine 289 essentieel. Histidine 289 is dus noodzakelijk omdat het de reactiviteit van het watermolecuul dat de alcohol doet afsplitsen (zie ook hoofdstuk 3) verhoogt. Zonder de histidine is het watermolecuul niet actief en verloopt de tweede stap van de reactie niet. Het enzym blijft dan tussen stap 1 en 2 steken.

**Hoofdstuk 5** beschrijft twee andere aminozuren, tryptofaan 125 en 175 (zie Fig. 1). Uit onderzoek aan de ruimtelijke structuur van haloalkaan dehalogenase was al door anderen gevonden dat deze tryptofanen betrokken waren bij het binden van het afgesplitste chloride. Verandering van deze twee tryptofanen leidde dan ook, zoals verwacht, tot slechtere binding van afgesplitst chloor. Ook de activiteit van het veranderde enzym was een stuk lager dan van het oorspronkelijke ('wild type') haloalkaan dehalogenase.

In dit hoofdstuk staan ook experimenten beschreven met reacties in  $D_2O$ , dat ook een zwaar water is, nu echter met een zwaarder waterstofatoom in plaats van een zwaarder zuurstofatoom zoals in hoofdstuk 3 was gebruikt. De resultaten wezen erop dat de tryptofanen betrokken waren bij het verlagen van hoeveelheid energie die nodig is om het chloor af te splitsen van DCE, de eerste stap in Fig. 1 en 2. Ook bleek dat deze stap in de reactie van het wild type enzym niet snelheidsbepalend is. Een andere stap is dus belangrijker voor de snelheid van het enzym.

In **hoofdstuk 6** is aspartaat 124, het aminozuur dat DCE bindt, vervangen door een asparagine. Dit aminozuur lijkt veel op aspartaat, maar is niet negatief geladen, zodat het niet meer met DCE kan reageren. De verwachting was nu dat het veranderde enzym nog wel DCE kan opnemen, maar niet meer kan reageren, omdat de negatief geladen zuurstof ontbreekt. Tijdens opzuivering van het asparagine bevattende enzym bleek echter toch activiteit aanwezig te zijn! Het vermoeden was dat hetzelfde watermolecuul dat in het oorspronkelijke enzym het tussenprodukt splitst (stap 2 in Fig. 1) nu aminozuur 124 zelf aanvalt. In dit geval zou ammoniak worden afgesplitst, en zou de asparagine in een aspartaat worden omgezet, zodat het oorspronkelijke enzym weer gevormd wordt.

Dit is in dit hoofdstuk aangetoond door een fragment van het enzym te zuiveren waar aminozuur 124 inzit, en vervolgens de aminozuurvolgorde hiervan te bepalen. Het blijkt dan dat direct na zuivering meestal nog asparagine op de plaats van aminozuur 124 zit, en dat na een paar dagen alleen nog maar aspartaat aangetoond kan worden op deze plaats. De omzetting van asparagine naar aspartaat vindt dus inderdaad plaats. Omdat deze omzetting gewoonlijk niet of slechts zeer langzaam optreedt, betekent dit weer dat het watermolecuul dat bij histidine 289 is gelegen bijzonder reactief is.

In **hoofdstuk 7** tenslotte staan mutanten van het haloalkaan dehalogenase beschreven, die op een heel andere wijze verkregen zijn dan in de voorgaande hoofdstukken. Het DNA van het dehalogenase is in een andere bacterie gezet, een *Pseudomonas*, die 1-hexanol kan afbreken. Deze alcohol ontstaat wanneer het dehalogenase 1-chloorhexaan splitst. Echter, 1-chloorhexaan kan niet door haloalkaan worden omgezet omdat het niet goed in de holte past waar DCE gebonden wordt, het is te groot.

Vervolgens hebben we de *Pseudomonas* die het dehalogenase kan maken laten groeien in flessen waarin alleen 1-chloorhexaan als groeistof aanwezig was. Het bleek dat de bacterie zich snel kon aanpassen aan de afbraak van 1-chloorhexaan door een veranderd dehalogenase te maken. Het veranderde enzym kon wèl 1-chloorhexaan splitsen.

Zo zijn er zes verschillende mutanten van haloalkaan dehalogenase gevonden. De veranderingen bleken allemaal in hetzelfde gebied van het enzym te hebben plaatsgevonden, namelijk in een deel van het enzym dat als een deksel op de holte ligt waar DCE gebonden wordt. Hierdoor is enigszins bekend geworden welke aminozuren van invloed zijn op de voorkeur van haloalkaan dehalogenase voor kleine of grote gechlloreerde stoffen.

Verder leek het ontstaan van deze mutanten niet geheel willekeurig. Er zijn precies daar veranderingen opgetreden waar al repeterende volgordes in het DNA van het oorspronkelijke haloalkaan dehalogenase aanwezig waren. Op grond van deze volgordes en die van het veranderde DNA worden in dit hoofdstuk suggesties gedaan over het mechanisme dat zou leiden tot het ontstaan van deze mutanten, en tevens over de evolutie van het wild type haloalkaan dehalogenase. Het lijkt erop dat enige grote veranderingen hebben plaatsgevonden voordat het enzym geschikt was om DCE om te zetten.

**Hoofdstuk 8** is de engelstalige versie van dit hoofdstuk. Daartussen staan aanvullende opmerkingen over experimenten die wel gedaan zijn, maar niet beschreven. Verder gaat een deel over enzymen die mogelijk evolutionair verwant zijn met haloalkaan dehalogenase. Tenslotte wordt een aantal suggesties gedaan voor experimenten die zouden kunnen leiden tot een haloalkaan dehalogenase dat een hogere activiteit heeft en meer stoffen kan omzetten. Daarvoor is het nodig meer te weten over aminozuren die invloed hebben op de snelheid waarmee de reacties verlopen, en hoe groot deze invloed is.