

University of Groningen

## Engineering specificity and activity of thermolysin-like proteases from *Bacillus*

de Kreij, Arno

**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:*

2001

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

*Citation for published version (APA):*

de Kreij, A. (2001). *Engineering specificity and activity of thermolysin-like proteases from Bacillus*. 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 en algemene discussie.

Een enzym is een eiwit dat een chemische reactie katalyseert, het bestaat uit een lange keten aminozuren. De eiwitketen is in het algemeen op een complexe wijze gevouwen en vormt zo een drie dimensionale structuur, vergelijkbaar met een kluwen wol. In de natuur komen 20 verschillende aminozuren voor. De volgorde van de aminozuren in combinatie met de manier waarop de eiwitketen is gevouwen, bepaalt de eigenschappen van een eiwit.

Protein engineering betekent ongeveer "eiwit bouwkunde". Protein engineering is een multidisciplinaire benadering om de eigenschappen van eiwitten te bestuderen. Protein engineering combineert theoretische, fysische, biochemische en genetische kennis en technieken om eiwitten te bestuderen. Deze multidisciplinaire aanpak heeft tot een dramatische toename van kennis geleid op het gebied van eiwit structuur, eiwit vouwing en katalyse en de daaraan ten grondslag liggende structuur-functie principes.

In dit proefschrift zijn protein engineering technieken gebruikt om de "thermolysine-achtige eiwit afbrekende enzymen" (TLPs) te bestuderen. Deze enzymen worden geproduceerd door bacteriën van het genus *Bacillus*. Met name is aandacht besteed aan de achtergronden van de substraat specificiteit, de structurele flexibiliteit die nodig is voor katalyse, en de activiteit van deze eiwit afbrekende enzymen. Eiwit afbrekende enzymen worden ook wel proteasen genoemd.

Op het oppervlak van een protease bevindt zich een "slot", dit is een inkeping waar het af te breken eiwit in past. Het af te breken eiwit is dan de "sleutel" en wordt het substraat genoemd. Een protease kan dus alleen maar eiwitten afbreken die in zijn slot passen. Voor ieder aminozuur van het af te breken eiwit heeft een protease een inkeping, deze wordt substraat

bindings pocket genoemd. Aangezien een protease ook uit aminozuren bestaat, het is immers zelf ook een eiwit, wordt een bindings pocket gevormd door een aantal aminozuren. Deze aminozuren bepalen de aard van de pocket. De pocket kan water afstotend zijn (hydrofoob) of juist water lievend (hydrofiel), hij kan elektrisch geladen zijn, of juist niet, hij kan groot zijn, of klein, hij kan electrostatisch gepolariseerd zijn of niet. Al deze eigenschappen zorgen ervoor dat het slot een serie specifieke eigenschappen krijgt zodat alleen nog maar bepaalde sleutels passen. In een waterafstotend slot past geen waterlievende sleutel, in een klein slot past geen grote sleutel, enzovoort. Door het veranderen van het slot, dat wil zeggen, door het veranderen van de aminozuren die de substraat bindende holtes vormen, zou dus de voorkeur voor een bepaald soort substraat kunnen veranderen.

De TLP familie omvat enzymen uit een groot aantal Gram-positieve bacteriën, waaronder enkele pathogenen zoals *Legionella*, *Listeria*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, en *Vibrio*. Aan deze pathogene, ofwel ziekte verwekkende bacteriën, dragen de TLPs bij tot de pathogeniciteit, het ziekte verwekkende vermogen van zulke bacteriën. Het actieve centrum van TLP enzymen, dat is het deel van het enzym dat uiteindelijk het werk verricht, sterke overeenkomsten met enkele eukaryote proteasen, in het bijzonder de matrix metalloproteasen (MMPs). Deze MMPs op hun beurt, blijken betrokken te zijn bij een aantal belangrijke processen in de mens, waaronder, op indirecte wijze, de vorming van van tumoren.

Bacteriële TLPs worden toegepast in de industrie, onder andere in bakkerijen, brouwerijen en in de leerlooierij. Thermolysine, de bekendste TLP, wordt gebruikt voor het maken van aspartaam, een veel gebruikt

## Chapter 7

kunstmatische zoetmiddel. TLPs zijn echter niet alleen medisch en commercieel relevant. Door de jaren heen zijn deze proteasen uitvoerig bestudeerd, hetgeen een grote hoeveelheid aan informatie en kennis heeft opgeleverd. Deze geaccumuleerde kennis maakt TLPs uitermate geschikt voor de multidisciplinaire proteïn engineering aanpak ter doorgronding van de structuur-functie principes die ten grondslag liggen aan eiwit structuur en katalyse.

Hoofdstuk 1, de introductie, behandelt algemene aspecten van enzym klassificatie, enzymatische catalyse, substraat specificiteit, thermostabiliteit, en de electrostatica van het actieve centrum van proteasen, in het bijzonder van de TLPs. Uit de besproken literatuur blijkt duidelijk dat proteïn engineering bij uitstek een waardevolle methode is om zulke aspecten te bestuderen.

In hoofdstuk 2 wordt voor het eerst een aantal TLPs gekarakteriseerd met een identieke set substraten onder uniforme omstandigheden. Karakterisatie met zowel dipeptide substraten als HPLC analyse van  $\beta$ -caseïne afbraak producten, toont aan dat de TLP familie, ondanks een grote variatie in aminozuur sequentie, een in catalytisch opzicht homogene familie is. De resultaten van dit onderzoek laten duidelijk zien dat de verschillen in substraat specificiteit niet samenhangen met algehele verschillen in aminozuur volgorde, maar slechts afhankelijk zijn van een beperkt aantal identificeerbare aminozuren. Plaatsgerichte mutagenese van één van de substraat bindingsholte residuen van het TLP afkomstig uit *Bacillus stearothermophilus* (TLP-ste) leidde er toe dat dit enzym de eigenschappen kreeg van thermolysine, hetgeen er inderdaad op duidt dat slechts een paar aminozuren van belang zijn waar het gaat om de verschillen tussen de natuurlijk voorkomende TLPs.

In hoofdstuk 3 wordt het belang van geconserveerde glycines in de voorgestelde scharnier regio's aangetoond op grond van de

effecten van Gly $\rightarrow$ Ala mutaties op de katalytische activiteit. Het actieve centrum van de TLPs bevindt zich op de bodem van de groeve tussen het N-terminale en C-terminale domein. Kristallografische studies hadden al eerder aangetoond dat de groeve meer gesloten is in TLPs die een substraat gebonden hebben, dan in TLPs zonder substraat. Op grond van deze waarnemingen is verondersteld dat TLPs een scharnierbeweging vertonen gedurende hun katalyse. Deze beweging resulteert in het open en sluiten van de katalytische groeve. Twee gebieden zijn voorgesteld als mogelijke scharnier gebieden. Eén is gelocaliseerd rond de geconserveerde glycine 78, bij het tweede gebied zijn residuen 135 en 136 betrokken. Acht Gly $\rightarrow$ Ala mutaties werden geconstrueerd in TLP-ste en hun effect op de afbraak van caseïne en verschillende kleine peptide substraten werd geanalyseerd. Het bleek dat de glycine residuen op posities 78, 135 en 136 inderdaad belangrijk zijn voor catalyse. Het duidelijke belang van de geconserveerde glycine residuen in de voorgestelde scharnier gebieden ondersteunt het idee dat een scharnierbeweging een essentieel onderdeel is van de katalyse door TLPs.

In hoofdstuk 4 worden de eigenschappen besproken van de voornaamste specificiteits bepalende, hydrofobe bindingsholte  $S_1'$ . De  $S_1'$  holte wordt in TLP-ste voornamelijk gevormd door Phe130, Phe133, Val139 en Leu202. In de huidige studie werden de effecten onderzocht van het vervangen van Leu202 door kleinere (Gly, Ala en Val) en door grotere (Phe en Tyr) hydrofobe aminozuren. De effecten van de mutaties tonen aan dat de originele  $S_1'$  holte optimaal is voor de binding van leucine zijketens. Het reduceren van de grootte van residue 202 resulteerde in een hogere activiteit op substraten met een Phe op de  $P_1'$  positie. De Leu202Phe en de Leu202Tyr mutaties, waarvan werd aangenomen dat zij de  $S_1'$  holte zouden verkleinen, zorgden voor een grote toename in de activiteit op substraten met een Phe op de  $P_1'$

positie. Dit onverwachte effect wordt waarschijnlijk veroorzaakt door de omstandigheid dat 202Phe en 202Tyr een alternatieve rotameer adopteren die de holte verder opent dan een holte met Leu202. Deze verder geopende holte bevordert interacties met substraten met een groot P<sub>1</sub>' aminozuur. Om deze veronderstelling verder te onderbouwen werden enkele varianten geconstrueerd van thermolysine. Thermolysine en TLP-ste varianten die een identieke S<sub>1</sub>' holte bezitten, vertonen een kwalitatief gelijke voorkeur voor substraten met een P<sub>1</sub>' Phe versus substraten met een P<sub>1</sub>' Leu. De 16-voudige toename van de activiteit van de Leu202Tyr mutant ten opzichte van het oorspronkelijke TLP-ste op substraten met een P<sub>1</sub>' Phe is een van de sterkste activiteits toenames die ooit voor een enkele mutatie is waargenomen.

Hoofdstuk 5 beschrijft de mogelijkheden om de electrostatische interacties van het actieve centrum van TLP-ste te wijzigen door het aanbrengen of verwijderen van elektrische ladingen aan het oppervlak van het enzym. Dubbel-mutant cyclus analyse werd toegepast om te onderzoeken welke van de gemuteerde residuën onafhankelijk, en welke afhankelijk van elkaar waren. De resultaten tonen aan dat de effecten op de katalytische efficiëntie ( $k_{cat}/K_m$ ) van enkelvoudige puntmutaties niet additief zijn, zelfs niet in die gevallen waarbij de puntmutaties 10 Å of meer van het zink ion in het actieve centrum en tot 25 Å van elkaar verwijderd zijn. Dit valt moeilijk te rijmen met de huidige electrostatische theorie en impliceert waarschijnlijk dat electrostatische netwerken complexer zijn dan tot nu toe werd aangenomen. Verder impliceert het resultaat dat andere dan electrostatische interacties verantwoordelijk zijn voor voor een deel van de waargenomen effecten. Hierbij kan gedacht worden aan de dynamica van het actieve centrum. Verschillende mutaties leidden tot een significante toename van de activiteit. De meest

actieve combinatiemutant was bijna vier maal aktiever dan het originele TLP-ste. De vorm van het pH-activiteits profiel veranderde significant. Opmerkelijk genoeg gebeurde dit zonder dat er een grote verschuiving optrad in het pH-optimum.

Samenvattend kan men stellen dat het in dit proefschrift gepresenteerde werk laat zien dat de specificiteit van thermolysine-achtige proteasen op een voorspelbare wijze veranderd kan worden met behulp van proteïn engineering technieken. De vergelijking van de verschillende wild-type proteasen, in hoofdstuk 2, leidde tot de identificatie van aminozuren die verantwoordelijk zijn voor de substraat specificiteit. Door deze kennis aan te wenden, zoals beschreven in hoofdstuk 4, werd een TLP-ste variant geconstrueerd met een duidelijk veranderd specificiteitsprofiel.

Algemeen wordt aangenomen dat enzymen scharnierbewegingen ondergaan tijdens hun katalyse. Echter, tot nu toe zijn in slechts enkele studies rationeel ontworpen mutaties gebruikt om deze scharnierbeweging te onderzoeken. De resultaten van hoofdstuk 3 ondersteunen het idee dat een scharnierbeweging een fundamenteel onderdeel is van katalyse door TLPs.

Vandaag de dag is het op rationele wijze beïnvloeden van katalyse een van de grootste uitdagingen binnen de proteïn engineering. De resultaten in hoofdstuk 5 laten zien dat de katalyse van TLPs beïnvloed kan worden door het veranderen van de lading aan het oppervlak van het enzym. Het is echter ook duidelijk dat de resultaten moeilijk te interpreteren zijn met behulp van de huidige electrostatische modellen van het actieve centrum. De verrassende observatie dat verschillende mutaties op het oppervlak van een enzym, elkaar over grote afstand kunnen beïnvloeden, leidt tot interessante speculaties. De vraag waarom zijn enzymen zo groot kan waarschijnlijk als volgt

## Chapter 7

beantwoord worden: Als ieder residue op het oppervlak invloed uitoefent op de electrostatica van het actieve centrum, en als al deze invloeden onderling afhankelijk van elkaar zijn, dan heeft de natuur meer dan alleen het actieve centrum geoptimaliseerd gedurende de evolutie.

Het protein engineering concept, de multidisciplinaire bestudering van structuur-functie relaties in eiwitten, is in dit proefschrift op succesvolle wijze toegepast om enkele activiteit en specificiteit bepalende structuur-functie relaties van TLPs op te helderen. Hoewel het protein engineering concept regelmatig met succes is toegepast, bestaan er nog vele uitdagingen.

Ondanks de opheldering van de specificiteits determinanten van een aantal hydrofobe bindingsholten van verschillende enzymen, worden pogingen om op rationele wijze een nieuwe substraat specificiteit te ontwerpen dikwijls geconfronteerd met onverwachte problemen. Het bestaan van voorheen onbekende secundaire specificiteits determinanten is hier een voorbeeld van. Een ander probleem is dat een eenvoudige test om de enzym activiteit op een industrieel of medisch relevant substraat te meten, soms niet kan worden ontwikkeld. Daarom wordt tijdens het veranderen van een protease vaak gebruik gemaakt van model substraten. Deze model substraten echter kunnen een andere conformatie hebben dan de substraten waarop het protease actief moet zijn. Het gevolg hiervan kan zijn dat de verandering in specificiteit die met model substraten kunnen worden waargenomen, zich niet voordoen met natuurlijke substraten. Een gedeeltelijke oplossing voor dit probleem is een zorgvuldige keuze van de model substraten, zodat deze een zo groot mogelijke overeenkomst vertonen met het natuurlijke substraat.

De electrostatische determinanten van zowel de enzymatische activiteit als het pH-optimum zijn vandaag de dag net zo onduidelijk als de thermostabiliteits determinanten vijftien jaar geleden. Echter, de ontwikkeling van nieuwe random mutagenese methoden en geautomatiseerde methoden waarmee in korte tijd grote aantallen mutanten worden getest (high throughput screening) zouden de opheldering van de electrostatische determinanten kunnen vereenvoudigen. De toepassing van de genoemde technieken kunnen in korte tijd nieuwe enzym varianten met veranderde electrostatische eigenschappen opleveren. Door deze varianten aan "reverse engineering" te onderwerpen, dat wil zeggen, ze stap voor stap terug te veranderen naar het wild-type enzym totdat het enzym de nieuwe eigenschappen heeft verloren, kan inzicht worden verkregen in de electrostatische determinanten. Op deze wijze kan waarschijnlijk een substantiele hoeveelheid kennis worden vergaard in minder tijd dan via de conventionele protein engineering aanpak. De daarop volgende toepassing van protein engineering technieken kan uiteindelijk leiden tot voldoende kennis om op rationele wijze de activiteit en het pH-optimum van enzymen te veranderen.

De beschikbaarheid van een groot aantal primaire sequenties, verschillende expressie en zuiverings systemen, een grote hoeveelheid kinetische data, en enkele tertiaire structuren die zijn opgehelderd met behulp van röntgen diffractie maken van TLPs een uitstekend model systeem om structuur-functie relaties te onderzoeken met behulp van protein engineering.