

University of Groningen

## Catalytic promiscuity of a proline-based tautomerase

Rahimi, Mehran

**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:*  
2016

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

*Citation for published version (APA):*

Rahimi, M. (2016). *Catalytic promiscuity of a proline-based tautomerase: Aldolase activities and enzyme redesign*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen.

**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 Toekomstperspectieven

---

### 1. Het verkennen van enzym promiscuïteit voor de formatie van koolstof-koolstofbindingen

In veel biochemie boeken worden enzymen omschreven als zeer specifiek voor de reactie die ze katalyseren en in hun keuze voor substraten. Toch is er in de afgelopen jaren steeds meer bewijs gekomen dat erop duidt dat enzymen helemaal niet zo specifiek zijn en niet alleen verschillende substraten kunnen accepteren, maar zelfs verschillende reacties kunnen katalyseren. Dit fenomeen, waarbij enzymen naast hun biologisch relevante activiteit ook andere reacties kunnen katalyseren, wordt enzym promiscuïteit genoemd. De promiscue activiteiten zijn vaak niet erg hoog vergeleken met de natuurlijke activiteit van een enzym welke onder evolutionaire selectie druk zit. Hoewel deze secundaire activiteiten vaak niet biologisch relevant zijn, kunnen ze in het geval van nieuwe selectiedruk een fitness voordeel geven (aan het organisme) waarbij de promiscue activiteit als startpunt dient voor het ontstaan van een nieuw enzym dat gespecialiseerd is in die promiscue activiteit. Op die manier wordt gedacht dat enzym promiscuïteit een cruciale rol speelt in de natuurlijke evolutie van nieuwe enzymatische activiteiten. In dat licht kunnen promiscue enzymen ook dienen als startpunt voor de laboratorium evolutie van nieuwe biokatalysatoren.

Het tot stand brengen van een koolstof-koolstofbinding is in de organische chemie een essentiële stap voor het bouwen van nieuwe moleculen. Desalniettemin zijn er relatief weinig enzymen bekend die als natuurlijke activiteiten belangrijke koolstof-koolstofbinding vormende reacties kunnen katalyseren zoals Michael-(type) addities, Henry reacties, Mannich reacties of Knoevenagel condensaties. Daarnaast accepteren aldolases, die als natuurlijke activiteit aldolreacties katalyseren, slechts een beperkt aantal substraten. In de afgelopen jaren zijn een aantal enzymen beschreven die als promiscue activiteit deze koolstof-koolstofbinding vormende reacties kunnen katalyseren met goede tot uitstekende enantioselectiviteit (dit wordt besproken in **Hoofdstuk 1**). De ontdekking van deze promiscue enzym activiteiten is een belangrijke stap in de ontwikkeling van efficiënte biokatalysatoren voor synthetisch bruikbare koolstof-koolstofbinding vormende reacties.

## 2. Formatie van een covalent gebonden enamine op Pro-1 van 4-OT na incubatie met aldehydes

Het enzym 4-oxalocrotonaat tautomerase (4-OT) is lid van de tautomerase superfamilie. Dit is een groep van homologe eiwitten die een  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ vouwing en een unieke katalytische amino-terminale proline (Pro-1) gemeen hebben. 4-OT is onderdeel van de katabole route van aromatische koolwaterstoffen in *Pseudomonas putida* mt-2, waar het de conversie van 2-hydroxyhexa-2,4-dienedioaat in 2-oxohexa-3-enedioaat katalyseert. In deze tautomerisatie-reactie functioneert Pro-1 als een katalytisch base ( $pK_a$  van Pro-1  $\sim 6.4$ ) die het 2-hydroxyl proton van 2-hydroxyhexa-2,4-dienedioaat opneemt en het verplaatst naar de C5-positie, hetgeen 2-oxohexa-3-enedioaat oplevert.

Wat 4-OT voor ons interessant maakt, is dat het promiscue koolstof-koolstofbinding vormende reacties kan katalyseren, zoals de Michael-type additie van lineaire alifatische aldehydes aan verschillende alifatische en aromatische nitroalkenen waarmee waardevolle  $\gamma$ -nitroaldehydes gevormd worden en de cross-aldolisatie van acetaldehyde en benzaldehyde wat cinnemaldehyde oplevert. Om inzicht te krijgen in de manier waarop 4-OT deze onnatuurlijke reacties katalyseert, hebben we H-D uitwisselingsstudies gedaan in  $D_2O$  en röntgendiffractie studies op 4-OT kristallen (**Hoofdstuk 2**). Hieruit kwam naar voren dat H-D uitwisseling in acetaldehyde door 4-OT gekatalyseerd wordt en dat Pro-1 cruciaal is voor deze activiteit. Met de röntgendiffractie studies hebben we aangetoond dat de Pro-1 van 4-OT kan reageren met acetaldehyde waardoor een enamine gevormd wordt. Deze resultaten geven bewijs voor een mechanisme van de 4-OT gekatalyseerde aldol en Michael-type additie reacties waarbij acetaldehyde geactiveerd wordt voor een nucleofiele additie via een Pro-1 afhankelijke formatie van een enamine tussenvorm.

Om verder inzicht te krijgen in het mechanisme van 4-OT-gekatalyseerde promiscue koolstof-koolstofbinding vormende reacties, is het belangrijk om kristalstructuren van 4-OT op te helderen in complex met andere donor- (bv alifatische aldehydes) of acceptorsubstraten (bv benzaldehyde of nitroalkenen) of met producten (bv cinnemaldehyde of  $\gamma$ -nitroaldehydes). Dergelijke kristallografische resultaten zouden een belangrijke leidraad kunnen vormen voor toekomstige mutagenese studies met als doel om de activiteit en selectiviteit van 4-OT voor koolstof-koolstofbinding vormende reacties te verbeteren.

## 3. Verschillende types van aldolreacties gekatalyseerd door 4-OT

Zoals hierboven beschreven, katalyseert 4-OT de aldolcondensatie van acetaldehyde met benzaldehyde met als product cinnemaldehyde. In het werk dat in **Hoofdstuk 3** beschreven is, was ons doel om te onderzoeken welke substraten 4-OT accepteert in zowel inter- als intramoleculaire aldolreacties. We hebben aangetoond dat 4-OT verschillende types van aldolreacties promiscue katalyseert, zoals de zelfcondensatie van propanal, de crosskoppeling van propanal en benzaldehyde, de crosskoppeling van

propanal en pyruvaat, alsmede de intramoleculaire cyclisaties van hexaandial en heptaandial. Mutatie van de katalytische amino-terminale proline (P1A) had tot gevolg dat deze aldolase activiteiten van 4-OT sterk afnamen, terwijl een mutatie op een andere aminozuurpositie (F50A) in het actieve centrum tot verhoogde aldolase activiteit van 4-OT leidde. Dit zorgt voor overtuigend bewijs dat deze aldolisaties in het actieve centrum van 4-OT plaatsvinden. Een verdere systematische analyse van 4-OT en sterkverwante tautomerase superfamilieleden waarbij een proline in het actieve centrum aanwezig is als nucleofiel, kan een bruikbare strategie zijn om compleet nieuwe promiscue aldolase activiteiten te ontdekken. Deze onnatuurlijke activiteiten kunnen vervolgens gebruikt worden als startpunt voor de ontwikkeling van nieuwe aldolases voor synthetisch bruikbare zelf- en crosskoppeling reacties.

#### 4. Verbetering van de promiscue aldolase activiteit van 4-OT door middel van 'enzyme engineering'

Nadat we hadden vastgesteld dat 4-OT verschillende types aldolreacties kan katalyseren, hebben we ons gericht op het verbeteren van deze promiscue activiteiten door middel van 'enzyme engineering'. Zoals in **Hoofdstuk 4** beschreven staat, hebben we gebruik gemaakt van een systematische mutagenese strategie waarmee we drie 'hotspots' hebben gevonden (His-6, Met-45 en Phe-50) waar enkelvoudige mutaties leidden tot een sterk verbeterde aldolase activiteit voor de condensatie van acetaldehyde met benzaldehyde. Opvallend genoeg waren al deze gunstige mutaties dicht bij het actieve centrum van 4-OT hetgeen ondersteuning biedt voor het idee dat mutaties dicht bij het actieve centrum efficiënter nieuwe activiteiten verbeteren in een promiscue enzym ten opzichte van mutaties verder bij het actieve centrum vandaan. Activiteitsanalyses van een toegespitste collectie van mutanten waarin de drie 'hotspots' simultaan gerandomiseerd waren, leidde tot de ontdekking van een 4-OT variant met een > 5000-voudige verbetering in katalytische efficiëntie voor de aldolcondensatie van acetaldehyde met benzaldehyde. Deze sterke verhoging in promiscue aldolase activiteit ging samen met een sterke verlaging in de natuurlijke tautomerase activiteit wat er toe leidde dat er een > 10<sup>7</sup>-voudige verandering was in reactiespecificiteit. Dit toont aan dat er een sterke negatieve wisselwerking bestaat tussen de promiscue activiteit en de natuurlijke activiteit.

We hebben ook aangetoond dat het promiscue enzym 4-OT kan worden aangepast tot een efficiënter aldolase (M45Y/F50V) voor de zelfcondensatie van kleine alifatische aldehydes (bv acetaldehyde, propanal en butanal) door een kleine collectie van mutanten te gebruiken waarin slechts twee 'hotspots' (Met-45 en Phe-50) simultaan zijn gerandomiseerd (**Hoofdstuk 5**). Hoewel dezelfde aminozuurposities als 'hotspots' voor de cross-condensatie van acetaldehyde met benzaldehyde waren geïdentificeerd, leverde de activiteitsanalyse van de collectie mutanten voor de zelfcondensatie van propanal een andere 4-OT variant op (M45T/F50A, zie **Hoofdstuk 4**). 4-OT kan dus op maat gemaakt worden om verschillende carbonylverbindingen om te zetten en om specifieke

aldolreacties uit te voeren. In toekomstig werk zou het erg interessant zijn om te testen of 4-OT M45Y/F50V (of misschien verder geëvolueerde varianten) aldolisaties kan katalyseren met formaldehyde of gesubstitueerde aldehydes zoals glycolaldehyde en chloroacetaldehyde als substraat. Dit kan leiden tot nieuwe aldol verbindingen (bv aldose koolhydraten).

## 5. Concluderende opmerkingen en toekomstige uitdagingen

Het grootste deel van het werk dat beschreven staat in dit proefschrift richtte zich op het ontdekken en verbeteren van promiscue aldolase activiteiten van 4-OT. Voor het grootste deel van deze 4-OT gekatalyseerde reacties is aangetoond dat zowel de aldolkoppeling als de dehydratiestap door het enzym gekatalyseerd wordt, wat tot niet-chirale producten leidt. In toekomstig werk is het daarom van belang om 4-OT varianten te genereren die alleen de formatie van het aldolproduct katalyseren en niet de daaropvolgende dehydratie. Zo zou het, bijvoorbeeld, erg aantrekkelijk zijn om een 4-OT variant te ontwikkelen die alleen de crosskoppeling van acetaldehyde en chloroacetaldehyde of de intramoleculaire cyclisaties van hexaandial of heptaandial kan katalyseren zonder de dehydratie. Deze aldolproducten zijn namelijk waardevolle bouwstenen voor de synthese van medicijnen.

Een voorbeeld van een 4-OT gekatalyseerde aldolreactie waarbij het aldolproduct niet gedehydrateerd wordt is de crosskoppeling van propanal en pyruvaat wat het chirale product 2-hydroxy-2,3-dimethyl-4-oxo-butaanzuur geeft (zie **Hoofdstuk3**). Voor zover het bij ons bekend is, is deze verbinding niet eerder gerapporteerd in de literatuur, wat aangeeft dat enzym promiscuïteit inderdaad grote potentie heeft als bron voor synthetisch bruikbare katalytische transformaties. In toekomstig werk zou het interessant zijn om de absolute configuratie en de enantiomere overmaat van dit enzymatisch product vast te stellen. Als blijkt dat deze 4-OT gekatalyseerde aldolreactie enantioselectief is, zou het interessant zijn om de activiteit van 4-OT voor deze reactie te verhogen door middel van de 'enzyme engineering' methode die beschreven staat in **Hoofdstukken 4** en **5**. Als dit succesvol is, kan dit leiden tot een biokatalytisch proces voor de synthese van deze nieuwe verbinding.

Ten slotte zou het interessant zijn om het substraatbereik van 4-OT te verhogen voor verschillende koolstof-koolstofbinding vormende reacties. Tot nu toe is gebleken dat 4-OT meerdere Michael-type reacties en verschillende aldolreacties katalyseert (zie **Hoofdstuk 1**). Het zou fascinerend zijn om de mogelijkheden te onderzoeken van 4-OT gekatalyseerde Mannich reacties. In Mannich reacties reageert een amine met een carbonylverbinding wat leidt tot een elektrofiel imine; deze wordt vervolgens aangevallen door een koolstof nucleofiel waardoor een nieuwe koolstof-koolstofbinding ontstaat. De Mannich reactie is een populaire reactie voor de synthese van verschillende geneesmiddelen omdat er bijna altijd een stikstofatoom in deze verbindingen zit. Onze initiële experimenten toonden aan dat de grootste uitdaging bij het bestuderen van 4-OT gekatalyseerde Mannich reacties, het maken van in water oplosbare en stabiele imines

is. Onze mechanistische en structurele studies bevestigden de formatie van een enamine na een reactie van het Pro-1 residu van 4-OT met acetaldehyde. Dus zou chemische of enzymatische formatie van stabiele en oplosbare imines (hetzij toegevoegd of *in situ* gegenereerd) die potent genoeg zijn om met een enamine in 4-OT's actieve centrum te reageren tot een nieuwe biokatalytische Mannich reactie kunnen leiden die synthetisch bruikbaar is.

